

PRODUCCIÓN DE BIODIÉSEL A PARTIR DE MICROALGAS Y UNA CIANOBACTERIA CULTIVADAS EN DIFERENTES CALIDADES DE AGUA

BIODIESEL PRODUCTION FROM MICROALGAE AND A CYANOBACTERIA GROWN IN DIFFERENT QUALITIES OF WATER

Manuel Sacristán-de Alva¹, Víctor M. Luna-Pabello^{1*}, Erasmo Cadena-Martínez¹, Alejandro F. Alva-Martínez²

¹Laboratorio de Microbiología Experimental, Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. 04510. Coyoacán, Ciudad de México, México. ²Departamento el Hombre y su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco. 04960. Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, Delegación Coyoacán, D. F., México. (lpvictor@unam.mx).

RESUMEN

La producción de biodiésel, a partir de microorganismos fotosintéticos, es un tema de creciente investigación. No obstante, las implicaciones de la remoción de nutrientes y capacidad de acumulación de lípidos se desconocen cuando los microorganismos se cultivan en aguas residuales municipales respecto de su cultivo en un medio enriquecido. En el presente estudio se evaluó el potencial de dos especies de microalgas, *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*, y de una cianobacteria, *Arthrospira maxima*, para remover nutrientes y acumular lípidos, útiles para producir biodiésel, al cultivarse en dos calidades de agua residual, cruda (ARC) y tratada (ART), comparadas con un medio enriquecido (AE) con fertilizante comercial. Los cultivos se realizaron en volúmenes de 1 L, con fotoperiodos de luz:oscuridad de 12 h:12 h. Con los resultados se realizó un ANDEVA y las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Los cultivos en ARC mostraron: 1) la productividad mayor de biomasa ($p \leq 0.05$) con *S. acutus* (1.28 g L^{-1}) y *C. vulgaris* (1.15 g L^{-1}), para *A. maxima* los valores fueron similares en ARC (0.93 g L^{-1}) y AE (0.96 g L^{-1}) ($p > 0.05$), la mayor tasa de incremento de biomasa correspondió a *C. vulgaris* ($0.20\text{--}0.27 \text{ d}^{-1}$) para los tres medios de cultivo ($p \leq 0.001$), y para *S. acutus* y *A. maxima* fue entre 0.06 y 0.14 d^{-1} ; 2) la eficiencia mayor de remoción de nutrientes, superior a 60 % de fósforo y 90 % de nitrógeno orgánico ($p \leq 0.05$) para todos los microorganismos; 3) la acumulación mayor de lípidos ($p \leq 0.05$) en *S. acutus* 28.3 %, *C. vulgaris* 22.4 % y *A. maxima* 13.8 %; 4) la más alta producción de biodiésel (entre 109.4 y 244.6 mg L^{-1}) para los tres microorganismos.

ABSTRACT

The biodiesel production from photosynthetic microorganisms, is a topic of increasing research. However, the implications of nutrient removal and lipid accumulation capacity are unknown, when microorganisms are grown in municipal wastewater with respect to be grown in a rich medium. In the present study the potential of two species of microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus* and a cyanobacterium, *Arthrospira maxima*, were evaluated to remove nutrients and accumulate lipids, useful for producing biodiesel, when growing into two wastewater qualities, raw (RWW) and treated (TWW), compared with an enriched medium (EM) with commercial fertilizer. The cultures were performed in volumes of 1 L, with photoperiods of light:dark of 12 h:12 h. With the results an ANOVA was carried out and treatment means were compared with Tukey's test ($p \leq 0.05$). The cultures in RWW showed: 1) the higher biomass productivity ($p \leq 0.05$) with *S. acutus* (1.28 g L^{-1}) and *C. vulgaris* (1.15 g L^{-1}), for *A. maxima* values were similar to RWW (0.93 g L^{-1}) and EM (0.96 g L^{-1}) ($p > 0.05$), the highest rate of biomass increase corresponded to *C. vulgaris* (0.20 to 0.27 d^{-1}) for the three culture media ($p \leq 0.001$), and for *S. acutus* and *A. maxima* was between 0.06 and 0.14 d^{-1} ; 2) the higher efficiency of nutrient removal, over 60 % of phosphorus and 90 % of organic nitrogen ($p \leq 0.05$) for all microorganisms; 3) higher lipid accumulation ($p \leq 0.05$) for *S. acutus*, 28.3 %, *C. vulgaris* 22.4 % and *A. maximum* 13.8 %; 4) the higher production of biodiesel (between 109.4 and 244.6 mg L^{-1}) for the three microorganisms.

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: octubre, 2013. Aprobado: marzo, 2014.

Publicado como ARTÍCULO en Agrobiencia 48: 271-284. 2014.

Key words: wastewater, *Arthrospira maxima*, biodiesel, *Chlorella vulgaris*, nutrient removal, *Scenedesmus acutus*.

Palabras clave: aguas residuales, *Arthrospira maxima*, biodiésel, *Chlorella vulgaris*, remoción de nutrientes, *Scenedesmus acutus*.

INTRODUCCIÓN

El agotamiento de los combustibles fósiles lleva a las industrias y los científicos a investigar el desarrollo de tecnologías para obtener fuentes energéticas renovables (Zah *et al.*, 2007). En México, el objetivo del Programa Especial para el Aprovechamiento de Energías Renovables es fomentar dichas fuentes energéticas y la producción de biocombustibles con un enfoque técnico, económico, ambiental y socialmente viable. El programa plantea aumentar el porcentaje de la capacidad instalada en el país de estas alternativas de energía limpia en 29 % de la capacidad de generación prevista para el 2018 (SENER, 2013). Un ejemplo de estas tecnologías es la utilización de biomasa procedente de cultivos agrícolas para la producción de bioetanol o biodiésel (Antoni *et al.*, 2007). Este sistema presenta un impacto significativo en el potencial del cambio climático, además interviene en otras problemáticas ambientales, como la eutrofización, el agotamiento de recursos naturales y la ecotoxicidad. Pero compite con otros cultivos alimenticios por el uso de la tierra cultivable, aspecto que disminuye su potencial como tecnología (Crutzen *et al.*, 2008).

Una alternativa es usar microalgas como materia prima, ya que pueden aplicarse en zonas no aptas para los cultivos tradicionales y alcanzan tasas de crecimiento altas (0.5 a 1.2 d⁻¹) (Chisti, 2007; Flynn *et al.*, 2010). Sin embargo, muchas tecnologías de cultivo de microalgas involucran el uso de agua no contaminada, fertilizantes e inyección de CO₂ para su crecimiento, lo cual eleva el costo de la producción de biomasa algal y reduce su atractivo como tecnología (Chen *et al.*, 2011). Para minimizar estos inconvenientes, una alternativa de cultivo es usar aguas residuales municipales, de la agricultura y la ganadería, donde las microalgas pueden desarrollarse aprovechando los nutrientes en este tipo de descargas. Esta integración permite: 1) tratar las aguas residuales; 2) obtener un efluente de alta calidad; 3) generar biomasa algal útil para producir biodiésel o biogás (Sydney *et al.*, 2011).

