



Universidad de Oviedo
Programa de Doctorado en Biogeociencias

Tesis doctoral

Valoración de Microalgas
para el tratamiento de lixiviados permeados
generados a partir de Residuos Sólidos Urbanos (RSU)



Manuel Camilo Pardo Castillo
Oviedo, 2020



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Valoración de Microalgas para el tratamiento de lixiviados permeados generados a partir de Residuos Sólidos Urbanos (RSU)	Inglés: Microalgal assesment for the treatment of landfill leachate generated from Municipal Solid Waste (MSW)
2.- Autor	
Nombre: MANUEL CAMILO PARDO CASTILLO	DNI/Pasaporte/NIE: /
Programa de Doctorado: BIOGEOCIENCIAS	
Órgano responsable: CENTRO INTERNACIONAL DE POSGRADO	

RESUMEN (en español)

En las últimas décadas, el incremento en la industrialización ha traído consigo el aumento, a nivel mundial, de población, cuya búsqueda de nuevas áreas geográficas para asentarse, a acelerado a su vez, los procesos de urbanización a escala global. Esto ha derivado en la sobreexplotación de los recursos no renovables como el suelo o el agua y en el crecimiento de la producción de residuos. Gracias a esto, los gobiernos se han visto en la obligación de gestionar el manejo de dichos residuos buscando alternativas que generen el menor impacto ambiental. Las plantas de tratamiento de residuos sólidos surgen como alternativa para la recolección, disposición y tratamiento de los vertidos que dichos residuos generan convirtiéndose en lixiviados. Esta técnica es ampliamente usada por su bajo coste y el escaso personal especializado necesario. Sin embargo, el lixiviado producido es considerado un problema ambiental grave sin el debido tratamiento, ya que puede contaminar aguas superficiales y subterráneas, mientras que los gases producidos por la degradación de estos residuos, principalmente como metano y dióxido de carbono, los cuales, sin el control adecuado, pueden agravar la problemática ambiental.

Al norte de España, en la comunidad del principado de Asturias, se encuentra la planta de residuos COGERSA, esta planta es la encargada de la recolección de basuras, de 78 municipalidades, para su depósito y tratamiento manejando en promedio 360.000 toneladas de residuos mezclados para su tratamiento y llegar a generar más de 200.000 metros cúbicos de lixiviado. Teniendo en cuenta el incremento en la producción de residuos y por consiguiente la generación de gases durante su tratamiento, la planta llevó a cabo un proyecto I+D+i entre 2014 y 2017 en el marco del Programa Estatal de I+D+i de 2014 nombrado ReCO₂very, donde el tema principal fue la reducción de emisiones de CO₂ generadas por la planta, su recuperación y dirección al cultivo de microalgas para la producción de biomasa con fines energéticos. Así, la planta de residuos apostó por una economía circular y así responder a los nuevos retos con los que se enfrentan las industrias europeas dedicadas a esta labor durante los próximos años debido a que la Unión Europea se ha comprometido a reducir la emisión de gases hasta en un 80% para 2050 y el uso de energías más limpias para 2030. Como complemento, ReCO₂very gestionó el aprovechamiento de los lixiviados generados por la descomposición de los residuos sólidos como única fuente de nutrientes ya que luego de ser depurado, el lixiviado presenta altas concentraciones de nutrientes nitrógeno, fosforo y otros elementos que pueden ser usados por las microalgas para su crecimiento.

El objetivo de la presente tesis es la valoración de las microalgas nativas del vertedero en términos del tratamiento de lixiviados procedentes de residuos sólidos urbanos (RSU). Para ello, se realizó una descripción general de la planta de residuos teniendo en cuenta el funcionamiento, almacenamiento y tratamiento de los lixiviados, morfometría de las charcas o estanques estacional y permanentes y finalmente una caracterización de la comunidad fitoplanctónica presente. Teniendo la identificación por claves taxonómicas de las diferentes especies, se hicieron aislamientos de colonias en medios microbiológicos generalistas para luego tomar muestras para su identificación por técnicas moleculares. Las cepas identificadas fueron: *Desmodesmus* sp., *Coelastrella* sp. 1 y sp. 2, *Tetracystis* sp., *Chlamydomonas* sp. *Acutodesmus obliquus* y *Chlorella* sp. Se realizaron ensayos para determinar el crecimiento y remoción de nutrientes en diferentes concentraciones de lixiviado durante 96 h. Tres tipos de



respuesta fueron obtenidos: Sin crecimiento (dos cepas), crecimiento hasta un 10% de lixiviado (tres cepas) y crecimiento hasta un 50% de lixiviado (dos cepas). Luego, durante 18 días se realizó una evaluación de la producción de clorofila *a*, β -carotenoides, lípidos totales y perfil de ácidos grasos, y así con los resultados obtenidos más lo determinado por su capacidad de crecimiento y remoción de nutrientes, analizar que especies pueden ser importantes en la fitorremediación del lixiviado para generar biomasa con fines energéticos u otras aplicaciones biotecnológicas. Por último, se llevó a cabo una mejora en el esquema de producción de biomasa de *Nannochloropsis gaditana* en colaboración con la empresa asturiana ALGATEK S.L., para aumentar el contenido de ácidos grasos polinsaturados. Teniendo como resultados, no solo el mejoramiento del cultivo en dicha producción sino además la aplicación de las técnicas utilizadas a lo largo de esta tesis doctoral para el desarrollo de protocolos de inoculación, mantenimiento a escala laboratorio y su producción a escala industrial estableciendo de manera general algunos costos de dicha producción para así determinar el valor económico de la biomasa en el mercado.

RESUMEN (en Inglés)

In recent decades, the increased industrialization has brought with it a worldwide increase in population, whose search for new geographical areas to settle has, in turn, accelerated urbanization processes on a global scale. This has led to the overexploitation of non-renewable resources such as soil and water and to the growth of waste production. Thanks to this, governments have been forced to manage the management of such waste, seeking alternatives that generate the least environmental impact. Solid waste treatment plants have emerged as an alternative for the collection, disposal and treatment of the waste generated by these plants, which are converted into leachates. This technique is widely used because of its low cost and the scarce specialized personnel needed. However, the leachate produced is considered a serious environmental problem without proper treatment, since it can contaminate surface and ground waters, while the gases produced by the degradation of these wastes, mainly as methane and carbon dioxide, which, without proper control, can aggravate the environmental problem. In the north of Spain, in the community of the Principality of Asturias, is the waste plant COGERSA, this plant is responsible for the collection of waste, from 78 municipalities, for deposit and treatment handling an average of 360,000 tons of mixed waste for treatment and get to generate more than 200,000 cubic meters of leachate.

Taking into account the increase in the production of waste and consequently the generation of gases during its treatment, the plant carried out an R+D+i project between 2014 and 2017 within the framework of the 2014 State R+D+i Program named ReCO2very, where the main topic was the reduction of CO₂ emissions generated by the plant, its recovery and direction to the cultivation of microalgae for the production of biomass for energy purposes. Thus, the waste plant opted for a circular economy and thus respond to the new challenges facing European industries dedicated to this work over the coming years due to the European Union's commitment to reduce gas emissions by up to 80% by 2050 and the use of cleaner energy by 2030. As a complement, ReCO2very managed the use of the leachate generated by the decomposition of solid waste as the only source of nutrients since, after being treated, the leachate presents high concentrations of nitrogen, phosphorus and other elements that can be used by the microalgae for their growth.

The objective of this thesis is the valuation of the landfill's native microalgae in terms of leachate treatment from municipal solid waste (MSW). To this end, a general description of the waste plant was made taking into account the operation, storage and treatment of the leachates, the morphometry of the seasonal and permanent ponds and finally a characterization of the phytoplankton community present. Having the identification by taxonomic keys of the different species, colonies were isolated in general microbiological media and then samples were taken for identification by molecular techniques. The strains identified were: *Desmodesmus* sp., *Coelastrella* sp. 1 and sp. 2, *Tetracystis* sp., *Chlamydomonas* sp. *Acutodesmus obliquus* and *Chlorella* sp. Tests were carried out to determine the growth and removal of nutrients in different concentrations of leachate during 96 h. Three types of response were obtained: No growth (two strains), growth up to 10% leachate (three strains) and growth up to 50% leachate (two strains). Then, during 18 days, an evaluation of chlorophyll production was carried out at β -carotenoids, total lipids and fatty acid profile, and thus with the results obtained, plus what was determined by its capacity of growth and removal of nutrients, to analyze which species can be important in the phytoremediation of leachate to generate biomass for energy or other biotechnological applications. Finally, an improvement in the



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

biomass production scheme of *Nannochloropsis gaditana* was carried out in collaboration with the Asturian company ALGATEK S.L., to increase the polyunsaturated fatty acid content. Having as results, not only the improvement of the crop in this production but also the application of the techniques used throughout this doctoral thesis for the development of protocols of inoculation, maintenance at laboratory scale and its production at industrial scale establishing in a general way some costs of this production in order to determine the economic value of the biomass in the market.

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
EN BIOGEOCIENCIAS**



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

Departamento de Biología de Organismos y Sistemas
Programa de doctorado en Biogeociencias

Valoración de Microalgas para el tratamiento de lixiviados permeados
generados a partir de Residuos Sólidos Urbanos (RSU)

Microalgal assessment for the treatment of landfill leachate generated from
Municipal Solid Waste (MSW)

Tesis Doctoral
Manuel Camilo Pardo Castillo

Director: José Manuel Rico Ordas

Oviedo, 2020

... hasta el infinito y más allá!!!

“No dejes de aprender porqué,
la vida nunca deja de enseñar”

Anónimo

Esta tesis fue financiada por el proyecto Retos-Colaboración 2014 del ministerio de Economía y Competitividad, en el marco del Programa Estatal de I+D+i ReCO₂very, la coordinación del proyecto llevada a cabo por la planta de tratamiento de residuos COGERSA y desarrollada por el área de Ecología y conservación del departamento de Biología de Organismos y Sistemas de la Universidad de Oviedo. Igualmente, a través de la Fundación Universidad de Oviedo por la contratación como técnico de laboratorio en la fase final de esta tesis.



AGRADECIMIENTOS

Antes que nada, considero importante destacar el papel de José Manuel Rico que, como tutor de este proyecto, ha sido un apoyo en este camino y ha prestado especial cuidado a que no perdiese de vista los elementos más singulares y desafiantes.

También, considero importante mencionar el papel que la Empresa Algatek ha tenido como espacio para que parte de esta investigación fuese posible, su confianza fue fundamental para la culminación de este trabajo.

Quiero agradecer a la vida y al “combo poderoso” (amigos y familiares que se encuentran ya en el infinito) por ser una inspiración en este camino, las cosas buenas y las no tan buenas que traen toda nueva experiencia. Doy gracias a toda la familia (padres, hermana, sobrinos, cuñado, tía, etc) que siempre han estado, están y estarán sin importar el momento, apoyando especialmente en lo que ha sido este vertiginoso viaje y en general durante todo mi recorrido. Estoy seguro que para todos ellos la conclusión de este camino, es una pequeña retribución por todo lo que me han aportado. ¡Gracias!

Estos cinco años, habrían sido aún más difíciles sin la compañía permanente de la “pipol” amigos que han estado ahí, sin importar la distancia, a veces más, a veces menos, sin importar los momentos. A David, entre llamadas, videollamadas y mensajes contándonos la vida y como “arreglar” la situación política del país entre cervezas y risas. A Mario y Michael hablando cantidades de cosas de “insuperación” personal, nada mal para subir los ánimos a base de esos momentos de distensión, gracias por todo muchachos, así fuese a la distancia, siempre los sentí a mi lado. A Camila, por sus malas caras y por su disponibilidad, aunque a veces parecieras perdida, me ayudaste más de lo crees, “se le sigue queriendo mucho”. La flaca y viejo Pipe, a pesar que no hablamos mucho, sabemos que estamos para lo que sea y me alegro mucho de haberlos conocido. Y como olvidarme de Mauricio (Roland), hijo

usted fue mi impulso en los momentos más difíciles y donde quiera que esté agradezco su presencia mi hermano ¡en mi corazón siempre!

Al combo mundialista, Gustavo y Alexandra (que buen mundial no joodaaa), dos mundos diferentes, entre los excelentes, nostálgicos y los no muy gratos momentos, que buenas charlas hemos tenido. Muchas gracias a ustedes, a veces una charla sincera y con llamada de atención siempre se necesitará, ustedes saben que los aprecio mucho. A Margarita, a pesar de todo lo abuelita que por momentos puedas ser (te lo dice un abuelo) me ayudaste y ayudas montones, aprecio mucho tus continuos llamados de atención. Un pedazo de ti está en todo este documento y debo agradecerte por todo el apoyo y nuestras charlas arreglando el país, te quiero mucho y espero que nos veamos muy pronto. A Adri, independientemente del corto tiempo que transitamos el mismo camino y a pesar que andamos en mundos diferentes, cuando hablamos, el mundo se me olvida escuchándote y gracias a esas charlas, este recorrido se hizo más llevadero, te quiero montones y ya pronto nos veremos de nuevo, a ver si el camino vuelve y nos reúne. Juli, lo que te quiero (creas o no oportuno) es muy grande, tu estuviste al inicio (Australia-España) de este gran viaje que llega a su final (España-Colombia y quizás Guyana), buenos viajes, buenas experiencias, buenas chelas, buenos guarilacos, bueno todo, gracias por ser la persona que eres, el polo a tierra que de vez en cuando me hace falta. Alejandra, desde las prácticas de laboratorio de la universidad como monitores, has sido una persona increíble, me alegro mucho de conocerte y espero que seas de las primeras personas en encontrar a mi regreso.

Como olvidar al “BOS people”, chicos me encantó haberlos conocido a todos ustedes, Deiviii (Maricarmen) con nuestras ideas “algólogas” y escuchando sobre tus historias, me hiciste la tarde más de un día. Los sufrimientos por la tesis de Robertiña du Porto, nos divertimos viviendo juntos y en el laboratorio unidos por las algas “hasta que la muerte nos separe”, y Viejo Axa, buenas chelas, buen pulpo y buen ejercicio, siempre una buena combinación (espero su visita en el trópico). Isa con sus historias

“pájarolocas”, una vasca loca y muy querida, cuando viajes de nuevo a mis dominios, ya nos veremos para que conozcas la geografía colombiana. A Sonia por su sarcasmo y buena vibra, Anaiiiiis hermosa, gracias por escuchar tanta tontería en el BOS como en Microbiología, eres de las mejores cosas que me llevo en mi regreso, en las buenas y malas, independiente de la distancia, espero sepas que puedes contar conmigo siempre. A Sara, a pesar de que nos conocimos después de un año (viéndonos casi a diario para comer pero sin saber cómo fue que nos hablamos la primera vez), te considero una persona muy especial, cuanta conmigo siempre, te llevo en el corazón. A toda la gente de Canarias (ULPGC), ha sido un gusto conocerlos, un buen máster, gente grandiosa, muy inteligente y muy buena compañía en el tiempo libre.

Este apartado especial de los agradecimientos, lo quiero dedicar a una persona muy especial en mi vida y en este camino que fue mi vida en España. Esta persona vio el inicio, vivió el durante y en la distancia y con intermitencias, el final. Siempre me acompañó con sus risas, mal genio, cariño, impaciencia, locura, y muchas otras cosas muy valiosas. Esta persona acompañó el proceso de principio a fin, de tanto estudio, verla siempre fue una inyección de energía impresionante, quizás no fue lo suficientemente evidente pero siempre renovaba mi amor por ella. Independiente del final, de todo lo que está escrito aquí, tuviste mucho que ver y las palabras quizás se queden cortas, pero, lo que si no será suficiente es lo infinitamente feliz que me hace haber vivido contigo, que seas una parte tan importante de mi vida y haberme permitido hacer parte de su familia. Ayer, hoy y siempre, Nasly T., hasta el infinito y más allá.

Tabla de Contenido

Capítulo 1

Introducción general	5
----------------------	---

Capítulo 2

Caracterización de la comunidad fitoplanctónica en un sistema de tratamiento de vertidos sólidos urbanos: Aislamiento y selección de cepas	18
--	----

Capítulo 3

Crecimiento y remoción de nutrientes a partir de cepas microalgales nativas en lixiviado pretratado de Residuos Sólidos Urbanos (RSU).	34
--	----

Capítulo 4

Producción de lípidos y perfil lipídico de microalgas nativas en lixiviado pretratado	56
---	----

Capítulo 5

Diseño y mejoramiento en la producción de lípidos de <i>Nannochloropsis gaditana</i> a gran escala: del laboratorio a la empresa	80
--	----

Capítulo 6

Discusión general	100
-------------------	-----

Capítulo 7

Conclusiones generales	108
------------------------	-----

Capítulo 8

Bibliografía	111
--------------	-----

Capítulo 1

Introducción general

Las microalgas son organismos fotosintéticos de gran diversidad representados en su mayoría por eucariotas, sumando esto a la variedad de hábitats en que se encuentran y su capacidad de crecimiento autotrófico, ofrecen la oportunidad de explotación a nivel comercial de manera fácil y rentable, siendo esto estudiado en las últimas décadas (Metsoviti et al. 2019; Gangl et al., 2015).

El primer cultivo unialgal fue desarrollado cerca de 1890, con *Chlorella vulgaris* y su estudio fisiológico a partir de 1900 (Borowitzka, 1999). Su cultivo en masa se desarrolló al final de los años 40, comenzando en Estados Unidos, Alemania y Japón, luego en la década de los 60, Japón dio los primeros pasos para un cultivo comercial de gran escala con *Chlorella*, en 1970 empezaron a cultivar *Spirulina* en México y entre 1977 y 1980 se llegaron a establecer cerca de 46 empresas productoras de *Spirulina* en Asia que alcanzaron a generar hasta 1 000 kg de biomasa mensualmente (Borowitzka, 1999). La amplia tolerancia a cambios de temperatura, salinidad, valores de pH e intensidades lumínicas hace de estos organismos una fuente de carbono importante en la producción de biocombustibles. Adicionalmente, la generación de azúcares, pigmentos, proteínas, vitaminas y metabolitos secundarios (Fig. 1.1) pueden llegar a tener un gran valor comercial en la elaboración de productos naturales y la industria cosmética como farmacéutica (Khan et al. 2018).

De casi 50 000 especies existentes, aproximadamente 30 000 han llegado a ser estudiadas, haciendo énfasis principalmente en sus condiciones y formas de cultivarse (Varfolomeev y Wasserman, 2011). Parámetros como la salinidad (12-40 g l⁻¹), fluctuaciones de pH (4-11), variación de la temperatura (16-27 °C) e intensidades lumínicas (1 000-10 000 flujo de fotones) han sido reportados de forma extensiva. Ya teniendo establecidas las variables básicas de cultivo, se han desarrollado procesos para un crecimiento de tipo *batch* o discontinuo, semi-continuo y continuo, que están directamente relacionados con un sistema de producción ya sea abierto (tipo *raceway*) o cerrado (biorreactores). Dicha relación entre los parámetros de cultivo y los

sistemas de producción hace que exista una continua búsqueda de mayor rentabilidad, menor costo y alta reproducibilidad en general (Grubišić et al. 2019)

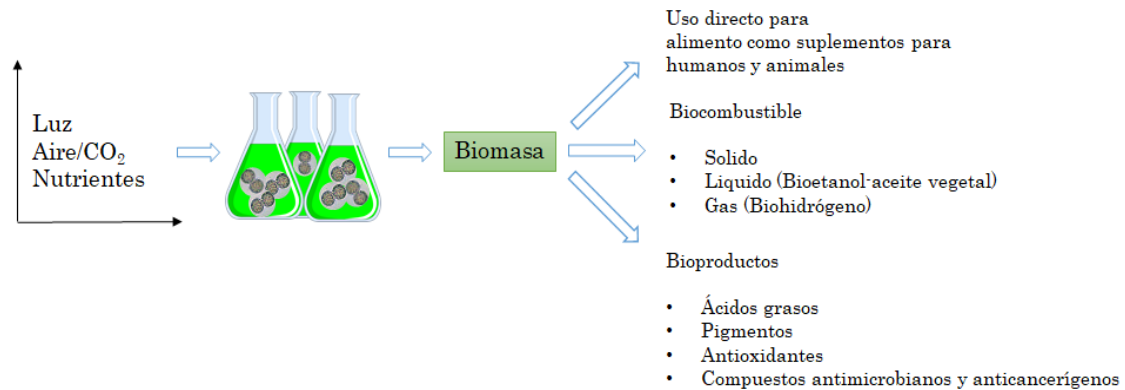


Figura 1.1 Condiciones y usos generales en la producción de microalgas

Microalgas en el mundo

Alrededor del mundo, la producción comercial de microalgas está concentrada en cuatro grupos taxonómicos (Tabla 1.1) (Chacón-Lee y González-Mariño, 2010). Una línea de producción básica está constituida por aislamientos en tubos de ensayo o placas de Petri tenidos en un cepario, seguido de un escalado en diferentes volúmenes (0,01-100 L) para finalmente llegar a gran escala ya sea en biorreactores, fotobiorreactores, tanques o *raceways* (≥ 1000 L).

Dependiendo del sistema de producción y parámetros como las variables fisicoquímicas y biológicas del cultivo, el intercambio de gases, riesgos de contaminación y mantenimiento de las instalaciones, la producción y calidad de la biomasa, entre otros factores llegan a afectar a los cultivos en general (Tabla 1.2), sin embargo se ha visto que la generación de biomasa de los géneros *Chlorella*, *Spirulina* y *Dunaliella* (Borowitzka, 1999) pueden crecer en ambientes con limitaciones para otros organismos manteniendo un nivel de contaminación básico. No obstante, especies usadas en la acuicultura (*Skeletonema*, *Tetraselmis* o *Isochrysis*), que tienen parámetros más restrictivos, deberían cultivarse en volúmenes mejor controlados (Borowitzka, 1999).

Tabla 1.1 Composición general, en porcentaje, de algunas microalgas usadas a nivel comercial en el mundo. Adaptado de Chacón-Lee y González-Mariño (2010).

<i>Especie</i>	<i>Proteína</i>	<i>Carbohidratos</i>	<i>Lípidos</i>	<i>Productos Aplicaciones</i>
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22	
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2	
<i>Euglena gracilis</i>	29-61	14-18	14-20	Biomasa
<i>Isochrysis galbana</i>	27	17	17	PUFAs
<i>Chlamydomonas rheinhartii.</i>	48	17	21	Pigmentos Cosmética
<i>Scenedesmus sp.</i>	50-56	10-17	12-14	Suplementos nutricionales
<i>Nannochloropsis sp.</i>	29	36	18	Acuicultura
<i>Arthrospira sp.</i>	60-71	13-16	06-11	Nutrición animal y humana
<i>Anabaena sp.</i>	43-56	25-30	4-7	
<i>Synechococcus sp.</i>	43-63	7-14	4-8	
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6	

Otro factor relevante a tener en cuenta es la adición de nutrientes, dependiendo de si la especie es marina o de agua dulce, la composición del medio nutritivo puede variar en baja o alta proporción según sus componentes (macronutrientes y micronutrientes), y puede necesitar complementos como metales, vitaminas o minerales (Andersen, 2005). Estos medios nutritivos se pueden encontrar a través de casas comerciales reconocidas o pueden formularse de manera individual, encontrando una fórmula específica según la especie y producto o aplicación. Sin embargo, en las últimas décadas se han empezado a buscar alternativas que ayuden a mejorar los procesos y cuidar el ambiente, como el reciclaje de agua con adición extra de nutrientes (Fret et al. 2017).

Otra posibilidad es el uso de fuentes hídricas de gran impacto en los ecosistemas acuáticos por su alto contenido de nutrientes y otras sustancias no convencionales como las aguas residuales derivadas de procesos industriales, vertederos de basuras, entre otros; a este tratamiento biológico se le conoce como fitorremediación (Pacheco et al. 2015).

Tabla 1.2. Ventajas y desventajas de la producción de microalgas en sistemas abiertos (tanques y *raceways*) y cerrados (biorreactores y fotobiorreactores). Adaptado de Grubišić et al. (2019).

<i>Parámetro</i>	<i>Sistema abierto</i>	<i>Sistema cerrado</i>
<i>Espacio requerido</i>	Alto	Bajo
<i>Control del proceso</i>	Difícil	Fácil
<i>Control de pérdidas</i>	Muy alto	Bajo
<i>Temperatura</i>	Muy variable	Requiere refrigeración
<i>Dependencia del clima</i>	Alto	Bajo
<i>Calidad de la biomasa</i>	Variable	Reproducibile
<i>Riesgo de contaminación</i>	Alto	Bajo
<i>Escalado</i>	Fácil	Difícil
<i>Limpieza</i>	Baja o ninguna	Alta
<i>Eficiencia de cosecha</i>	Baja	Alta
<i>Costo por cosecha</i>	Alto	Bajo
<i>Mantenimiento</i>	Simple	Complejo
<i>Inversión</i>	Baja	Alta

Microalgas: ¿El futuro verde?

La calidad de vida en las últimas décadas ha comenzado a verse comprometida, condiciones como el cambio climático, enfermedades con resistencia a los antibióticos y la desnutrición son algunos de los desafíos mundiales a combatir; de otra parte, es evidente la existencia de un desequilibrio entre los recursos naturales disponibles y el crecimiento de la población mundial, lo que agrava esta situación (Manirafasha et al. 2019).

Se estima que para el año 2050 las tasas de consumo de diferentes productos alimentarios como la carne se duplique, esto generaría un incremento en la demanda de proteína para la alimentación animal, lo que llevaría a un cambio de uso de la tierra y a un aumento de los niveles de deforestación (Stiles et al. 2018). Estos desequilibrios hacen que los investigadores se interesen por la explotación y gestión de los recursos naturales renovables en donde las algas y algunos de sus productos derivados aporten a la resolución de algunos de estos desafíos mundiales, contribuyendo de esta manera un sostenimiento más amigable.

Estos organismos han emergido como una materia prima potencial en diferentes sectores de la industria, mejorando técnicas convencionales como la silvicultura o la agricultura, obteniendo mayor producción de biomasa por área, mayor fijación de CO₂, mejor capacidad de crecimiento en hábitats no convencionales y la habilidad de producir una gran variedad de productos de alto valor (Posada et al. 2016).