INTRODUCTION

The depletion of fossil fuels carries industries and scientists to investigate the development of technologies to obtain renewable energy sources (Zah *et al.*, 2007). In Mexico, the goal of the Special Program for the Development of Renewable Energy is to promote these energy sources and biofuel production with a technical, economic, environmental and socially viable approach. The program proposes to increase the percentage of installed capacity in the country of these clean energy alternatives in 29 % of the generation capacity planned for 2018 (SENER, 2013). An example of these technologies is the use of biomass from agricultural crops for the production of bioethanol or biodiesel (Antoni *et al.*, 2007). This system has a significant impact on the potential of climate change; it is also involved in other environmental problems, such as eutrophication, depletion of natural resources and eco-toxicity. But it also competes with food crops for arable land use, aspect that diminish its potential as technology (Crutzen *et al.*, 2008).

An alternative of these systems is the use of microalgae as feedstock, since they can be applied in unsuitable areas for traditional crops and achieve high growth rates (from 0.5 to 1.2 d⁻¹) (Chisti, 2007; Flynn *et al.*, 2010). However, many microalgae cultivation technologies involve the use of clean water, fertilizers and injection of CO₂ for growth, which raise the cost of production of algal biomass and reduce their attractiveness as technology (Chen *et al.*, 2011). To minimize these drawbacks, an alternative for cultivation is to use municipal wastewater, and residual water from agriculture and livestock, where microalgae can be developed taking advantage of the nutrients in this type of discharge. This integration allows: 1) treating wastewater, 2) obtain a high quality effluent, 3) generate useful algal biomass to produce biodiesel or biogas (Sydney *et al.*, 2011).

There are studies related to systems based on analyses developed on the cultivation of microalgae of a single species and using an enriched medium at laboratory and pilot scale (Rawat *et al.*, 2011). But the comparative assessment of microalgae cultivation in wastewater with cultures in an enriched culture from the perspective of biomass productivity, the accumulation of lipids to produce biodiesel, as well

Hay estudios relacionados con sistemas basados en análisis desarrollados sobre el cultivo de microalgas de una sola especie y usando un medio enriquecido, a escala de laboratorio y piloto (Rawat *et al.*, 2011). Pero la evaluación comparativa del cultivo de microalgas en aguas residuales con cultivos en un medio enriquecido desde una perspectiva de la productividad de biomasa, la acumulación de lípidos para producir biodiésel, así como la mejora de la calidad del agua (mediante la remoción de nutrientes), no se ha analizado simultáneamente. Para cianobacterias hay investigaciones sobre cultivos enriquecidos y resulta técnicamente viable para la obtención de bio-combustible (Al-Thani y Potts, 2012). La hipótesis para este estudio fue que no hay diferencias significativas en la remoción de nutrientes ni en la capacidad de acumular lípidos entre microalgas y cianobacterias. Por tanto, el objetivo del estudio fue evaluar comparativamente el potencial de dos especies de microalgas, *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*, y de una cianobacteria, *Arthrospira maxima*, así como determinar su eficiencia de remoción de nutrientes y su capacidad para acumular lípidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Medios de cultivo

Para el crecimiento por separado de los tres microorganismos se emplearon tres medios de cultivo: 1) una descarga de agua residual cruda después de un tratamiento de cribado y sedimentación (ARC), 2) agua residual tratada en un sistema de lodos activados convencional (ART), y 3) agua enriquecida (AE) con nutrientes (fertilizante, NPK 20-20-20). ARC y ART fueron recolectadas de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales convencional del tipo lodos activados, ubicada en la Ciudad Universitaria, UNAM (Ciudad de México). El AE fue preparada usando agua destilada a la cual se le agregó el fertilizante comercial hidrosoluble marca Peters® NPK 20-20-20 (Scotts-Sierra) en una concentración de 1.5 g L^{-1} , equivalente a 300 mg L^{-1} de nitrógeno (4 % de nitrógeno amoniacal, 6 % de nitratos y 10 % de urea), 131 mg L^{-1} de fosfatos (P_2O_5), 250 mg L^{-1} de potasio (K_2O) y trazas de magnesio, boro, cobre, hierro, manganeso, molibdeno y zinc (Trainor y Wilmes, 1994).

Microorganismos de prueba

En este estudio se cultivaron dos especies de microalgas (*Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*) y una cianobacteria

(*Arthrospira maxima*), así como determinar su eficiencia de remoción de nutrientes y su capacidad para acumular lípidos. El mejoramiento de la calidad del agua (por la remoción de nutrientes), no ha sido analizado simultáneamente. Para cianobacterias, hay investigación sobre cultivos enriquecidos y resultados técnicamente viables para obtener bioenergía (Al-Thani y Potts, 2012). La hipótesis para este estudio fue que no hay diferencias significativas en la remoción de nutrientes o en la capacidad de acumular lípidos de microalgas y cianobacterias. Por lo tanto, el objetivo del estudio fue evaluar comparativamente el potencial de dos especies de microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*, y el de la cianobacteria, *Arthrospira maxima*, así como determinar su eficiencia de remoción de nutrientes y su capacidad para acumular lípidos.

MATERIALS AND METHODS

Culture media

For the three microorganisms, growing separately, three different culture media were used: 1) a raw wastewater discharge after a treatment of screening and sedimentation (RWW), 2) wastewater treated in a conventional activated sludge system (TWW), and, and 3) nutrient-enriched medium (EM) (fertilizers, NPK 20-20-20). RWW and TWW were collected from a municipal wastewater treatment plant of the activated sludge type, located in Ciudad Universitaria, UNAM (Mexico City). EM was prepared using distilled water to which was added the commercial soluble fertilizer Peters® NPK 20-20-20 (Scotts-Sierra) at a concentration of 1.5 g L^{-1} equivalent to 300 mg L^{-1} of nitrogen (4 % of ammoniac nitrogen, 6 % of nitrate and 10 % urea), 131 mg L^{-1} phosphate (P_2O_5), 250 mg L^{-1} potassium (K_2O) and traces of magnesium, boron, copper, iron, manganese, molybdenum and zinc (Wilmes and Trainor 1994).

Microorganisms

In this study two species of microalgae were cultured (*Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*) and cyanobacteria (*Arthrospira maxima*). The *C. vulgaris* strain used was isolated from Cuitzeo Lake, Michoacan, *S. acutus* was obtained from the canals of Xochimilco, Mexico City, and *A. maxima* was isolated from the Nabor Carrillo Lake, Estado de Mexico.

Culture of microorganisms and experimental design

Cultures were carried out in 2 L Erlenmeyer flasks, in which 1 L of RWW or TWW or EM were added and was inoculated with 100 mL (700 mg L^{-1} corresponding to $3.5 \times 10^6 \text{ m L}^{-1}$)

(*Arthrospira maxima*). La cepa de *C. vulgaris* usada se aisló del Lago de Cuitzeo, estado de Michoacán, *S. acutus* fue obtenida de los canales de Xochimilco, Ciudad de México, y *A. máxima* fue aislada del Lago Nabor Carrillo, Estado de México.

Cultivo de los microorganismos y diseño experimental

Los cultivos se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 2 L, en los cuales se adicionó 1 L de ARC, o ART o AE y se inoculó con 100 mL (700 mg L^{-1} , correspondiente a 3.5×10^6 células mL^{-1}) de cada una de las tres cepas por separado, generando nueve tratamientos (cada uno por triplicado). Los cultivos se mantuvieron con aireación constante a una temperatura de 25 ± 5 °C y bajo fotoperiodos de luz:oscuridad de 12 h:12 h. Para la iluminación se usaron lámparas fluorescentes T8 marca Philips de 32 W, con una iluminancia de 37 klx.

El crecimiento se realizó hasta que los cultivos alcanzaron la fase estacionaria en ARC y ART (a los 16 d), debido a que en esta fase los microorganismos realizan la mayor acumulación de lípidos (Mansour *et al.*, 2005).

Eficiencia de remoción de nutrientes

Para determinar la calidad del agua y evaluar la remoción de nutrientes antes y después del periodo de cultivo, se analizó el contenido de fósforo total y de nitrógeno en forma de nitratos, orgánico y amoniacal, así como la demanda química de oxígeno (DQO). Todos los análisis fueron realizados siguiendo los protocolos descritos en APHA (2005).

Determinación del crecimiento de los microorganismos

El crecimiento de la biomasa se determinó cada dos días por gravimetría. Las muestras fueron homogeneizadas por medio de un agitador magnético (Thermolyne, modelo Cimarec® 2). Después se tomó una muestra de 10 mL, se filtró (filtro Millipore, de $0.045 \mu\text{m}$) para separar la biomasa del medio de cultivo y fueron secadas (en una estufa a 60 °C) para determinar el peso seco.

La tasa de aumento de biomasa por día (r), basada en la biomasa en peso seco (en todos los experimentos), fue calculada con la ecuación exponencial de Krebs (1985):

$$r = (\ln N_t - \ln N_0) / t$$

donde, \ln es el logaritmo natural, N_0 corresponde a la densidad de la población inicial y N_t equivale a la densidad después del tiempo t (días). Para cada réplica se consideraron los primeros

de each of the three strains separately, generating nine treatments (each in triplicate). Cultures were maintained with constant aeration at a temperature of 25 ± 5 °C and under photoperiods of light: dark 12 h:12 h. For lighting, Philips T8 32W fluorescent lamps were used, with an illuminance of 37 klx.

The growth was performed until the cultures reached stationary phase in RWW and TWW (at 16 d), because in this phase the microorganisms do most of the lipid accumulation (Mansour *et al.*, 2005).

Nutrient removal efficiency

To determine water quality and evaluate nutrient removal before and after the culture period, the total phosphorus content and nitrogen in form of nitrates, organic and ammonia, were analyzed, as well as the chemical oxygen demand (COD). All analyzes were performed following the protocols described in APHA (2005).

Determining the growth of the microorganisms

The biomass growth was determined gravimetrically every two days. The samples were homogenized using a magnetic stirrer (Thermolyne model Cimarec® 2). Then a sample of 10 mL was taken, filtered (Millipore™ filters of $0.045 \mu\text{m}$) to remove the biomass from the culture medium and were dried (in an oven at 60 °C) to determine the dry weight.

The biomass increase rate per day (r), based on dry weight biomass (in all experiments) was calculated using the exponential equation given by Krebs (1985):

$$r = (\ln N_t - \ln N_0) / t$$

where \ln is the natural logarithm, N_0 corresponds to the initial population density and N_t equals the density after time t (days). For each replica the first seven days of culture were considered corresponding to the exponential phase growth (Dumont *et al.*, 1995).

Separation of the biomass from the culture medium

Biomass separation was performed by a coagulation-flocculation method using chitosan (Sigma-Aldrich®) at a concentration of 20 mg L^{-1} (Divakaran and Pillai, 2002).

Lipid extraction of the biomass

Lipids were extracted from the dried biomass using a mixture of chloroform: methanol (2:1) (JT Baker) and a Fisher Scientific

sietes días de cultivo, correspondientes a la fase exponencial de crecimiento (Dumont *et al.*, 1995).

Separación de la biomasa del medio de cultivo

La separación de la biomasa se realizó mediante un método de coagulación–floculación usando quitosano (Sigma-Aldrich®) en una concentración de 20 mg L⁻¹ (Divakaran y Pillai, 2002).

Extracción de los lípidos de la biomasa

Los lípidos fueron extraídos de la biomasa seca usando una mezcla de cloroformo:metanol (2:1) (J.T. Baker) y un sonicador Fisher Scientific 60 Sonic Dismembrator a 25 W (Pittsburgh, Pensilvania, USA) durante 1 min. Después se filtró la muestra con un filtro GF/F Whatman de 0.7 μm y en el filtrado se agregó una disolución de NaCl (J.T. Baker) al 0.9 % y se recolectó la fase orgánica. Esta fase orgánica se evaporó usando un rotavapor marca Büchi R-124 (Flawil, Suiza) con un baño de agua caliente Büchi waterbath B-480 (Flawil, Suiza) (Moazami *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2012). Los remanentes luego de la evaporación del disolvente fueron nuevamente extraídos con hexano (J.T. Baker) y filtrados usando un filtro GF/F Whatman de 0.7 μm. El contenido de lípidos se determinó por gravimetría.

Cálculo teórico de la producción de biodiésel

La producción del biodiésel fue calculada teóricamente con base en la eficiencia de la reacción de transesterificación (transformación de los lípidos en biodiésel) equivalente a 87.7 %, multiplicada por la concentración de lípidos extraída de la biomasa de cada microorganismo (Sacristán *et al.*, 2013).

Análisis estadístico

Con los resultados obtenidos se realizó un ANDEVA y las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey (p≤0.05), usando el programa JMP v.10 (SAS Institute, Inc.). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se presentan como valores medios con su desviación estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento y productividad de la biomasa

En el cultivo de *C. vulgaris* (Figura 1A) con ARC se obtuvo una productividad de biomasa seca (69.8 mg L⁻¹ d⁻¹) mayor que en el medio enriquecido

60 Sonic Dismembrator Sonicator at 25 W (Pittsburgh, PA, USA) for 1 min. Then the sample was filtered through a GF/F Whatman® filter of 0.7 μm and in the filtered a NaCl (J. T. Baker®) solution was added at 0.9 % and the organic phase was collected. This organic phase was evaporated using a Büchi Rotavapor® R-124 (Flawil, Switzerland) with a hot water bath Büchi B-480 Water Bath (Flawil, Switzerland) (Moazami *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2012). The remains after evaporation of the solvent were extracted again with hexane (J. T. Baker) and filtered through a GF/F Whatman filter of 0.7 μm. Lipid content was determined gravimetrically.

Theoretical calculation of biodiesel production

The biodiesel production was calculated theoretically based on the efficiency of the transesterification reaction (transformation of lipids in biodiesel) equivalent to 87.7 %, multiplied by the concentration of lipids extracted from the biomass of each microorganism (Sacristán *et al.*, 2013).

Statistical analysis

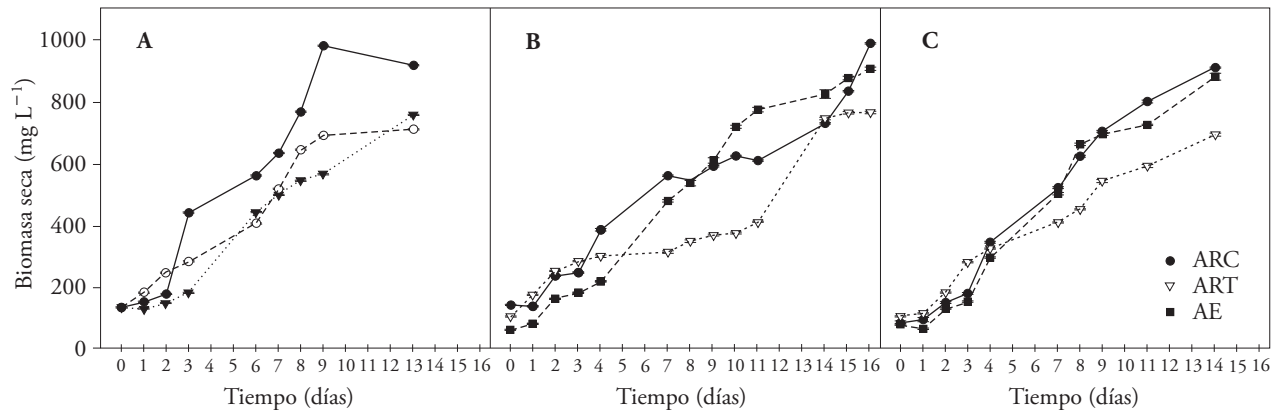
With the obtained results an ANOVA was performed and treatment means were compared through a Tukey test (p≤0.05) using the JMP v.10 software (SAS Institute, Inc.). All determinations were performed in triplicate and results are presented as mean values with their standard deviation.