Las microalgas tienen características como su contenido de proteína y minerales, ser fuente de compuestos químicos de gran valor comercial incluyendo pigmentos, ácidos grasos poliinsaturados y vitaminas, además de ser la base para productos con fines cosméticos, farmacéuticos y terapéuticos (Grubišić et al. 2019). Todas estas ventajas crean un ambiente muy optimista acerca del potencial de explotación, de la mano de continua investigación en la búsqueda de mejorar la producción a escala industrial, contribuyendo así a una economía verde y desarrollo sustentable para mejorar el bienestar humano y la calidad de vida (Manirafasha et al. 2019).

Recursos algales de muchas especies con diferente genética, morfología y fisiología confieren la habilidad de producir una gama amplia de compuestos bioactivos derivados como por ejemplo de *Spirulina* sp., *Chlorella* sp., *Anabaena* sp. o *Nostoc* sp. que pueden ser explotados en varias industrias, llegando a producir hasta US\$ 5 billones por año en 2001, incrementándose para 2018 en US\$ 2.5 billones y se espera que para 2022 aumente hasta US\$ 3.3 billones más (Manirafasha et al. 2019).

En comparación a las fuentes de proteína tradicional (carne, huevo, soya y leche), la producción de proteína de microalgas presenta mejores beneficios en términos de productividad y valor nutricional llegándose a obtener entre 4-15 toneladas por hectárea-año, mientras la soya tiene una producción de 0.6-1.2 toneladas por hectárea-año y el trigo 1.1 toneladas por hectárea-año (Bleakley y Hayes, 2017). En el presente, diferentes industrias han llegado a considerar que la biomasa algal es una materia prima sostenible y asequible y, desde este enfoque, han buscado fortalecer alianzas para encontrar soluciones cada vez más eficientes que promuevan el intercambio

mutuo de conocimientos en materia de explotación de este recurso por parte de los centros de investigación y la industria, enfocándolo a un crecimiento ecológico y un desarrollo más sostenible (Manirafasha et al. 2019).

Fitorremediación de aguas residuales

En algunas ocasiones, el desarrollo económico de las regiones va de la mano del crecimiento poblacional, ya que, generalmente, esto último es paralelo a la mejora en la calidad de vida (salud, vivienda, trabajo, alimentación, agua, etc.), sin embargo, esto no siempre es cierto. Sin ser el único caso real, en el norte de África y Oriente Medio la calidad de vida suele estar por debajo del mínimo; lo anterior puede deberse, en parte, a la geografía árida con bajas precipitaciones, que dificulta el acceso al agua para una población que ha aumentado al doble en los últimos 30 años y que se espera se duplique en las siguientes décadas (Abdel-Raouf et al. 2012).

Una de las mayores fuentes de la contaminación del agua reside en la generación descontrolada de residuos por los humanos, haciendo que los países deban invertir masivamente en proyectos con técnicas apropiadas para reestablecer la calidad del agua a niveles adecuados y en formular legislación para regular su descarte en el medio acuático u otros posibles usos. Sin embargo, encontrar una única solución para el tratamiento y su descarga es y será un reto difícil de cumplir, ya que se hace necesaria una ardua labor desde lo técnico y lo económico, siendo el segundo factor el más sensible en muchos casos, obligando a que sean las plantas de tratamiento las elegidas, no solo para determinar la mejor alternativa de tratamiento sino además, para mejorar e innovar en dichos procesos (Abdel-Raouf et al. 2012).

Según el reporte ejecutivo del programa de las Naciones Unidas sobre recursos hídricos (WWAP, 2017), la agricultura, seguida de la industria, son los causantes del 48% de la contaminación del agua. Teniendo en cuenta lo anterior, la organización aspira a reducir el porcentaje de agua residual tratada para 2030 en países muy desarrollados al 15%, de mediano desarrollo entre un 31-36% y de bajo desarrollo hasta un 46%, con respecto a los valores

reportados en 2015 (países muy desarrollados 30%, de medio desarrollo 62-72% y de bajo desarrollo 96%).

El uso de cultivos de algas como opción para el tratamiento biológico de las aguas residuales nació hace 81 años aproximadamente, con cultivos masivos de *Chlorella* y *Dunaliella*; pero el concepto de “biotratamiento” con microalgas, en particular para la producción de biomasa, y la incorporación de nutrientes como el nitrógeno y el fósforo los cuales pueden causar eutrofización, fue descrito por primera vez en Estados Unidos por Oswald y Gotaas (1957) y desde ahí se expandió a distintos países.

Doce años más tarde ya se tenía conocimiento sobre la tolerancia de 60 géneros y 80 especies a la contaminación acuática por compuestos orgánicos, siendo *Euglena*, *Oscillatoria*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Nitzschia*, *Navicula* y *Stigogeoclonium* los géneros con mayor resistencia (Palmer, 1969). Tratamientos de aguas de origen agrícola, industrial, municipal, sintética y lixiviados han sido reportados con distintos tipos de crecimiento y sistemas, duración y remoción de diferentes compuestos y de nutrientes (Tabla 1.3).

Centrándose en el tratamiento del lixiviado como agua residual generada por la degradación de residuos sólidos urbanos (RSU), también conocidos vertederos o rellenos sanitarios, este lixiviado se crea a partir de la descomposición de material orgánico que junto con el agua de lluvia o por escorrentía superficial va filtrándose por el interior del vertedero hasta un sistema de recolección especial para luego ser tratado (Fig. 1.2).

Ya formado el lixiviado, su composición es muy variable, llegándose a encontrar material orgánico disuelto y compuestos refractarios como sustancias fúlvicas y húmicas, componentes inorgánicos entre los cuales se encuentra el potasio, hierro, calcio, amonio o manganeso, metales pesados como el cadmio, plomo y cobre, entre otros, y compuestos xenobióticos derivados de productos de uso doméstico e industrial (Kjeldsen et al. 2002).

Tabla 1.3 Ejemplo de microalgas usadas para el tratamiento de diferentes tipos de aguas residuales (Cheah et al. 2016; Cai et al. 2013; Mustafa et al. 2012).

<i>Agua residual</i>	<i>Género-Especie</i>	<i>Tipo de cultivo</i>	<i>Tiempo de tratamiento</i>
Agro-industrial	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Discontinuo	5 días
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Discontinuo	5-9 días
	<i>Chlorella sorokiniana</i>	Discontinuo	-
	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	Discontinuo	9 días
	<i>Artrospira platensis</i>	Discontinuo	15 días
	<i>Isochrysis sp.</i>	-	-
Municipal	<i>Botryococcus braunii</i>	-	-
	<i>Chlorella minutissima</i>	-	-
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Discontinuo	2-10 días
	<i>Chlorella sorokiniana</i>	Discontinuo	10 días
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Discontinuo	0,2-8 días
	<i>Oscillatoria sp.</i>	Continuo	14 días
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Continuo	14 días
	<i>Euglena sp.</i>	-	-
	<i>Spirogyra sp.</i>	-	-
	Sintética	<i>Chlorella kessleri</i>	Discontinuo
<i>Chlorella vulgaris</i>		Discontinuo	1-10 días
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		Discontinuo	10-30 días
<i>Scenedesmus sp.</i>		Discontinuo	0,2-4,5 días
<i>Isochrysis galbana</i>		Discontinuo	8 días
<i>Scenedesmus sp.</i>		-	-
Lixiviado	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Discontinuo	8 días
	<i>Chlorococcum oviforme</i>	Discontinuo	8 días
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Discontinuo	8 días
	<i>Ankistrodesmus convolutus</i>	Discontinuo	8 días
	<i>Euglena gracilis</i>	Discontinuo	8 días

Las plantas de tratamiento están obligadas por la legislación de cada país, a reducir la concentración de todas estas sustancias al mínimo antes de ser descartadas en los distintos cuerpos de agua (Reyes, 2015); sin embargo, dichos niveles de contaminación siguen siendo superiores.

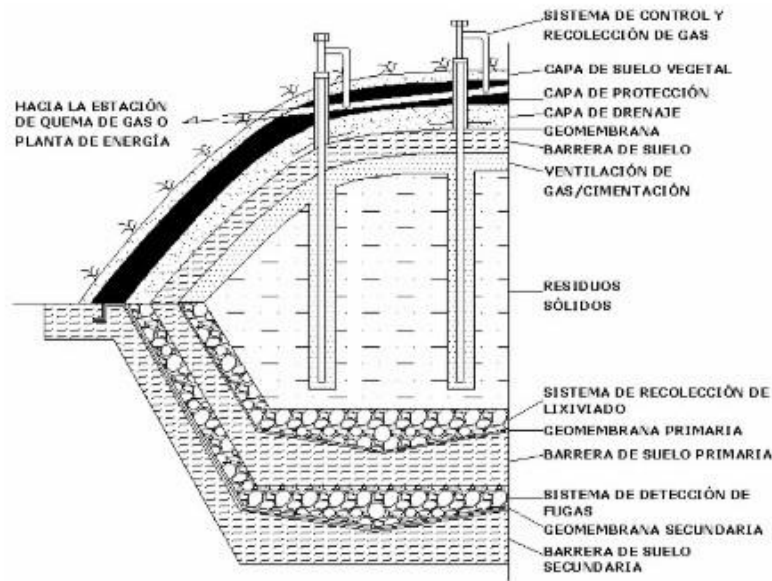


Figura 1.2 Esquema general de un vertedero o relleno sanitario para la formación y recolección de lixiviado. (Reyes, 2015)

Un ejemplo de esto fue estudiado en Francia (Clément et al. 1997), donde la normativa establecía perjudicial para el ambiente sustancias como los hidrocarburos, fenoles, cianuro y metales pesados, pero no se tenían en cuenta los posibles efectos tóxicos de los lixiviados a causa del amoníaco o la eutrofización debido al alto aporte de nitrógeno a los ríos luego de su descarga.

El centro europeo de estadística EUROSTAT ha estimado que entre el 2004 y el 2016, más de la mitad de toda la basura producida en Europa fue reciclada, no obstante, la basura eliminada o dispuesta en vertederos fue superior a 1 000 millones de toneladas durante ese tiempo (https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Waste_statistics/es). En 2016, el mismo centro calculó que más del 45% de toda la basura generada fue transformada en lixiviados y para 2017, España se situaba en el sexto mayor productor de basura de la Unión Europea con más de 21 000 toneladas, y un promedio de 462 Kg de basura generada por persona en ese mismo año.

Si a estas estadísticas se le suma que menos del 1% de los vertederos en España tienen la capacidad de tratar de forma segura todo el lixiviado que genera esta actividad, y que el tipo de suelo en diferentes zonas del país hace que estos efluentes puedan filtrarse con mayor facilidad, se obtiene una alta

probabilidad de contaminación de los diferentes acuíferos que son usados para uso doméstico o para la agricultura (López, 2015).

Lixiviados y microalgas: ¿realidad o ficción?

El uso seguro del agua residual bajo condiciones controladas puede brindar beneficios en diferentes áreas económicas donde históricamente el uso primario ha sido la irrigación. Lo anterior ha desencadenado en una búsqueda continua en el mejoramiento de las tecnologías usadas para el tratamiento de estas aguas, y es aquí donde las microalgas han surgido como alternativa como tratamiento en la reducción de diferentes compuestos (nutrientes, metales y otras sustancias), generándose biomasa útil en la producción de productos de alto interés comercial (WWAP, 2017).

Se ha podido establecer que las microalgas en monocultivo o policultivo pueden actuar como un tratamiento biológico secundario o terciario, lo cual genera oxígeno a partir de la actividad fotosintética, además de la reducción de contaminantes en el agua para ser utilizada en otras actividades y la generación de biomasa (Renuka et al. 2015). De miles de especies de microalgas en la naturaleza, han sido unas cuantas las estudiadas para ser utilizadas como biotratamiento (Stiles et al. 2018).

En lixiviados se ha demostrado la capacidad de reducción en la concentración de nutrientes usando *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Chlamydomonas* sp. o *P. oculatum* (Dogaris et al. 2019; Kumari et al. 2016; Ouaer et al. 2016; Paskuliakova et al. 2016); además de la producción de carbohidratos y lípidos usando *Desmosdesmus* spp., *C. vulgaris* o *S. obliquus* en lixiviado crudo o mezclado con agua residual (Hernández-García et al. 2019; Chang et al. 2018). También, buscando la disminución del uso de agua y de fertilizantes en la producción industrial de microalgas, *Scenedesmus rubescens* y *Chlorella ellipsoidea* fueron cultivadas en lixiviado obteniendo mayor adaptación *S. rubescens* que *C. ellipsoidea*, enfocándose en la producción de biocombustibles (Edmundson y Wilkie, 2013).

Objetivos

Desde el año 2014 hasta 2017, en Asturias (norte de España), se tuvo la oportunidad de llevar a cabo diferentes actividades relacionadas a la identificación de la comunidad fitoplanctónica, aislamiento de cepas microalgales de interés y generación de cultivos a escala de laboratorio para el estudio y seguimiento de la remoción de nutrientes, y de producción de biomasa, pigmentos, carbohidratos y lípidos de microalgas expuestas al lixiviado generado por la planta de tratamiento de residuos sólidos urbanos RSU COGERSA en el marco del proyecto ReCO₂very.