RESULTS AND DISCUSSION

Biomass growth and productivity

In the cultivation of *C. vulgaris* (Figure 1A) with RWW a greater productivity of dry biomass (69.8 mg L⁻¹ d⁻¹) was obtained than in the enriched medium (EM) (53.8 mg L⁻¹ d⁻¹) and in TWW (50.5 mg L⁻¹ d⁻¹) the least amount of biomass was produced. In laboratory studies under controlled conditions biomass productivities of *C. vulgaris* ranged from 170 to 200 mg L⁻¹ d⁻¹ in cultures using an enriched medium (Rodolfi *et al.*, 2009). Such productivity is 2.7 times higher than that found in cultures in RWW.

For *S. acutus* (Figure 1B) the highest biomass productivity was obtained in RWW (61.5 mg L⁻¹ d⁻¹) and was higher than the two other qualities of water. This may be due to the fact that in the residual water the microalga grows both as in heterotrophic as in mixotrophic form (Park *et al.*, 2011), but in



**Figura 1. Curvas de crecimiento de los microorganismos en los tres medios de cultivo (ARC: agua residual cruda; ART: agua residual tratada; AE: agua enriquecida con nutrientes) (medias \pm DE), $n=3$. A) *C. vulgaris*; B) *S. acutus*; C) *A. maxima*.
Figure 1. Growth curves of microorganisms in the three culture media (RWW: raw wastewater, TWW: treated wastewater; EM: nutrient-enriched water) (means \pm SD), $n=3$. A) *C. vulgaris*, B) *S. acutus*, C) *A. maxima*.**

(AE) ($53.8 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) y en ART ($50.5 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) y en esta última se produjo la cantidad menor de biomasa. En estudios realizados en laboratorio en condiciones controladas, la productividad de biomasa de *C. vulgaris* varió de 170 a $200 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ en cultivos usando un medio enriquecido (Rodolfi *et al.*, 2009). Dicha productividad es 2.7 veces mayor que la encontrada en los cultivos en ARC.

La productividad mayor de biomasa de *S. acutus* (Figura 1B) se obtuvo en ARC ($61.5 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), superior a las otras dos calidades de agua. Esto puede deberse a que en el agua residual la microalga crece de forma heterótrofa y mixótrofa (Park *et al.*, 2011), pero en AE creció sólo de manera autótrofa (debido a que la única fuente de carbono fue CO_2). La productividad máxima de *S. acutus* en el presente estudio fue 74 % menor que la reportada por Rodolfi *et al.* (2009), de 210 a $260 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, y *Scenedesmus* sp. fue cultivada en un medio enriquecido. Sin embargo, Kim *et al.* (2007) reportan una productividad de $6 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para la misma especie cultivada en orina fermentada de cerdos.

La productividad de biomasa en los cultivos con *A. maxima* en ARC y AE (Figura 1C) fueron muy similares, 64.6 y $62.6 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente, mientras que, como en los casos anteriores, el cultivo en ART presentó el crecimiento menor. Dichos valores fueron inferiores comparados con productividades de biomasa de $210 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Gouveia y Oliveira, 2009) y $250 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Griffiths y Harrison, 2009), ambas con cultivos en laboratorio y usando un medio enriquecido.

EM only grew in an autotrophic way (because the only carbon source was CO_2). The maximum productivity of *S. acutus* in this study was 74 % lower than that reported by Rodolfi *et al.* (2009), from 210 to $260 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, and *Scenedesmus* sp. was grown in an enriched medium. However, Kim *et al.* (2007) reported a productivity of $6 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ for the same species cultivated on fermented urine from pigs.

The biomass productivity in cultures with *A. maxima* in RWW and EM (Figure 1C) were very similar, 64.6 and $62.6 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectively, while, as in previous cases, the culture in TWW presented the lowest growth. These values were much lower compared to biomass productivity of $210 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Gouveia and Oliveira, 2009) and $250 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Griffiths and Harrison, 2009), both with cultures in laboratory and using an enriched medium.

The biomass increase rate per day was different in the three microorganisms and this change depended on the type of culture medium (Figure 2). The species with the highest values (from 0.20 to 0.27) was *C. vulgaris*, while rates for *S. acutus* and *A. maxima* were similar (between 0.06 and 0.14). This behavior is common in chlorophytes as *C. vulgaris*, which have rapid growth (r strategy) in comparison with cyanobacteria (*A. maxima*) whose growth is relatively slow (K strategy) (Reynolds 1988; Jensen *et al.*, 1994). According to Ogawa and Aiba (1981), in mixotrophy the growth rate for *C. vulgaris* is always higher than for *S. acutus*, the latter being very similar to that of *A. maxima* (Bai *et al.*, 2014). In addition, the size of *S. acutus* ($10 \pm 0.5 \mu\text{m}$) is two-fold that of *C. vulgaris*

La tasa de incremento de biomasa por día fue diferente en los tres microorganismos y esta variación dependió del tipo de medio de cultivo (Figura 2). La especie con los valores más altos (de 0.20 a 0.27) fue *C. vulgaris*, mientras que las tasas para *S. acutus* y *A. maxima* fueron similares (entre 0.06 y 0.14). Este comportamiento es habitual en las clorofitas como *C. vulgaris*, las cuales presentan un rápido crecimiento (estrategia r) en comparación con las cianobacterias (*A. maxima*) cuyo crecimiento es relativamente lento (estrategia K) (Reynolds 1988; Jensen *et al.*, 1994). De acuerdo con Ogawa y Aiba (1981), en mixotrofia la tasa de crecimiento para *C. vulgaris* siempre es mayor que para *S. acutus*, y esta última es muy similar a la de *A. maxima* (Bai *et al.*, 2014). Además, el tamaño de *S. acutus* ($10 \pm 0.5 \mu\text{m}$) es dos veces mayor que el de *C. vulgaris* ($5.5 \pm 0.5 \mu\text{m}$), lo cual repercute en la tasa de crecimiento (Ogawa y Aiba, 1981). Estadísticamente, la tasa de incremento de la población (r) de las tres especies separadas, en grupos y en conjuntos, es significativamente diferente por los diferentes medios de cultivo ($p \leq 0.001$, ANOVA de una vía, Cuadro 1). Pero la prueba de Tukey mostró que la tasa de crecimiento poblacional los separa en sólo dos grupos (Figura 2). Además, en el medio de cultivo con AE se obtuvieron las tasas promedio más altas de incremento de biomasa para los tres microorganismos analizados (Cuadro 1 y Figura 2).

Las tasas de incremento de biomasa para *C. vulgaris* en ARC y ART coinciden con los intervalos ($0.25\text{-}0.3 \text{ d}^{-1}$) encontrados por Lau *et al.* (1995) y He *et al.* (2013). En cambio, para *S. acutus* la diferencia entre este estudio y el de Shamala *et al.* (1982) (0.74 d^{-1} en agua tratada) y Doria *et al.* (2012) (0.31 d^{-1} en agua enriquecida y 0.21 d^{-1} en agua residual) fue 60 % mayor. La cianobacteria *A. maxima* presentó una diferencia 50 % mayor respecto del estudio realizado por Vonshak (2003) (0.4 d^{-1} en agua residual). Pero las tasas de incremento de biomasa son aparentemente simples de medir, tienen la desventaja de que pueden generar incertidumbre respecto a la diferencias de biomasa inicial, el número de células o el peso total. De acuerdo con Flynn (2006) y Flynn *et al.* (2010), las tasas de incremento representan la dinámica de los cultivos de las microalgas, siempre que sean estables.

($5.5 \pm 0.5 \mu\text{m}$), which affects the growth rate (Ogawa and Aiba, 1981). Statistically, the population increase rate (r) of the three species separated in groups and sets is significantly different by the different culture media ($p \leq 0.001$, one-way ANOVA, Table 1). But the Tukey test showed that the population growth rate separates them in just two groups (Figure 2). Furthermore, in the culture medium with EM the highest average growth rates of biomass increase were obtained for the three microorganisms analyzed (Table 1 and Figure 2).

The rates of increase in biomass for *C. vulgaris* in RWW and TWW coincide with intervals ($0.25\text{-}0.3 \text{ d}^{-1}$) found by Lau *et al.* (1995) and He *et al.* (2013). Conversely, for *S. acutus* the difference between this study and that of Shamala *et al.* (1982) (0.74 d^{-1} in treated water) and Doria *et al.* (2012) (0.31 d^{-1} in enriched water and 0.21 d^{-1} in wastewater) was 60 % higher. The cyanobacterium *A. maxima* showed a difference 50 % higher than the study by Vonshak (2003) (0.4 d^{-1} in wastewater). But the rates of increase in biomass are apparently simple to measure, have the disadvantage that they can generate uncertainty about the differences in initial biomass, the number of cells or the total weight. According to Flynn (2006) y Flynn *et al.*

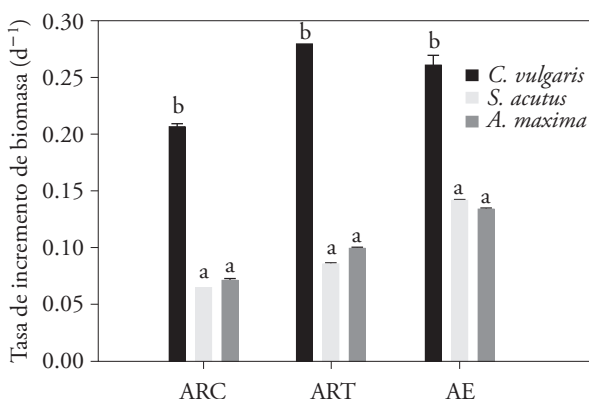


Figura 2. Tasa de incremento de biomasa de los microorganismos en los tres medios de cultivo (ARC: agua residual cruda; ART: agua residual tratada; AE: agua enriquecida con nutrientes) (medias \pm DE); $n=3$. Las barras con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.001$).

Figure 2. Biomass growth rate of the microorganisms in the three culture media (RWW: raw wastewater, TWW: treated wastewater; EM: nutrient-enriched water) (means \pm SD), $n=3$. Bars with different letter are statistically different (Tukey, $p \leq 0.001$).

Cuadro 1. Tasa de crecimiento poblacional incremento por día (r) de *C. vulgaris*, *S. acutus* y *A. maxima* en diferentes medios de cultivo[†].**Table 1. Population growth rate, increase per day (r) of *C. vulgaris*, *S. acutus* and *A. maxima* in different culture media[†].**

Fuente de variación	GL	SC	CM	F valor	P valor
<i>C. vulgaris</i>					
Medios de cultivo	2	0.00833	0.00417	50.527	<0.001
Error	6	0.000495	0.0000825		
Total correcto	8	0.00883			
<i>S. acutus</i>					
Medios de cultivo	2	0.00938	0.00469	9002.456	<0.001
Error	6	0.0000312	0.00000521		
Total correcto	8	0.00938			
<i>A. maxima</i>					
Medios de cultivo	2	0.00583	0.00291	2831.131	<0.001
Error	6	0.00000617	0.00000103		
Total correcto	8	0.00583			
<i>C. vulgaris</i> × <i>S. acutus</i>					
Medios de cultivo	5	0.12	0.0241	580.485	<0.001
Error	12	0.000498	0.0000415		
Total correcto	17	0.121			
<i>C. vulgaris</i> × <i>A. maxima</i>					
Medios de cultivo	5	0.111	0.0221	530.41	<0.001
Error	12	0.000501	0.0000417		
Total correcto	17	0.111			
<i>S. acutus</i> × <i>A. maxima</i>					
Medios de cultivo	5	0.0153	0.00306	3948.809	<0.001
Error	12	0.0000093	0.000000775		
Total correcto	17	0.0153			
<i>C. vulgaris</i> × <i>S. acutus</i> × <i>A. maxima</i>					
Medios de cultivo	8	0.156	0.0196	698.316	<0.001
Error	18	0.000504	0.000028		
Total correcto	26	0.157			

[†]Análisis de la varianza (ANDEVA); GL: grados de libertad, SC: suma de cuadrados; CM: cuadrado medio; F: relación F. ❖ [†] Analysis of variance (ANOVA); GL: degrees of freedom; SC: sum of squares; CM: mean square; F: F relation.

Eficiencia de remoción de nutrientes

En todos los casos los cultivos en AE presentaron porcentajes de remoción inferiores al 50 % para fosfato, nitratos y nitrógeno orgánico y amoniacal (Cuadro 2). Esto se debió principalmente a que los cultivos se interrumpieron cuando los microorganismos llegaron a su fase estacionaria en el agua residual (ARC y ART) pero AE seguía en fase logarítmica.

La remoción mayor del fósforo se alcanzó en ARC (más del 60 % en todos los casos). Lo mismo ocurrió con la degradación de los nitratos y el

(2010), the increase rates represent the dynamics of microalgae cultures, provided they are stable.

Nutrient removal efficiency

In all cases EM cultures showed removal percentages below 50 % for phosphate, nitrate and organic and ammoniacal nitrogen (Table 2). This was mainly due to the fact that cultures were disrupted when microorganisms reached their stationary phase in wastewater (RW_W and TW_W) but EM remained in logarithmic phase.