Teniendo en cuenta lo anterior, el principal objetivo de esta tesis es la valoración de las microalgas nativas del sistema de vertidos para el tratamiento de lixiviados de RSU producidos posteriormente a la recolección y procesamiento de la planta depuradora. Este objetivo principal está dividido en cuatro objetivos secundarios, cada uno de los cuales corresponde a cada capítulo de esta tesis, así:

Objetivo 1: Caracterización de la comunidad fitoplanctónica presente en el sistema de recolección y tratamiento de lixiviados: Proyecto ReCO₂very. Para desarrollar este objetivo se describieron los lineamientos y enfoques que tiene el proyecto ReCO₂very, características de la planta de tratamiento, sistema de recolección y por último la toma de muestras a lo largo del vertedero central y en el sistema de depuración previo al tratamiento para la identificación del fitoplancton presente por medio de claves taxonómicas.

Objetivo 2: Valoración de la capacidad de crecimiento y remoción de nutrientes de microalgas nativas para el tratamiento de lixiviado pretratado (LP) de RSU. Teniendo ambas modalidades de identificación, se escogieron aislamientos por medios de cultivo microbiológicos para su posterior crecimiento y mantenimiento controlado a escala de laboratorio. Se diseñaron experimentos con las distintas especies a diferentes concentraciones de LP

como única fuente de nutrientes y ver su respuesta tanto en crecimiento como en el consumo de nitrógeno y fosforo total (NT-PT) por 96 horas.

Objetivo 3: Estudio de la producción de lípidos y perfil lipídico de microalgas nativas como respuesta al tratamiento de LP con fines energéticos. Luego de 18 días de exposición al LP como única fuente de nutrientes, se cosechó la biomasa para su análisis de composición lipídica y ver la capacidad que tuvieron las microalgas estudiadas en variar su conformación dependiendo de las concentraciones del contaminante usadas. Como complemento se llevaron a cabo análisis de nutrientes, de producción de pigmentos y de contenido de carbohidratos totales bajo las mismas condiciones de estrés.

Objetivo 4: Diseño y mejoramiento en la producción de lípidos de *Nannochloropsis gaditana* a gran escala: del laboratorio a la empresa. Este es un objetivo que nació de forma indirecta al desarrollo de esta tesis, teniendo la posibilidad de usar el conocimiento obtenido durante el proyecto y aplicarlo a un caso real de empresa productora de biomasa con fines alimentarios mejorando los protocolos de producción, obtención y medición del producto de interés.

Capítulo 2

Fitoplancton de un sistema de vertidos lixiviados: Tratamiento de residuos sólidos urbanos (RSU), proyecto ReCO₂very y selección de cepas.

INTRODUCCIÓN

El fitoplancton es considerado uno de los grandes productores primarios en medios acuáticos, diferenciándose de las plantas en términos de tamaño y taxonomía; y de las bacterias fotosintéticas por su bioquímica, en la fijación de carbono por unidad de área y variando ampliamente entre ecosistemas hídricos. Estos organismos son fundamentalmente autotróficos, situándose a lo largo de la columna de agua como en el bentos y tienen un tamaño entre 0,2-200 μm (Bellinger y Sigee, 2010). Taxonómicamente, el fitoplancton es estudiado, en general, en seis divisiones cuando se habla de agua dulce, así: *Cyanophyta* (Cianobacterias), *Chlorophyta* (Algas verdes), *Bacillariophyta* (Diatomeas), *Chrysophyta* (Algas doradas), *Cryptophyta* (Algas flageladas) y *Dinophyta* (Dinoflagelados). Adicionalmente, dependiendo de qué tan positiva o negativa sea su relación con diferentes concentraciones de CO_2 , nutrientes, pH, temperatura, entre otros, se pueden caracterizar en distintos ambientes (Huszar y Caraco, 1998).

Hasta el momento, se han hecho reportes en ambientes acuáticos de alta montaña, templados, tropicales y marinos (Sabanci y Koray, 2011; Romo y Villena, 2005; Arauzo y Alvarez Cobelas, 1994 Sánchez-Castillo et al. 1989); sin embargo, ha ido creciendo el interés en las últimas décadas por saber cómo estas comunidades se encuentran o responden en ambientes con alto impacto de contaminación como las aguas residuales (Pastich et al. 2016; Sardi-Saavedra et al. 2016; Pham et al. 2014).

Debido a las condiciones fisicoquímicas particulares de las aguas residuales, especialmente cuando se habla de aguas producidas en plantas de tratamiento RSU (Pitarch et al. 2007), se ha podido establecer la presencia de poblaciones planctónicas allí, pero tanto su diversidad como abundancia llegan a verse alteradas debido al tratamiento que sufren estas aguas conllevando a cambios en las concentraciones de compuestos y sustancias de provecho, pudiéndose volver nocivas para su crecimiento (Pham et al. 2014).

Se han reconocido géneros de algas planctónicas y bentónicas que son usadas como posibles bioindicadores de contaminación orgánica. Por ejemplo, especies de los géneros *Euglena* y *Oscillatoria* (5), *Chlamydomonas* y *Scenedesmus* (4), *Chlorella*, *Nitzschia* y *Navicula* (3), y *Synedra* (2) han llegado a ser valoradas en una escala de 1-5, de menor a mayor tolerancia a la contaminación orgánica en charcas y lagunas poco profundas, ríos, aguas estancadas o de poco movimiento (Palmer, 1969).

Tratamiento de lixiviados: Caso COGERSA

COGERSA es la planta de tratamientos de residuos sólidos urbanos que se encuentra en el principado de Asturias (Norte de España). Esta empresa fue creada en 1982 y entró en operaciones en 1985; inicialmente recibía residuos de 11 municipalidades y en actualidad se han incorporado 78, cubriendo todo el territorio asturiano. Esta planta tiene la capacidad de gestionar residuos peligrosos y no peligrosos desde ese entonces, siendo la encargada de la recolección, separación y tratamiento de las basuras en el territorio asturiano y, del manejo y control del lixiviado que esta produce (Fig. 2.1). Los lixiviados producidos en los vertederos de COGERSA se recogen y almacenan en balsas hasta su tratamiento final. Los lixiviados del vertedero de residuos no peligrosos se almacenan en estanque cubierto, mientras que los de los vertederos de residuos peligrosos se recogen en embalses impermeabilizados con polietileno de alta densidad.



Figura 2.1 Panorámica de la planta de tratamiento RSU COGERSA. Tomado de <https://www.lavozdeasturias.es/noticia/oviedo/2018/06/11/ampliacion-vertedero-residuos-peligrosos-cogersa-costara-907315-euros/00031528728228502139607.htm>

El lixiviado procedente de residuos no peligrosos es el que más se genera en la planta, la empresa cuenta con una depuradora de lixiviados basada en el tratamiento biológico mediante bacterias nitrificantes y desnitrificantes en reactores a presión de 2,5 bar, con una fase posterior de ultrafiltración para separar el efluente de los fangos biológicos. La acción de las bacterias nitrificantes y desnitrificantes permite convertir el amonio presente en los lixiviados en nitrógeno, a la vez que se reduce el contenido de materia orgánica biodegradable. Sin embargo, para una buena depuración es necesaria una proporción adecuada de carbono-nitrógeno-fosforo (C-N-P) y una baja concentración de materia orgánica (< 500 mg/l) respecto a la elevada concentración de amonio (2 g/l aproximadamente), por lo que el personal encargado debe aportar al proceso una fuente de carbono (metanol) que sea fácil de asimilar por las bacterias. El mismo proceso ocurre con las concentraciones de fósforo, siendo el ácido fosfórico el escogido para dicha relación C-N-P adecuada.

Por último, el efluente es pasado por un sistema de ultrafiltración con la idea de retener todo material particulado y microbiológico. Este sistema consta de un sistema de filtros en serie con tamaño de poro de 0,02 μm que se separa el sólido del agua tratada (permeado). Esta agua tratada o lixiviado permeado se mantiene en una balsa en donde es cargado por camiones cisterna y llevado a su destino final, el control de saneamiento en la estación de transferencia de COGERSA para su vertido en el río Nora.

Para el periodo 2006-2016, esta planta llegó a recibir cerca de 4,6 millones de toneladas de residuos no peligrosos dando formación a 2,5 millones de metros cúbicos de lixiviados tratados en la planta depuradora. Si bien es cierto que hay un seguimiento riguroso sobre todo el proceso de tratamiento de lixiviados para cumplir los requisitos establecidos en la autorización de vertido y el plan de vigilancia ambiental aprobados por la Consejería de Medio Ambiente y Desarrollo Rural de Asturias (28-04-2008), este tipo de vertidos no deja de ser una preocupación ya que la cantidad residual tanto de nutrientes como de otras sustancias presentes pueden llegar

a afectar el entorno acuático al no encontrarse normalmente en el medio o aun así siendo bajas sus concentraciones según lo establecido por la normativa vigente, puedan tener efectos considerables en el hábitat.

El proyecto ReCO₂very

El nombre ReCO₂very nació como una idea de recuperar el dióxido de carbono generado por las plantas incineradoras y aprovecharlo para la producción de microalgas (Fig. 2.2). Este proyecto estratégico de I+D+i ejecutado entre 2014 y 2017 en el marco del Programa Estatal de I+D+i orientada a los retos de la sociedad: Retos-Colaboración 2014, generó una alternativa innovadora como integrada para reducir las emisiones de CO₂ y redireccionadas al cultivo de microalgas para la producción de biocarburantes u otras formas de energía.

Por otra parte, este proyecto busca mediar entre una economía más verde y circular, y el reto al que se enfrentan las industrias europeas dedicadas a esta labor durante los próximos años debido a que la Unión Europea se ha comprometido a reducir en un 20% sus emisiones de gases de efecto invernadero antes de 2020 y a la vez estableciendo normas más estrictas con el objetivo de lograr una cuota del 27% de energías más renovables, el 25% en eficiencia energética para 2030 y una reducción de hasta un 80% de emisiones para 2050 (<https://www.cogersa.es/metaspaces/portal/14498/50164>).

ReCO₂very considera a las plantas incineradoras como candidatas óptimas para acoplar procesos de aprovechamiento de los gases generados ya que sus emisiones son estimadas como unas de las más controladas y limpias del espectro industrial. Por otra parte, también pretende demostrar que los gases de una incineradora de residuos pueden ser usados como fuente de alimentación para cultivar microalgas y su posterior utilización para la obtención de energías más limpias, avanzando así hacia una recuperación energética más verde incluyendo estas emisiones en el proceso.

Para abordar estos objetivos, este proyecto se basó en cuatro áreas temáticas: 1. Captación y concentración de CO₂ de gases de chimenea de incineración; 2. Cultivo de microalgas usando los gases de incineración y aprovechamiento de los lixiviados generados en el tratamiento de residuos sólidos; 3. Aprovechamiento de las microalgas; y 4. Diseño del prototipo y estudio de viabilidad industrial.

Igualmente, en el contexto asturiano, se destaca que dicho proyecto engloba varios lineamientos establecidos en el plan estratégico de gestión de residuos 2014-2024 donde se fomenta la I+D+i orientada a la prevención y mejora de la gestión de los residuos y el desarrollo de tecnologías más eficientes y limpias (LA04 y LA22), máximo aprovechamiento de la fracción generada y mínimo vertido (LA08) y la dinamización del sector residuos como sector económico y fomento de empleo verde (LA22).

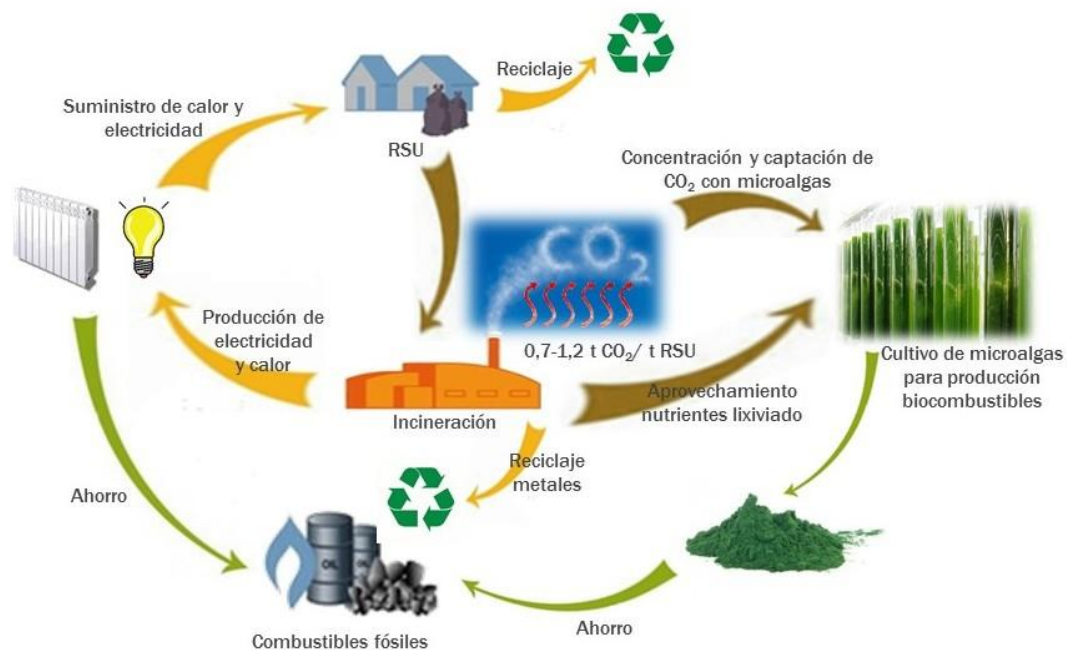


Figura 2.2. Diagrama sobre el aprovechamiento del dióxido de carbono como de los nutrientes presentes en los lixiviados para la generación de biomasa microalgal. Tomado de <https://www.cogersa.es/metaspacesportal/14498/50164>

Microalgas nativas como alternativa al tratamiento de lixiviados

Las instalaciones de la planta de residuos albergan un número determinado de balsas en estanques que intervienen en el proceso de

recolección y depuración de los lixiviados. Por otra parte, la topografía del terreno en el que se depositan los residuos no peligrosos con el paso del tiempo va cambiando y de forma espontánea va formando pequeñas charcas de forma natural y, dependiendo de los niveles de precipitación que haya anualmente, se forman efluentes los cuales van canalizándose hasta el sistema de recolección central.

Estas cualidades han hecho que, a lo largo del tiempo, se den ciertas condiciones para que una comunidad de fitoplancton pueda no solo adaptarse a este ambiente particular, sino que vaya cambiando según las condiciones del clima y las características fisicoquímicas del lixiviado previo a su depuración. Se han descrito diferentes trabajos acerca de las comunidades fitoplanctónicas relacionadas a sistemas de aguas residuales como a tratamientos de lixiviados (Pham et al., 2014; Khattabi et al. 2006; Pereira et al. 2001), donde estos microorganismos han mostrado su potencial como tratamiento biológico de estas aguas. Adicionalmente, la versatilidad de los diferentes grupos taxonómicos presentes y su capacidad de tolerancia y crecimiento bajo esas condiciones particulares se pueden relacionar con las características de los estanques o balsas transitorias por donde es conducido el lixiviado hasta su etapa final de tratamiento.

En particular, COGERSA maneja estanques en concreto sin exposición directa a la luz solar, charcas de poca profundidad expuestas al ambiente, estanques profundos como principal punto de recolección del lixiviado crudo con plástico para evitar filtraciones (Fig. 2.3), además de las distintas características morfométricas propias de cada una siendo: a) profundidad (mayor 0,5 m es profunda), b) área (< 2 m² pequeña, 2-4 m² mediano y > 4 m² grande), c) estacional o permanente a lo largo del tiempo, d) color del agua a la vista (transparente, verde u oscura) e) conexión con el sistema de lixiviados y f) construida o de formación natural (hundimiento en el terreno).

Como medio de control, la planta cuenta con un centro de análisis donde se evalúan los diferentes parámetros a tener en cuenta como control interno y lo exigido por normativa. Estos parámetros son: alcalinidad (Alc),

conductividad (cond), demanda química de oxígeno (BQO), demanda biológica de oxígeno (DBO), pH, oxígeno disuelto (O_2), humedad, materia volátil, sólidos en suspensión totales (SST), sólidos totales (ST), sólidos disueltos totales (SDT), amonio (NH_4), nitratos (NO_3), nitritos (NO_2), fosfatos (P), fluoruros (F^-), cloruros (Cl^-), sulfatos (SO_4^{2-}) y metales, principalmente.



Figura 2.3. Estanques y balsas del sistema de recolección y almacenamiento del lixiviado. Fuente COGERSA.

Para la caracterización del fitoplancton, se seleccionaron 12 charcas al azar teniendo en cuenta las características morfométricas descritas anteriormente. La selección se hizo a lo largo de toda la planta con relación directa o indirecta a la depuración del lixiviado teniendo en cuenta la muestra

nueve fue usada como referencia, ya que es un pequeño río que atraviesa la planta. Las particularidades de las charcas se encuentran descritas en la tabla 2.1. Se tomaron muestras en cada charca y fueron almacenadas en botes de plástico donde parte del volumen fue destinado para el análisis de los parámetros de seguimientos (Tabla 2.2.) por el laboratorio de la depuradora.

Referente al seguimiento de las variables fisicoquímicas, el análisis de pH y alcalinidad fue hecho por un pH-metro estándar y, de forma similar, la conductividad con un conductímetro. Usando un termorreactor y espectrocuantificador NOVA 60, se estimaron metales pesados por medio de espectroscopía de absorción atómica. La concentración de nutrientes fue evaluada por colorimetría con un espectrofotómetro (Lambda 2), mientras que el amonio y los fluoruros fueron estimados con un electrodo de iones selectivos. Finalmente, los niveles de fosfato y sulfato se estimaron con un fotómetro (NOVA 60) y los niveles de cloruros usando un analizador automático.

El resto de muestras fueron fijadas con una solución de Lugol al 10%, y dispuestas en una nevera para su traslado y finalmente guardadas en un refrigerador a 4°C hasta su uso (Fig. 2.4).

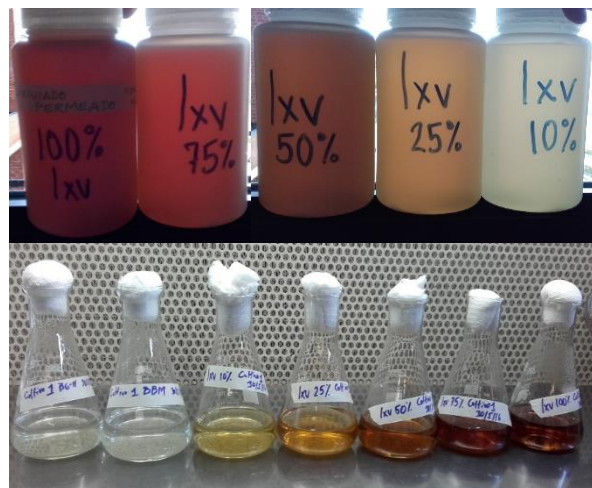


Figura. 2.4 Lixiviado pre-tratado usado durante los diferentes experimentos durante el desarrollo de esta tesis.

Con respecto a los parámetros fisicoquímicos, el grupo A fue el de mayor rango y variación en la mayoría de análisis, incluyendo nutrientes y algunos metales. El mercurio es determinado mensualmente, coincidiendo el presente trabajo en tiempo intermedio, por lo cual la planta proporcionó dichos resultados, los cuales están en el mínimo. La información de este y otros parámetros que analiza COGERSA de manera reglamentaria no fueron usados en este trabajo por políticas de la empresa.

Identificación, cuantificación y diversidad de la población fitoplanctónica

Las poblaciones de fitoplancton fueron cuantificadas usando el método de Utermöl, en el cual se dejan las muestras en columnas de 25 ml durante 24-48 h, quedando contenido el material de interés en cámaras de sedimentación de aproximadamente 3 ml para finalmente ser vistas por microscopía invertida. Las poblaciones se identificaron por medio de claves de identificación (Barrios et al. 2012; Bellinger y Sigee, 2010; Prescott y Prescott, 1978) hasta el nivel taxonómico más bajo posible.

Para determinar una distribución del fitoplancton por las diferentes charcas, se hizo una matriz de los géneros identificados (Tabla 2.3) en las muestras y así ver la relación entre las diferentes charcas por medio de un análisis de escalado multidimensional o MDS (Fig. 2.5). Se calcularon índices ecológicos como la riqueza específica, índice de diversidad de Margalef, diferenciación de charcas con individuos únicos y se hicieron comparaciones entre charcas con géneros o especies únicas y un coeficiente de similaridad de Jaccard para estimar la homogeneidad o heterogeneidad entre las charcas muestreadas (Tabla 2.4).

De 12 charcas seleccionadas, se hicieron 61 identificaciones entre géneros y especies (Fig. 2.4). Los representantes más comunes fueron *Nitzschia*, *Fragilaria*, *Navicula*, *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Oocystis*, *Desmodesmus*, *Chroococcus*, *Oscillatoria*, *Romeria* y *Euglena*. Por otra parte, *Chlamydomonas sp.*, *Navicula sp.*, *Oscillatoria sp.* y *Romeria sp.* fueron las especies con mayor dominancia en las charcas y estanques muestreados. Por último, *Bacillariophyta* y *Chlorophyta* son los únicos grupos que aportaron

especies únicas, además de tener mayor representación en las muestras con 27 y 13 taxones respectivamente.

Tabla 2.3 Diversidad de fitoplancton encontrada en charcas de la planta RSU COGERSA.

Bacillariophyta		
<i>Nitzschia</i> sp.	<i>Melosira</i> sp.	<i>S. ovalis</i>
<i>N. brevissima</i>	<i>Craticula</i> sp.	<i>Diatoma</i> sp.
<i>N. capitata</i>	<i>Navicula</i> sp.	<i>D. vulgare</i>
<i>N. commutata</i>	<i>N. cryptocephala</i>	<i>D. mesodon</i>
<i>N. palea</i>	<i>N. gregaria</i>	<i>Amphora</i> sp.
<i>N. umbonata</i>	<i>N. subtilissima</i>	<i>A. ovalis</i>
<i>Cocconeis</i> sp.	<i>N. tripunctata</i>	<i>Cyclotella</i> sp.
<i>Cymbella</i> sp.	<i>N. affine</i>	
<i>Synedra</i> sp.	<i>Cymatopleura solea</i>	
<i>Fragilaria</i> sp.	<i>Surirella brebissonii</i>	
Chlorophyta		
<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>P. angulosa</i>	<i>Tetrastrum</i> sp.
<i>C. altera</i>	<i>Carteria</i> sp.	<i>Desmodesmus</i> sp.
<i>C. caudata</i>	<i>Chlorella</i> sp.	<i>Monoraphidium</i> sp.
<i>C. ovata</i>	<i>Oocystis</i> sp.	
<i>Pteromonas</i> sp.	<i>Scenedesmus</i> sp.	
Cyanophyta		
<i>Chroococcus</i> sp.	<i>Anabaena</i> sp.	<i>Oscillatoria</i> sp.
<i>Merismopedia</i> sp.	<i>Nodularia</i> sp.	<i>Romeria</i> sp.
Euglenophyta		
<i>Phacus</i> sp.	<i>P. acuminatus</i>	<i>P. longicauda</i>
<i>Euglena</i> sp.		
Charophyta		
<i>Cosmarium</i> sp.	<i>Micrasterias</i> sp.	<i>Spirogyra</i> sp.
<i>Closterium</i> sp.	<i>C. lúnula</i>	<i>C. leibleinii</i>
Ochrophyta		
<i>Mallomonas</i> sp.	<i>Tribonema</i> sp.	
Cryptophyta		
<i>Cryptomonas</i> sp.	<i>C. ovata</i>	
Dinophyta		
<i>Peridinium</i> sp.		

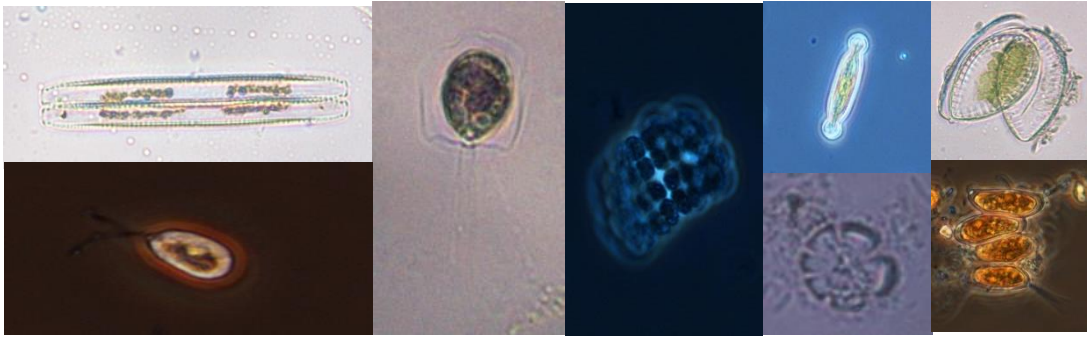


Figura 2.4. Fitoplancton presente en el sistema de recolección y tratamiento de lixiviado de la planta COGERSA.

El análisis MDS (Fig. 2.5) agrupó las distintas charcas en tres grupos: A (Spl 1-2-6-7-8-10), B (Spl 3-5-9-12) y C (Spl 4 y 11). Las charcas del grupo C se diferenciaban del resto principalmente por la presencia de burbujeo continuo, se cree que este burbujeo era metano producido por la degradación de los residuos. En el grupo A se encuentran todas las charcas que hacen parte de la recolección del lixiviado y tenían parámetros como la alcalinidad, conductividad, DQO o amonio muy altos (Tabla 2.4) en comparación a las demás variables fisicoquímicas. Las charcas del grupo B son formaciones que varían dependiendo de la época ya que su ubicación se encontraban en un terreno de poco relieve y en días de altas precipitaciones, dichas charcas pueden verse conectadas.