**Cuadro 2. Contenido de nutrientes en los tres medios previo y posterior al cultivo de los tres microorganismos (medias ± DE).
Table 2. Nutrient content in the three media, pre-and post-culture of the three microorganisms (means ± SD) media.**

	<i>C. vulgaris</i>			<i>S. acutus</i>			<i>A. maxima</i>		
	ARC	ART	AE	ARC	ART	AE	ARC	ART	AE
Ortofosfatos (mg L ⁻¹)	AC	4.8±0.2	124.7±3.1	9.5±0.2	7.3±0.3	122.1±0.2	10±0.2	3.7±0.1	129.6±0.6
	DC	2.5±0.2	82.3±1.4	3.2±0.4	2.6±0.1	109.1±1.9	4.2±0.2	1.6±0.2	80.1±2.8
Nitratos (mg L ⁻¹)	AC	4.7±0.2	93.7±2.8	13.4±0.4	5.3±0.2	97.6±1.2	19.4±0.4	5.8±0.3	91.1±4.6
	DC	2±0.2	75.3±2.0	3.9±0.3	3±0.3	67.6±2.3	8.3±0.3	2.4±0	65±1.8
Nitrogeno orgánico y amoniacal (mg L ⁻¹)	AC	39.5±2.2	23.6±1.7	207±3.0	49.4±1.3	207.2±1.8	34.7±3.4	24.4±1	204.5±1.3
	DC	3.3±0.7	1.7±0.4	117.9±3.4	3.2±2.3	59.8±3.2	9.5±0.3	3.6±0.4	135±3.9
DQO (mg O ₂ L ⁻¹)	AC	568.9±10.7	235.6±7.0	253.1±3.5	782.8±52.9	273.5±10.7	649.3±32.5	203±35	286.9±48.5
	DC	197.9±2.5	111.4±4.7	113.4±3.5	177.9±7.0	141.8±11.2	182.6±7.3	267.1±25.2	173.8±22.7

AC: antes del cultivo; DC: después del cultivo. ARC: agua residual cruda (después de un tratamiento de cribado y sedimentación); ART: agua residual tratada mediante un sistema de lodos activados; AE: medio enriquecido con nutrientes ♦ AC: before culture; DC: after culture, RW: raw wastewater (after a treatment of screening and sedimentation); TW: treated wastewater by an activated sludge system, EM: nutrient-enriched medium.

nitrógeno orgánico y amoniacal, aunque la reducción en ARC fue muy similar a la alcanzada en ART (más de 90 % en *C. vulgaris* y cercano a 70 % en *A. maxima*) (Cuadro 2).

En los cultivos con ARC hubo una alta remoción de compuestos químicamente oxidables medidos como DQO (77 %), lo que indica un crecimiento bajo condiciones heterótrofas (Park *et al.*, 2011). El medio enriquecido no contenía carbono orgánico, por lo cual el valor de DQO obtenido para este cultivo se debió a otros tipo de compuestos oxidables, como los nitrogenados. La disminución del valor de DQO en AE fue ligeramente superior al alcanzado en ART para *C. vulgaris* y *A. maxima* (Cuadro 2).

Acumulación de lípidos

La acumulación de lípidos siguió el mismo patrón en todos los casos y los cultivos en ARC mostraron los porcentajes mayores de acumulación y los de ART tuvieron los resultados más desfavorables (Cuadro 3). De acuerdo con esos resultados, la prueba con *S. acutus* y ARC alcanzó el mayor porcentaje de acumulación de lípidos y fue significativamente diferente ($p \leq 0.05$).

En experimentos con *C. vulgaris* el contenido de lípidos varía de 18.4 a 19.2 % con una productividad de biomasa de 0.17 a 0.20 g L⁻¹ d⁻¹ (Rodolfi *et al.*, 2009) o un contenido de lípidos de 42 % con 0.69 g L⁻¹ de biomasa (Feng *et al.*, 2011). En ambos casos el cultivo se realizó en reactores de laboratorio bajo condiciones controladas (en el primero usando un medio de cultivo enriquecido y en el segundo agua residual artificial). En el primer experimento, el contenido de lípidos fue menor al obtenido en el presente estudio usando ARC (22.4 %), pero la productividad de biomasa fue mayor a la alcanzada en esta prueba (0.09 g L⁻¹ d⁻¹). En el segundo experimento, el contenido de lípidos fue más alto que en el presente estudio, pero el contenido de biomasa fue menor (1.15 g L⁻¹), con lo cual la acumulación de lípidos muy similar en ambos casos (0.27 g L⁻¹) (Cuadro 3).

El contenido de lípidos en *Scenedesmus* sp. varía de 20 a 21 % (Gong y Jiang, 2011) y de 19.6 a 21.1 % (Rodolfi *et al.*, 2009), en cultivos en laboratorio y condiciones controladas. Estos resultados fueron similares a los de cultivos de *S. acutus* utilizando AE, pero menores a los obtenidos en ARC. Rawat *et*

The highest phosphorus removal was reached in RWW (over 60 % in all cases). The same happened with the degradation of nitrates and ammoniacal and organic nitrogen, although the reduction in RWW was very similar to that achieved in TWW (over 90 % in *C. vulgaris* and close to 70 % in *A. maxima*) (Table 2).

In cultures with RWW there was a high removal of chemically oxidizable compounds measured as DQO (77 %), indicating a growth under heterotrophic conditions (Park *et al.*, 2011). The enriched medium did not contain organic carbon; therefore, the DQO value obtained for this culture was due to other types of oxidizable compounds, such as nitrogenous compounds. The decrease of the DQO value in EM was slightly higher than that achieved in TWW for *C. vulgaris* and *A. maxima* (Table 2).

Lipid accumulation

Lipid accumulation followed the same pattern in all cases and the cultures in RWW showed the highest percentages of accumulation and those of TWW had the worst results (Table 3). According to these results, the test with *S. acutus* and RWW reached the highest percentage of lipid accumulation and was significantly different ($p \leq 0.05$).

In experiments with *C. vulgaris* lipid content varies from 18.4 to 19.2 % with a biomass productivity of 0.17 to 0.20 g L⁻¹ d⁻¹ (Rodolfi *et al.*, 2009) or a lipid content of 42 % with 0.69 g L⁻¹ of biomass (Feng *et al.*, 2011). In both cases the culture was performed in laboratory reactors under controlled conditions (in the first by using an enriched medium and in the second artificial wastewater). In the first experiment, the lipid content was lower than that obtained in the present study using RWW (22.4 %), but the biomass productivity was higher than that achieved in this test (0.09 g L⁻¹ d⁻¹). In the second experiment, lipid content was higher than in the present study, but the biomass content was lower (1.15 g L⁻¹) whereby the accumulation of lipids was very similar in both cases (0.27 g L⁻¹) (Table 3).

The lipid content of *Scenedesmus* sp. ranges 20 to 21 % (Gong and Jiang, 2011) and 19.6 to 21.1 % (Rodolfi *et al.*, 2009), in laboratory cultures and under controlled conditions. These results were

Cuadro 3. Prueba de Tukey para el porcentaje de acumulación de lípidos (medias \pm DE) aplicado a los tres microorganismos en las tres calidades de agua.
Table 3. Tukey test for lipid accumulation percentage (means \pm SD) applied to the three microorganisms in the three water qualities.