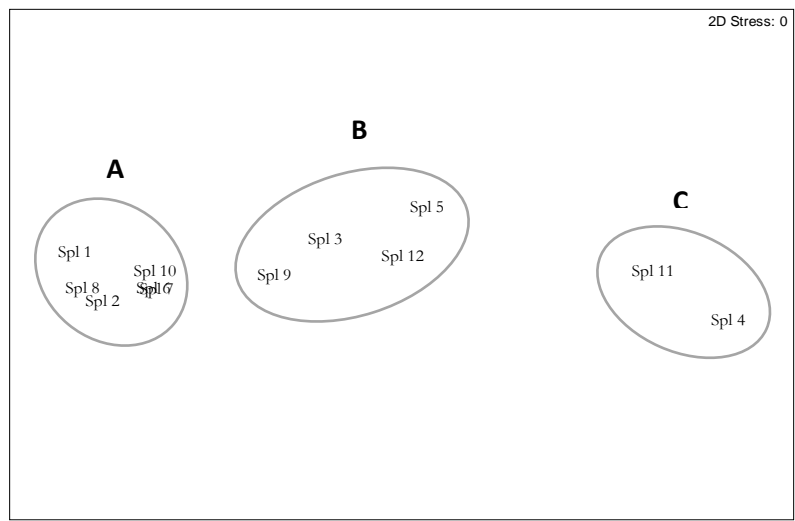


Figura 2.5 Análisis MDS de las charcas teniendo en cuenta la presencia-ausencia de fitoplancton en las charcas.

Respecto a los diferentes índices de diversidad estimados, el grupo C fue el de mayor riqueza específica S, con 27 identificaciones, la diversidad de Margalef y Jack1 (especies entre charcas) fueron mayores también en el grupo C. Por su parte, las charcas que constituyen el grupo A fueron homogéneas en la cantidad de taxones presentes.

Tabla 2.4. Índices ecológicos y densidad celular total (10^4 cel ml^{-1}) de la comunidad fitoplanctónica encontrada en la planta RSU COGERSA.

	GRUPO A						GRUPO B			GRUPO C		
	Spl1	Spl2	Spl6	Spl7	Spl8	Spl10	Spl3	Spl5	Spl9	Spl ₂ ¹¹	Spl4	Spl11
DENSIDAD	0,65	5,8	0,67	2400	0,24	3,8	1300	8,1	2,1	57	8,9	1100
D												
S	4	7	10	10	6	10	17	20	15	19	27	25
D_{Mg}	0,34	0,55	1	0,6	0,6	0,85	1,1	1,7	1,4	1,4	2,3	1,7
JACK 1	4	7	11,7	14,2	6,8	14,2	23,75	24,5	17,25	20,5	35	32
L_j			0,4444					0,3617			0,3833	

El grupo *Chlorophyta* y *Bacillariophyta* dominaron en riqueza y abundancia de individuos en las diferentes charcas muestreadas, estos mismos grupos han sido encontrados en sistemas relacionados con los lixiviados (Pastich et al. 2016; Sardi-Saavedra et al. 2016; Khattabi et al. 2006), además que características como la profundidad, la turbidez o el color del lixiviado han sido relacionados con la abundancia fitoplanctónica en general.

Al establecer abundancias, riquezas y otros índices ecológicos se puede entender el rol ecológico que tienen las poblaciones en el medio en que se encuentran. Estrategias como R (especies “oportunistas”) y K (especies de “equilibrio”) pueden ser válidas para un mejor entendimiento de cómo el fitoplancton en estas aguas actúa en condiciones no convencionales, y cómo las poblaciones algales varían en densidad celular, crecimiento o en el tiempo antes, durante y después del tratamiento ligado al cambio fisicoquímico que estos tratamientos conllevan (Arauzo y Alvarez Cobelas, 1994).

Por otra parte, la época climática tiene un rol importante ya que se ha encontrado que no todos los géneros o especies son continuas en el tiempo, esto da para pensar que algunas especies se ven favorecidas por las

condiciones fisicoquímicas de ese momento y de ahí encontrar altas o bajas concentraciones celulares. Un ejemplo de esto fue lo hecho por Shantala et al. (2009), para establecer una representación fiable sobre la diversidad del fitoplancton relacionada a una planta de tratamiento de aguas residuales, ellos determinaron que un seguimiento de un año es propicio para tal fin. En este caso, podría pensarse que la comunidad fitoplanctónica aquí encontrada es una muestra de lo que estaría presente a lo largo de un año en los estanques y charcas en esta planta, no obstante, es necesario un seguimiento más detallado en el tiempo.

Aislamiento y mantenimiento de cultivos de microalgas nativas

Teniendo el registro de las especies identificadas, se procedió a la selección de cepas. Primero, en placas Petri se preparó un medio nutritivo generalista llamado Agar Bacteriológico entre 0,8 y 2% de agar, se disolvió en agua destilada y se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 121 °C. Luego, se dejó enfriar a temperatura ambiente y antes de su solidificación, se vertieron en las placas con aproximadamente 20 ml de medio y se dejaron enfriar por completo. Finalmente, se guardaron las placas boca abajo en una nevera a 4 °C hasta su uso. A diferencia de un cultivo normal bacteriano, a esta preparación se añadieron nutrientes para el crecimiento de microalgas generalista conocido como BG-11 (Sigma Aldrich) para asegurar el crecimiento de las microalgas.

Durante 2-4 días, las colonias de microalgas estuvieron creciendo en las placas a 15 °C con baja intensidad lumínica. Después de este tiempo, las colonias fueron vistas por estereoscopio para seleccionar las colonias para el siguiente aislamiento. Este proceso se repitió las veces necesarias hasta encontrar, de forma homogénea, las mismas colonias visualmente. Teniendo estas colonias, se resuspendieron en tubos de ensayo con medio BG-11 y mantenidas entre 10-20 días dependiendo de su crecimiento (Fig. 2.6). Este crecimiento fue observado por microscopio óptico, tomando muestras en tubos Eppendorf en cabina de flujo laminar para mantener los inóculos en las mejores condiciones de esterilidad posibles.

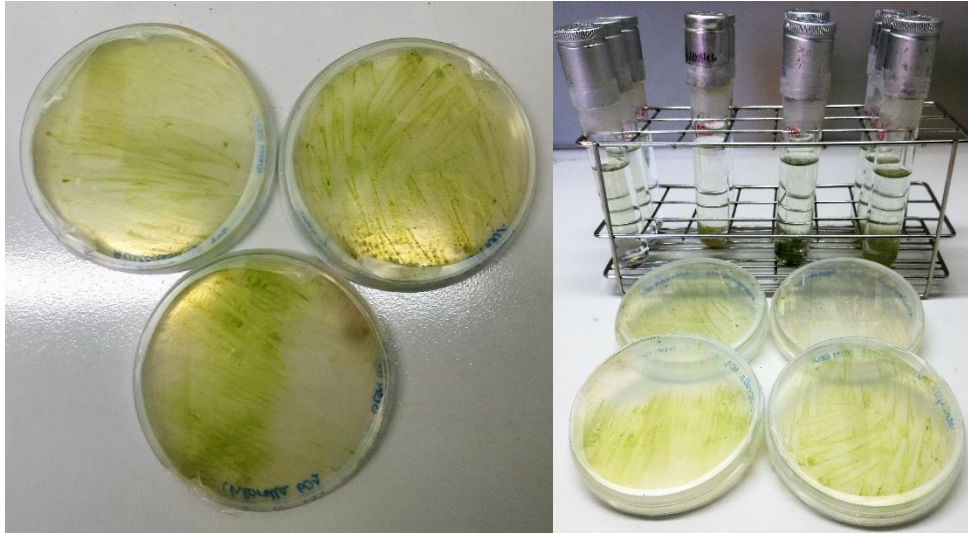


Figura 2.6. Aislamiento de colonias microalgales en placa y crecimiento en tubos de ensayo.

Desde los tubos de ensayo, se hizo la adición de antibiótico genérico para prevenir el crecimiento de hongos y bacterias. Después de 15-20 días de crecimiento, con agitación manual dos veces al día e intensidad lumínica entre $25\text{-}30 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ y fotoperiodo de 16:8 luz-oscuridad, se tomaron 10 ml de cultivo y fueron puestos en Erlenmeyer de 250 ml con un volumen de cultivo de 100 ml (10 ml inóculo, 88 ml agua destilada y 2 ml de BG-11). En este volumen fueron mantenidos en iguales condiciones de tiempo de crecimiento.

Finalmente, se recogió la biomasa suficiente para su identificación morfológica usando guías taxonómicas (Barrios et al. 2012; Bellinger y Sigeo, 2010; Prescott, 1974), el portal web Algaebase (<http://www.algaebase.org>) y el uso de herramientas moleculares usando los genes ITS1-5.8-ITS2 y 18S RNA. Como resultado de ambos métodos de identificación, las cepas fueron caracterizadas como: *Desmodesmus* sp., *Coelastrella* sp. 1, *Coelastrella* sp. 2, *Tetracystis* sp., *Acutodesmus obliquus*, *Chlamydomonas* sp. y *Chlorella* sp.

Capítulo 3

Crecimiento y remoción de nutrientes a partir de cepas de microalgas nativas en lixiviado pretratado de Residuos Sólidos Urbanos (RSU).

INTRODUCCIÓN

El aumento en la urbanización, la industrialización, los patrones de consumo en las grandes ciudades, entre otros factores, tiene como resultado un incremento en la generación de residuos sólidos. Como consecuencia, los gobiernos regionales tienen mayor presión para supervisar a las plantas de tratamiento en el uso de buenas prácticas de manejo de basuras, de forma que tengan menor impacto en el ambiente. El tratamiento de los residuos sólidos urbanos, que conlleva a la formación de lixiviados, líquidos derivados de la descomposición de la basura depositada en capas y la percolación del agua en superficie como la contenida en el mismo residuo, es un método ampliamente usado y de los más económicos de implementar (Hernández-García et al. 2019; Chang et al. 2018; Cheah et al. 2016; Renou et al. 2008).

Previo a su descarga al medio acuático, estos efluentes deben ser tratados para reducir la carga orgánica e inorgánica al mínimo posible sin generar problemas ambientales a futuro. No obstante, tanto los tratamientos convencionales primarios como secundarios no llegan a ser del todo suficientes, esto genera la atención sobre los tratamientos biológicos incluyendo la biorremediación en el lugar de la afectación y su viabilidad económica en el momento de la implementación (Pacheco et al. 2015). Este lixiviado puede tener un gran impacto negativo en el ambiente al ser descargado de forma directa en el agua, debido a su alta concentración de contaminantes nitrogenados o fosforados, metales pesados, compuestos xenobióticos, COD, entre otros; llegando a causar eutrofización, disminución en la disponibilidad de oxígeno, turbidez y hasta pérdidas de especies de fauna y flora (Hernández-García et al., 2019).

Diferentes autores han propuesto el cultivo de microalgas como una alternativa para disminuir la carga contaminante en el agua y generar biomasa con múltiples usos (El Ouaer et al. 2016; Sforza et al. 2015; Edmundson y Wilkie, 2013; Lin et al. 2007). Estos organismos también pueden ser usados en la remoción de nutrientes desde diferentes procesos de

pretratamiento como la decantación, lodos activados y estanques de oxidación, entre otros (Chinnasamy et al. 2014). Las aguas residuales son una buena alternativa como fuente de nutrientes, ya que generan una reducción en el costo y uso de fertilizantes a grandes volúmenes de producción; de igual forma, tanto cultivos de microalgas como de cianobacterias presentan doble ventaja, generando biomasa de gran interés al mismo tiempo que el tratamiento del agua ocurre. Por otra parte, una de las desventajas de utilizar esta agua como fuente de nutrientes es que dicha biomasa generada tiene un mercado reducido por la posible presencia de contaminantes en el agua, enfocándose como materia prima en la producción de biocombustibles en vez de otros subproductos (Markou et al. 2014).

Es importante resaltar la carga bacteriana que contienen estas aguas, llegando a competir con las microalgas. Esta relación microalga-bacteria llega a ser beneficiosa durante la fitorremediación en donde el consumo de nutrientes por parte de las microalgas incentiva su crecimiento y la producción de oxígeno, el cual es aprovechado por bacterias aerobias que ayudan a degradar contaminantes orgánicos difíciles de captar por las mismas microalgas (Delgadillo-Mirquez et al. 2016).

Con respecto a los lixiviados, el crecimiento de la industria y de la población en general en las ciudades ha causado mayor producción de residuos sólidos y por consiguiente mayor lixiviado a tratar. Este efluente varía en su composición química dependiendo de la clase de residuo del cual proviene y del tiempo de formación; siendo así que su compleja mezcla orgánica e inorgánica pueda ser más o menos tóxica respecto a otros tipos de aguas residuales (Cheah et al. 2016). Especies como *Chlorella sorokiniana* y *Scenedesmus* sp. (Chu et al. 1996), *Chlorella vulgaris* (Pereira et al. 2016), *Chlamydomonas* sp. (Paskuliakova et al. 2018) y *Picochlorum oculatum* (Dogaris et al. 2019) han sido candidatas para el tratamiento de lixiviados con resultados prometedores en la producción de biomasa, consumo de nutrientes, producción de lípidos y otras aplicaciones con importancia biotecnológica.

Para 2015, en España se encontraban en operación más de 3.700 vertederos de residuos (López, 2015) y para el siguiente año, del total de basura producida, el 46% fue tratado en estos vertederos (EUROSTAT, 2019), uno de los cuales se encuentra en Asturias. Allí, la planta RSU COGERSA, creó el proyecto ReCO₂very cuyos objetivos eran el uso del dióxido de carbono producido por incineradoras de residuos para el crecimiento de microalgas y la utilización del lixiviado pretratado (LP) como única fuente de nutrientes. Este proyecto fue creado en 2014 y puesto en marcha desde 2015 hasta 2017.

Con este proyecto, la planta de tratamiento buscó por primera vez en las microalgas un aliado para complementar el tratamiento de LP, como parte de su plan de desarrollo e investigación, y así seguir sumando esfuerzos en la disminución de nutrientes y otras sustancias aún presentes en el lixiviado luego de su tratamiento y previo a su descarga en los ríos, teniendo en cuenta el cumplimiento de la normativa vigente ambiental; a la vez la generación de biomasa con diferentes usos comerciales. Otro aspecto importante que hizo este proyecto atractivo fue el aprovechamiento de las comunidades algales que se desarrollan en las instalaciones de la planta en diferentes charcas y estanques y que están relacionadas directa e indirectamente en la recolección y el tratamiento de dicho efluente. Estas comunidades propias del vertedero pueden ofrecer una ventaja frente a otras especies ajenas al sistema por su adaptación probada al medio.

Se ha encontrado que el uso de microalgas propias de este medio puede reducir el tiempo de adaptación de la cepa, exponiéndola al efluente y logrando un mejor rendimiento en la fitorremediación del agua (Paskuliakova et al. 2016; Cheng y Tian, 2013); además que este tipo de efluentes llega a tener varios tipos de microflora y fauna, que cumplen varios roles incluyendo la descomposición de sustancias complejas para mayor remoción, entre otros (Chinnasamy et al. 2014). Teniendo en cuenta lo anterior y las cepas identificadas previamente (*Desmodesmus* sp., *Coelastrella* sp. 1 y 2, *Tetracystis* sp., *Chlamydomonas* sp., *A. obliquus* y *Chlorella* sp.), se llevaron a cabo distintas pruebas de exposición al lixiviado pretratado (LP) de residuos

sólidos no peligrosos como única fuente de nutrientes para medir el crecimiento y capacidad de remoción de nutrientes (nitrógeno y fósforo total) a distintas concentraciones de LP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas de microalgas se mantuvieron en placas de agar bacteriológico (Sigma Aldrich) a 25 ± 2 °C, $25\text{-}30\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ y 16:8 h de luz-oscuridad, las colonias de mejor aspecto fueron resuspendidas en medio de cultivo en tubos de ensayo de 20 ml durante 15 días usando el medio nutritivo BG-11 (Sigma Aldrich) a temperatura de 25 ± 2 °C y 12-12 h de luz-oscuridad. Las cepas de microalgas usadas fueron las identificadas por técnicas moleculares descritas en el capítulo 2.

El lixiviado pretratado (Tabla 3.1) fue obtenido como producto final de la planta depuradora, este efluente es el resultado del tratamiento de nitrificación y desnitrificación hecho por las bacterias encontradas en el sistema depurador y pasado por un sistema de filtración de $0,020\ \mu\text{m}$ varias veces para así separar el sólido y cualquier tipo de microorganismo del LP. Por último, este lixiviado fue guardado en recipientes de plástico opaco y transportado al laboratorio. Se realizaron diluciones usando agua destilada estéril ($121\ \text{°C}$ por 20 min) y estableciendo cinco concentraciones, las cuales fueron usadas como tratamientos (10-25-50-75-100% de concentración de LP). Los volúmenes fueron almacenados en recipientes de plástico lavados previamente y preservados a $4\ \text{°C}$ en oscuridad hasta su uso. Los medios nutritivos usados como control fueron BG-11 y Bold médium (BBM), siguiendo una receta estándar (Andersen, 2005) y autoclavados a $121\ \text{°C}$ por 20 min. Según la bibliografía consultada, se determinó el uso de ambos medios nutritivos al ser ampliamente usados para tener una referencia en experimentos futuros como el medio de control para cada una de las especies aquí probadas si fuese el caso.

Los cultivos fueron hechos en Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de cultivo, tanto controles como tratamiento, y mantenidos a $25\ \text{°C}$ periodos de luz-oscuridad de 12-12 h, agitación continua de 150 rpm e intensidad lumínica

de 80 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$. La concentración celular inicial fue calculada entre 10^4 - 10^5 cel ml^{-1} y se realizó seguimiento diario hasta 96 h. Se tomaron alícuotas diarias de 900 μl en tubos Eppendorf con 100 μl de paraformaldehido-glutaraldehido para fijar las muestras y fueron guardados a -80 °C. Estos experimentos fueron llevados a cabo por triplicado.

Tabla 3.1 Parámetros fisicoquímicos de LP de COGERSA para esta investigación.

Parámetro	LP
pH	6,7
Alcalinidad total (CaCO_3) (mg l^{-1})	20,404
Conductividad ($\mu\text{s m}^2 \text{s}^{-1}$)	11313,66
DBO_5 (mg l^{-1})	28,933
DQO (mg l^{-1})	1111,41
NT (mg l^{-1})	469,13
PT (mg l^{-1})	8,48
Cadmio (mg l^{-1})	<0,100
Cobre (mg l^{-1})	<0,100
Hierro (mg l^{-1})	1,03
Manganeso (mg l^{-1})	0,183
Níquel (mg l^{-1})	0,181
Plomo (mg l^{-1})	0,2
Zinc (mg l^{-1})	0,155

El crecimiento celular fue estimado por citometría de flujo BD FACSCalibur (Becton Dickinson) en el laboratorio de citometría del Instituto Español de Oceanografía de Gijón. Antes de determinar los conteos, se establecieron los parámetros básicos del equipo para cada especie ya que el tamaño celular fue variable entre controles y tratamientos. Se tomaron 600 μl de los tubos eppendorf y se añadieron 10 μl con 10^5 microesferas fluorescentes (Sigma Aldrich), estas microesferas se utilizaron como blanco al momento de identificar las poblaciones celulares en los citogramas. Para estimar el tamaño celular de las microalgas se usaron microesferas de diferentes tamaños (1, 2, 4, 6 y 10 micras de diámetro). La tasa de crecimiento (μ) fue calculada usando la siguiente ecuación:

$$\mu = (\text{Ln}X_2 - \text{Ln}X_1) / t_2 - t_1$$

donde X_2 y X_1 son las concentraciones celulares, final e inicial, y t_2-t_1 son los tiempos final e inicial por cada día.

Para cuantificar la concentración de NT y PT, se tomaron muestras al inicio y final de cada seguimiento por especie y tratamiento por duplicado en botes de plástico de 100 ml previamente lavados. El medio fue filtrado con filtros de 47 mm de diámetro GFFC para separar la biomasa del medio y luego fue guardado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su determinación. Las muestras fueron determinadas por un autoanalizador de flujo segmentado SKALAR San Plus, siguiendo los protocolos de Nitrógeno (5-500 ppb N) y Fósforo (2-200 ppb P) del equipo. Para calcular tanto NT y PT se usó la ecuación

$$\% \text{Remoción} = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100$$

siendo C_i y C_f las concentraciones iniciales y finales de N y P.

El análisis estadístico, por su parte, fue hecho con el programa R studio (www.rstudio.com). Para ajustarse a los parámetros, los datos se estandarizaron con logaritmo neperiano y luego se contrastó el crecimiento de cada especie en los diferentes tratamientos, buscando diferencias significativas en el crecimiento de cada especie como entre los tratamientos en general (ANOVA $p \leq 0,05$). Para encontrar diferencias significativas en las tasas de crecimiento, se aplicó el test de Tukey, encontrando en qué tratamientos y para cuáles especies fue mejor esta variable (p-valor $< 0,05$ significativo). Para el consumo de nutrientes, se estimó la tendencia general en el retiro de NT y PT del medio luego de 96 h de exposición. Las gráficas se realizaron con el programa SigmaPlot versión 12.5.

RESULTADOS

Luego de 96 horas de exposición a diferentes concentraciones de LP como única fuente de nutrientes, se ha determinado que las cepas nativas aisladas de charcas y estanques de la planta de tratamiento COGERSA tuvieron diferencias significativas entre los medios nutritivos usados como control (P-valor $< 0,001$) y las diferentes concentraciones de LP a las que

fueron expuestas las cepas (P-valor < 0,001). Referente a los medios nutritivos usados como control (Fig. 3.1), el BG-11 fue mejor medio nutritivo para cinco de las especies mientras que BBM lo fue para *Coelastrella* sp. 2. No obstante, la cepa *Coelastrella* sp. 1 tuvo bajo crecimiento en bajos medios nutritivos, siendo levemente superior en BBM. Para realizar una mejor comparativa, tanto del crecimiento como de la captación de nutrientes, cada cepa control fue comparada con los distintos tratamientos con el medio nutritivo que mejor resultado mostró durante las 96 h de seguimiento.

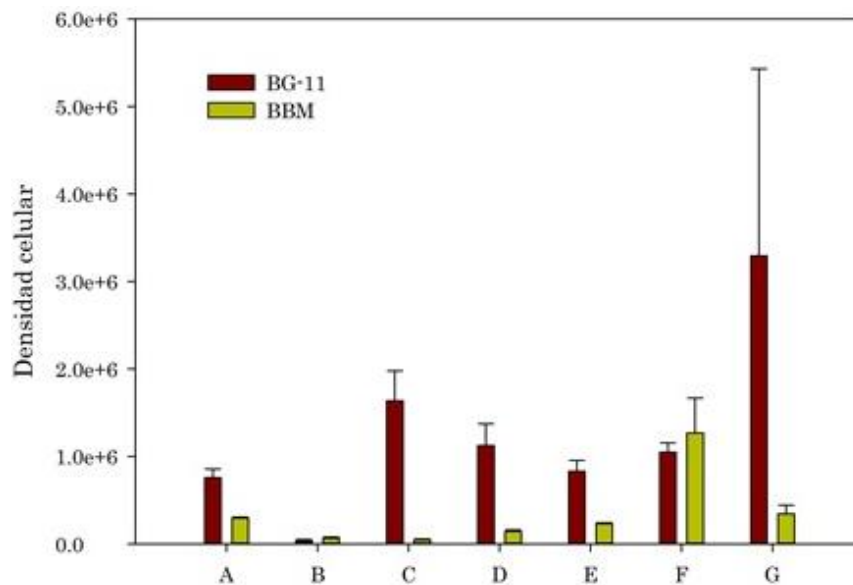


Figura 3.1 Crecimiento de aislamientos microalgales nativos en BG-11 y BBM.

Se encontraron tres clases de respuesta para las concentraciones de LP a las que fueron expuestas las cepas. La primera fue donde *Desmodesmus* sp. (cepa A, Fig. 3.2) y *Coelastrella* sp. 1 (cepa B, Fig. 3.3) no crecieron en ninguno de los tratamientos. El segundo tipo de respuesta fue la de las especies que crecieron en concentraciones no superiores al tratamiento de 10% de LP, en este grupo se encontraron las cepas *Tetracystis* sp. (cepa C, Fig. 3.4), *Chlamydomonas* sp. (cepa D, Fig. 3.5) y *A. obliquus* (cepa E, Fig. 3.6).

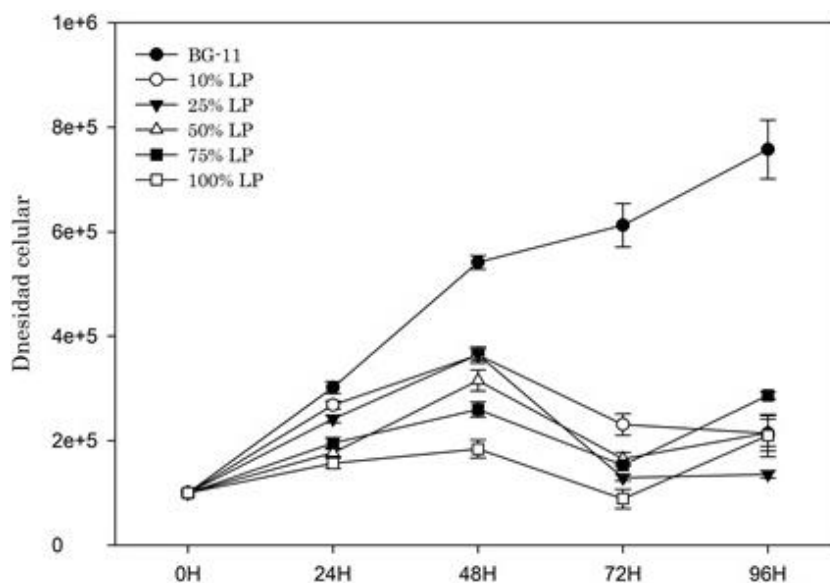


Figura 3.2 Densidad celular de la especie A (cel ml^{-1}) en tratamiento de LP como única fuente de nutrientes

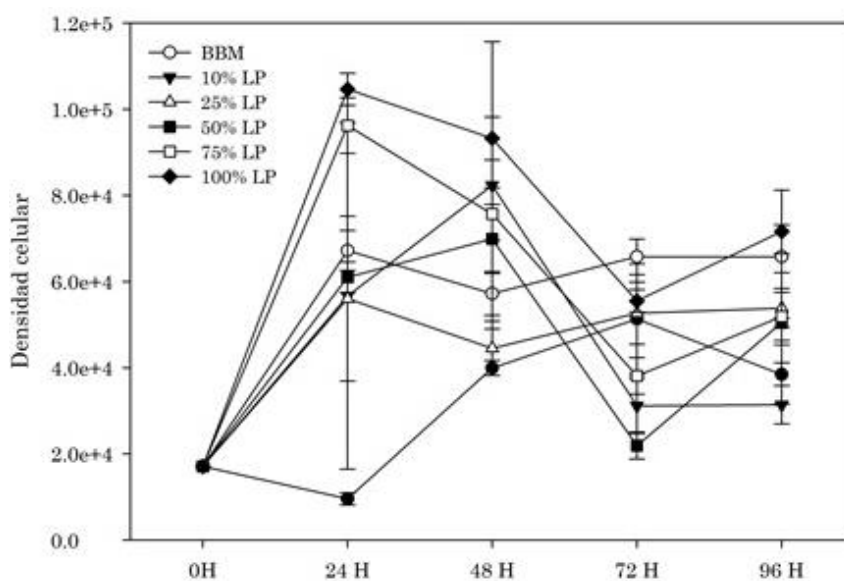


Figura 3.3 Cultivo de la cepa B (cel ml^{-1}) en distintos tratamientos de LP.