Calidad de agua, microorganismo	Porcentaje de lípidos (%)
ARC, <i>S. acutus</i>	28.34 \pm 1.14 a
ARC, <i>C. vulgaris</i>	22.38 \pm 1.16 b
AE, <i>S. acutus</i>	21.83 \pm 1.51 b
AE, <i>C. vulgaris</i>	16.55 \pm 0.90 c
ARC, <i>A. maxima</i>	13.78 \pm 0.74 c,d
ART, <i>S. acutus</i>	12.72 \pm 1.17 d
ART, <i>C. vulgaris</i>	12.29 \pm 0.88 d
AE, <i>A. maxima</i>	11.36 \pm 0.59 d
ART, <i>A. maxima</i>	7.52 \pm 0.61 e

a, b, c, d, e Medias con diferente letra son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). ARC: agua residual cruda (después de un tratamiento de cribado y sedimentación); ART: agua residual tratada mediante un sistema de lodos activados; AE: medio enriquecido con nutrientes \diamond a, b, c, d, e Means with different letter are statistically different ($p \leq 0.05$). RWW: raw wastewater (after a treatment of screening and sedimentation); TWW: treated wastewater by an activated sludge system; EM: nutrient-enriched medium.

al. (2011) usaron microalgas cultivadas en agua residual artificial y el contenido de lípidos fue 12.8 %, similar al del presente estudio para ART, pero bastante menor que lo encontrado para ARC (Cuadro 3). Para los cultivos de *C. vulgaris* en ARC y de *S. acutus* en AE, los porcentajes de lípidos fueron similares entre sí ($p \leq 0.05$).

Los contenidos de lípidos de *A. maxima* empleando AE y ARC fueron superiores a los reportados por Gouveia y Oliveira (2009) y Verma *et al.* (2010) donde los valores fluctuaron entre 4 a 9 % y 6 a 7 %, respectivamente, para cultivos desarrollados en laboratorio y bajo condiciones controladas. Sin embargo, en los cultivos de *A. maxima* en ART se obtuvo el menor porcentaje de lípidos (7.5 %), y fue estadísticamente diferente a los demás (Cuadro 3).

Cálculo teórico de la producción de biodiésel

Con la cantidad de biomasa y el contenido de lípidos obtenidos, con cada microalga y la cianobacteria en los diferentes medios de cultivo (Cuadro 4), se puede calcular la concentración de biodiésel teórica. Bajo este supuesto, se observa que para los tres microorganismos se obtendría una

similar to those of *S. acutus* cultures using EM, but lower than those obtained in RWW. Rawat *et al.* (2011) used microalgae cultured in artificial wastewater and the lipid content was 12.8 %, similar to the present study for RWW, but substantially lower than that found for RWW (Table 3). For cultures of *C. vulgaris* in RWW and *S. acutus* in EM, lipid percentages were similar to each other ($p \leq 0.05$).

The lipid contents of *A. maxima* using EM and RWW were higher than those reported by Gouveia and Oliveira (2009) and Verma *et al.* (2010) where values ranged between 4 and 9 % and 6 and 7 %, respectively for cultures grown in the laboratory under controlled conditions. However, in cultures of *A. maxima* in TWW the lowest lipid percentage (7.5 %) was obtained and was statistically different from the others (Table 3).

Theoretical calculation of biodiesel production

From the amount of biomass and lipid content obtained for each microalgae and cyanobacteria in the different culture media (Table 4), the theoretical concentration of biodiesel can be calculated. Under this assumption, it is observed that for the three

mayor cantidad de biodiésel al realizar los cultivos en ARC, donde existe un crecimiento heterótrofo que conlleva a la acumulación de lípidos (Cuadro 4). Para AE, la cantidad de biodiésel sería 34 % menor que en ARC, debido a que el crecimiento de los microorganismos es autótrofo (sin estrés), por lo que la acumulación de lípidos es menor (Zhou *et al.*, 2012). La cantidad más baja de biodiésel se obtendría con los cultivos en ART (bajo contenido de carbono), siendo este el medio con la menor concentración de nutrientes (Cuadro 2). Con los cultivos de *S. acutus* en ARC se alcanzaría la mejor producción de biodiésel (244.57 mg L^{-1}), mostrando ser una materia prima adecuada para este fin (Cuadro 4).

CONCLUSIONES

La tasa de crecimiento, la remoción de nutrientes y la capacidad de acumular lípidos entre las microalgas y la cianobacteria estudiadas fueron diferentes. En un mismo lapso de tiempo, los cultivos de *C. vulgaris*, *S. acutus* y *A. maxima* en agua residual cruda (ARC) mostraron mejores resultados en el incremento de biomasa y remoción de nutrientes que en el agua enriquecida, por lo cual el uso de ARC como medio para cultivar estas especies es más viable económicamente. Asimismo, la microalga *S. acutus* presentó una mayor acumulación de lípidos al ser cultivada en ARC, lo cual fue superior al de las especies *C. vulgaris* y *A. maxima*. El incremento de biomasa está directamente relacionado con la concentración de nutrimentos, pero no con la

organisms a greater amount of biodiesel would be obtained by performing RWW cultures, where there is a heterotrophic growth leading to lipid accumulation (Table 4). For EM, the amount of biodiesel would be 34 % lower than in RWW due to the fact that the growth of microorganisms is autotrophic (without stress), so that lipid accumulation is lower (Zhou *et al.*, 2012). The lowest amount of biodiesel would be obtained by TWW cultures (low carbon content), which is the medium with the lowest concentration of nutrients (Table 2). From cultures of *S. acutus* in RWW, the best production of biodiesel (244.57 mg L^{-1}) would be achieved, proving to be a suitable feedstock for this purpose (Table 4).

CONCLUSIONS

The growth rate, nutrient removal and ability to accumulate lipids between the microalgae and cyanobacteria studied were different. In the same time span, the cultures of *C. vulgaris*, *S. acutus* and *A. maxima* in raw wastewater (RWW) showed better results in the biomass increase and nutrient removal than in the enriched water, whereby the use of RWW as a medium to culture these species is more economically viable. Also, the microalga *S. acutus* showed a higher lipid accumulation when cultured in RWW, which was higher than the species *C. vulgaris* and *A. maxima*. The biomass increase is directly related to the nutrient concentration, but not with the concentration of the lipids in microorganisms analyzed.

Cuadro 4. Cálculo teórico de producción de biodiésel a partir de los tres microorganismos cultivados en los tres medios (ARC, ART y AE).

Table 4. Theoretical calculation of biodiesel production from the three microorganisms cultured in the three media (RWW, TWW and EM).

	<i>C. vulgaris</i>			<i>S. acutus</i>			<i>A. maxima</i>		
	ARC	ART	AE	ARC	ART	AE	ARC	ART	AE
Lípidos (mg L^{-1})	218.65	86.89	124.62	278.87	96.67	196.69	124.71	51.66	99.63
Biodiésel (mg L^{-1})	191.76	76.20	109.29	244.57	84.78	172.50	109.37	45.31	87.37
Productividad de biodiésel ($\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$)	13.69	5.44	7.81	15.29	5.30	10.78	7.81	3.24	6.24

ARC: agua residual cruda (después de un tratamiento de cribado y sedimentación); ART: agua residual tratada mediante un sistema de lodos activados; AE: medio enriquecido con nutrientes ❖ RWW: raw wastewater (after a treatment of screening and sedimentation); TWW: treated wastewater by an activated sludge system, EM: nutrient-enriched medium.

concentración de los lípidos en los microorganismos analizados.

Los cálculos teóricos indican que la mayor producción de biodiésel se puede alcanzar en los cultivos con ARC (para los tres microorganismos) y *S. acutus* tiene el valor más elevado.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo recibido a través de los proyectos: PAPIIT IT103312, PAIP 4194-14 y FQ-10-008, para la realización de este trabajo, así como por la beca recibida por uno de ellos (MSA) para realizar sus estudios de Maestría en Ingeniería Ambiental en el Posgrado de Ingeniería de la UNAM. Asimismo, se hace patente el apoyo proporcionado por el Dr. Eberto Novelo del Laboratorio de Algas Continentales, Ecología y Taxonomía de la Facultad de Ciencias de la UNAM, por la donación de la cepa de la cianobacteria utilizada en este trabajo. Finalmente, se agradece al Dr. Javier Cruz y al M.C. Luciano Hernández de la Facultad de Química de la UNAM, por su valiosa asistencia técnica.

LITERATURA CITADA

Al-Thani, R. F., and M. Potts. 2012. Cyanobacteria, oil and cyanofuel. In: Whitton, B. A. (ed). Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time, Springer. pp: 427-440.

Antoni, D., V. V. Zverlov, and W. H. Schwarz. 2007. Biofuels from microbes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 77: 23-35.

APHA, American Public Health Association. 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. USA, 21 edición. 1368 p.

Bai, R., M. T. Gutierrez-Wing, I. I. Negulescu, and K. A. Rusch. 2014. Effect of organic carbon, C: N ratio and light on the growth and lipid productivity of microalgae/cyanobacteria coculture. Eng. Life Sci. 14: 47-56.

Chen, C. Y., K. L. Yeh, R. Aisyah, D. J. Lee, and J. S. Chang. 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. Bioresource Technol. 102: 71-81.

Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. Biotechnol. Advan. 25: 294-306.

Crutzen, P. J., A. R. Mosier, K. A. Smith, and W. Winiwarter. 2008. N₂O release from agrobiofuel production negates global warming reduction by replacing fossil fuels. Atmospheric Chem. Physics Discuss. 8: 389-395.

Divakaran, R., and V. N. Pillai. 2002. Flocculation of algae using chitosan. J. Appl. Phycol. 14: 419-422.

Doria, E., P. Longoni, L. Scibilia, N. Iazzi, R. Cella, and E. Nielsen. 2012. Isolation and characterization of a *Scenedesmus acutus* strain to be used for bioremediation of urban wastewater. J. Appl. Phycol. 24: 375-383.

Dumont, H. J., S. S. Sarma, and A. J. Ali. 1995. Laboratory studies on the population dynamics of *Anuraeopsis fissa*

Theoretical calculations indicate that the increased production of biodiesel can be achieved in cultures with RWW (for the three microorganisms) and *S. acutus* has the highest value.

—End of the English version—



(Rotifera) in relation to food density. Freshwater Biol. 33: 39-46.

Feng, Y., C. Li, and D. Zhang. 2011. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. Bioresource Technol. 102: 101-105.

Flynn, K. J., J. A. Raven, T. Alwyn, V. Rees, Z. Finkel, A. Quigg, and J. Beardall. 2010. Is the growth rate hypothesis applicable to microalgae? J. Phycol. 46: 1-12.

Gong, Y., and M. Jiang. 2011. Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel. Biotechnol. Lett. 33: 1269-1284.

Gouveia, L., and A. C. Oliveira. 2009. Microalgae as a raw material for biofuels production. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36: 269-274.

Griffiths, M. J., and S. T. Harrison. 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. J. Appl. Phycol. 21: 493-507.

He, P. J., B. Mao, C. M. Shen, L. M. Shao, D. J. Lee, and J. S. Chang. 2013. Cultivation of *Chlorella vulgaris* on wastewater containing high levels of ammonia for biodiesel production. Biores. Technol. 129: 177-181.

Jensen, J. P., E. Jeppesen, K. Orlík, and P. Kristensen. 1994. Impact of nutrients and physical factors on the shift from cyanobacterial to chlorophyte dominance in shallow Danish lakes. Can. J. Fish. Aquatic Sci. 51: 1692-1699.

Kim, M. K., J. W. Park, C. S. Park, S. J. Kim, K. H. Jeune, M. U. Chang, and J. Acreman. 2007. Enhanced production of *Scenedesmus* spp. (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater. Biores. Technol. 98: 2220-2228.

Krebs, C. J. 1985. Ecology: The Experimental Analysis of Distribution and Abundance. 3rd edition, Harper and Row, New York.

Lau, P. S., N. F. Tam, and Y. S. Wong. 1995. Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater. Environ. Poll. 89: 59-66.

Mansour, M. P., D. M. Frampton, P. D. Nichols, J. K. Volkman, and S. I. Blackburn. 2005. Lipid and fatty acid yield of nine stationary-phase microalgae: applications and unusual C24-C28 polyunsaturated fatty acids. J. Appl. Phycol. 17: 287-300.

Moazami, N., R. Ranjbar, A. Ashori, M. Tangestani, and A. S. Nejad. 2011. Biomass and lipid productivities of marine microalgae isolated from the Persian Gulf and the Qeshm Island. Biomass Bioener. 35: 1935-1939.

Ogawa, T., and S. Aiba. 1981. Bioenergetic analysis of mixotrophic growth in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*. Biotechnol. Bioeng. 23: 1121-1132.

- Park, J. B. K., R. J. Craggs, and A. N. Shilton. 2011. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technol.* 102: 35-42.
- Rawat, I., R. Ranjith K., T. Mutanda, and F. Bux. 2011. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Appl. Energy* 88: 3411-3424.
- Reynolds, C. S. 1988. Functional morphology and adaptive strategies of freshwater phytoplankton. *In: Sandgren, C. D. (ed). Growth and Reproductive Strategies of Freshwater Phytoplankton.* Cambridge University Press, Cambridge. pp: 388-433.
- Rodolfi, L., G. Chini Z., N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini, and M. R. Tredici. 2009. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 102: 100-112.
- Sacristán, M., V. M. Luna-Pabello, E. Cadena, and E. Ortíz. 2013. Green microalga *Scenedesmus acutus* grown on municipal wastewater to couple nutrient removal with lipid accumulation for biodiesel production. *Bioresource Technol.* 146: 744-748.
- Shamala, T. R., F. Drawert, and G. Leupold. 1982. Studies on *Scenedesmus acutus* growth. I effect of autotrophic and mixotrophic conditions on the growth of *Scenedesmus acutus*. *Biotechnol. Bioeng.* 24: 1287-1299.
- SENER, Secretaría de Energía. 2013. Estrategia nacional de energía 2013-2027. México, D.F.
- Sydney, E. B., T. E. da Silva, A. Tokarski, A. C. Novak, J. C. de Carvalho, A. L. Woiciechowski, C. Larroche, and C. R. Soccol. 2011. Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. *Appl. Energy* 88: 3291-3294.
- Trainor, F. R., and G. M. Wilmes. 1994. Using commercial fertilizers as algal media. *The Am. Biol. Teacher* 56: 361-363.
- Verma, N. M., S. Mehrotra, A. Shukla, and B. N. Mishra. 2010. Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories: A comprehensive discussion. *Afr. J. Biotechnol.* 9: 1402-1411.
- Vonshak, A. 2003. Spirulina: growth, physiology and biochemistry. *In: Vonshak, A. (ed). Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-Biology and Biotechnology.* London: Taylor & Francis. pp: 43-65.
- Zah, R., H. Böni, M. Gauch, R. Hischer, M. Lehmann, and P. Wäger, 2007. Life cycle assessment of energy products: environmental assessment of biofuels. EMPA, Technology and Society Lab.
- Zhou, W., M. Min, Y. Li, B. Hu, X. Ma, Y. Cheng, Y. Liu, P. Chen, and R. Ruan. 2012. A hetero-photoautotrophic two-stage cultivation process to improve wastewater nutrient removal and enhance algal lipid accumulation. *Bioresource Technol.* 110: 448-455.