Durante las primeras 48 h de seguimiento de este segundo grupo de respuesta, el crecimiento fue cambiante. Esto puede indicar que estas especies requirieron un periodo de adaptación al medio antes de observarse un crecimiento continuo durante el periodo de seguimiento. Mientras la cepa C aumentó (día 1) y disminuyó (día 2) su crecimiento, la cepa E decreció durante las primeras 24 h, seguido de un aumento a partir de 48 h hasta el final. La cepa D por su parte, tuvo un periodo de aclimatación al medio fue

rápido y su crecimiento fue ascendente de forma continua a lo largo de las 96 h de exposición al tratamiento de 10% de LP.

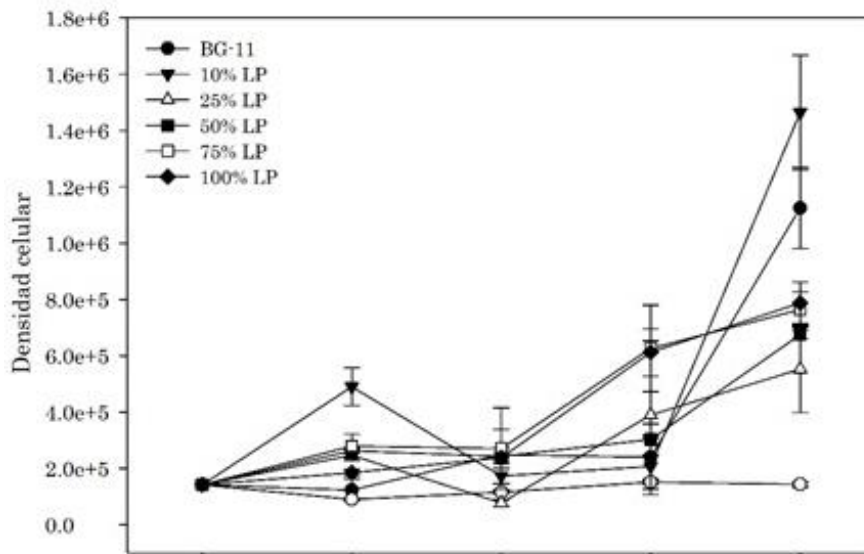


Figura 3.4. Densidad celular (cel ml^{-1}) de la cepa C en LP.

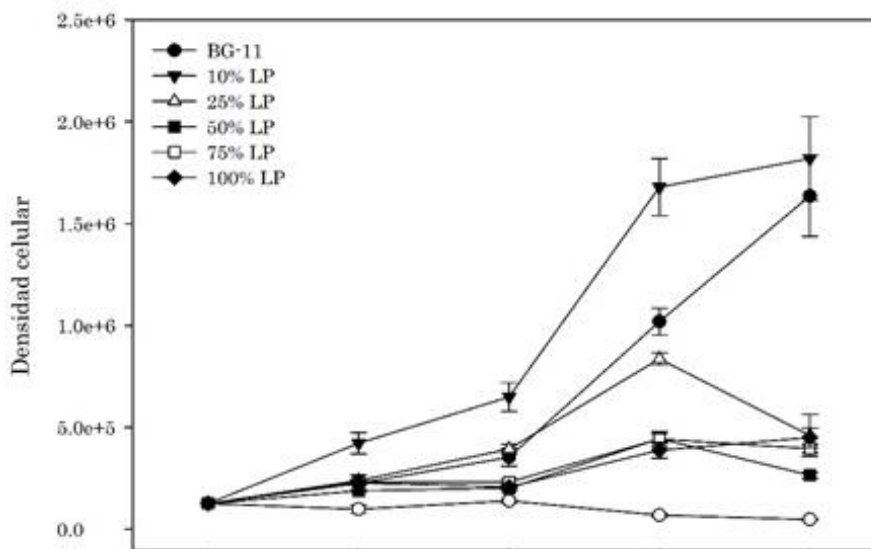


Figura 3.5. Densidad celular (cel ml^{-1}) de la cepa D en LP.

Finalmente, la respuesta tipo 3 (cepas F y G), conformaron el tercer tipo de respuesta, en donde *Coelastrella* sp. 2 (cepa F) y *Chlorella* sp. (cepa G) tuvieron un crecimiento similar a su medio de control en una exposición hasta del 50% de LP durante 96 h (Fig. 3.7). En ambas cepas, en 25-50% de LP, la densidad celular se incrementó desde las 48 h. A rasgos generales, en todas las concentraciones se pudo observar un crecimiento proporcional a la

concentración, es decir, a medida que la proporción de LP aumentó en la muestra, las cepas tuvieron un desarrollo más lento obteniendo un ligero aumento respecto a su concentración celular inicial.

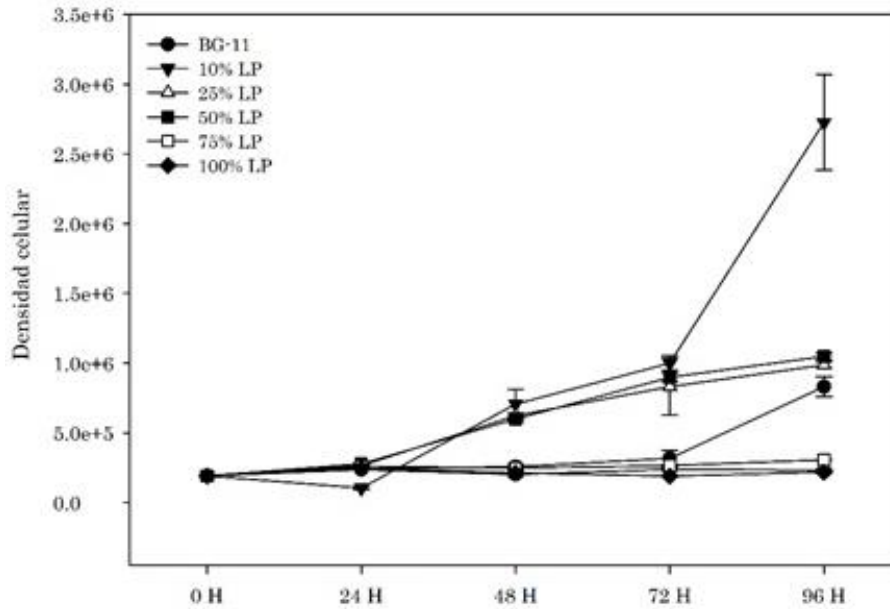


Figura 3.6 Crecimiento (cel ml^{-1}) de la cepa E en LP.

La tasa de crecimiento de las microalgas fue calculada (Tabla 3.2), determinando que el tratamiento al 10% (Test de Tukey, $p\text{-value} < 0,05$) fue el de mejor aclimatación por parte de las cepas durante las 96 h de seguimiento. Por su parte, en los tratamientos del 75% y 100% de LP, la tasa de crecimiento fue inferior al 50% de lo calculado en los demás tratamientos.

En lo que respecta a las microalgas, la cepa G fue la única que mantuvo tasas de crecimiento estables en todos los tratamientos, mientras que las demás presentaron tasas menores a lo encontrado en el control. Las cepas del género *Coelastrrella* (B y F) tuvieron mejor desempeño con BBM, correspondiéndose con lo encontrado en el crecimiento control (Fig. 3.1).

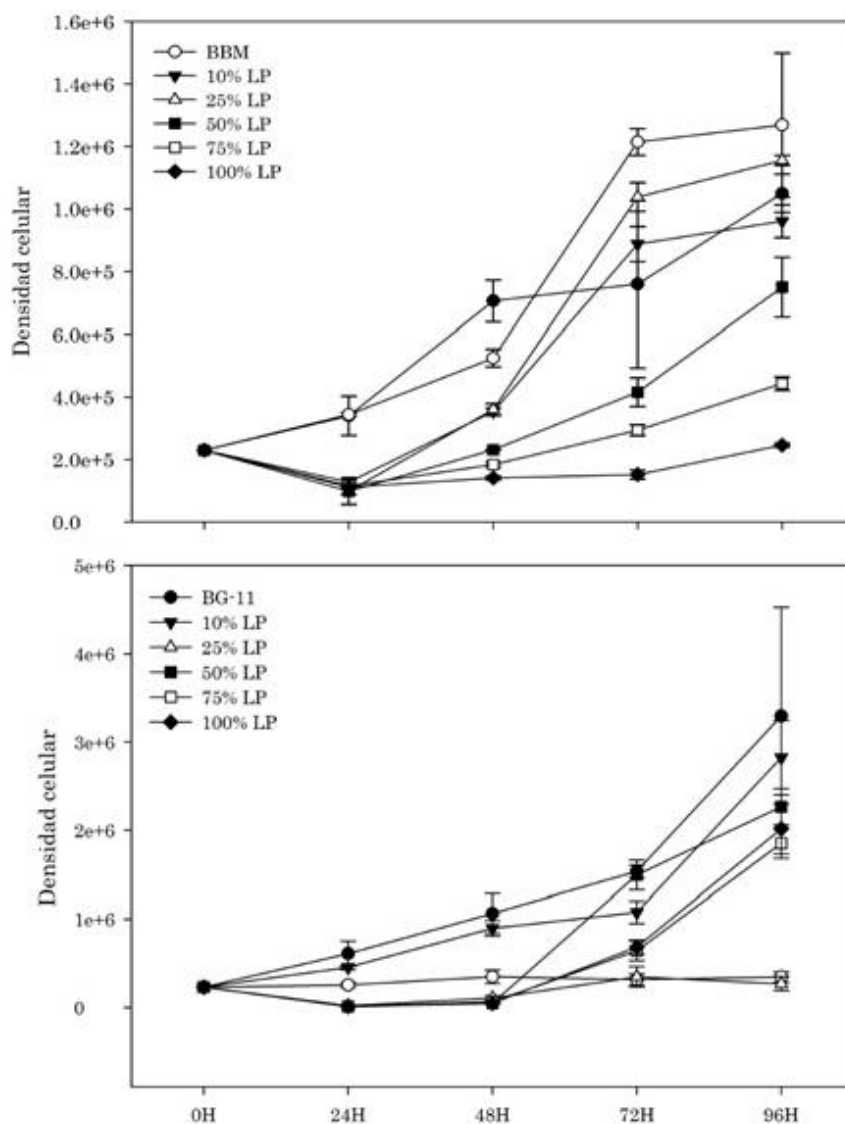


Figura 3.7 Crecimiento (cel ml^{-1}) de la especie F (arriba) y G (abajo) en diferentes concentraciones de LP.

Tabla 3.2 Tasa de crecimiento (d^{-1}) de las microalgas nativas expuestas a diferentes concentraciones de LP. El asterisco (*) marca diferencias significativas en el Test de Tukey < 0,05. “nd” significa “no determinado”.

CEPA	BG-11	BBM	10% LP	25% LP	50% LP	75% LP	100% LP
A	0,31±0,09	0,08±0,07	Nd	nd	nd	0,07±0,06	nd
B	0,20±0,09	0,34±0,07	0,15±0,08	0,27±0,07	0,27±0,04	0,28±0,06	0,36±0,05*
C	0,52±0,09	0,002±0,07	0,58±0,08*	0,32±0,07	0,39±0,04	0,42±0,06*	0,43±0,06*
D	0,64±0,09*	nd	0,67±0,08*	0,31±0,07	0,19±0,04	0,29±0,06	0,32±0,05
E	0,37±0,09	0,05±0,07	0,65±0,09*	0,41±0,07	0,43±0,04	0,12±0,06	0,03±0,05
F	0,58±0,09	0,64±0,07*	0,55±0,08*	0,62±0,07*	0,46±0,04	0,27±0,06	0,06±0,05
G	0,65±0,09*	0,12±0,07	0,65±0,08*	nd	0,59±0,04*	0,54±0,06*	0,56±0,05*

Sobre la remoción de NT y PT, hubo consumo de ambos nutrientes por parte de las microalgas, aunque no todos lo consumieron en las mismas proporciones. Para el NT (Fig. 3.6) en BG-11 fue removido del medio entre 92,5-97,8% mientras que en BBM, el rango de consumo se encontró entre 93,3-97,0%. En el caso de PT (Fig. 3.7), los controles mostraron un consumo superior al 94% en todas las especies (98,53-99,85 % para BG-11 y 94,40-99,97% para BBM), siendo las cepas E y F las que presentaron mayor consumo de dicho nutriente.

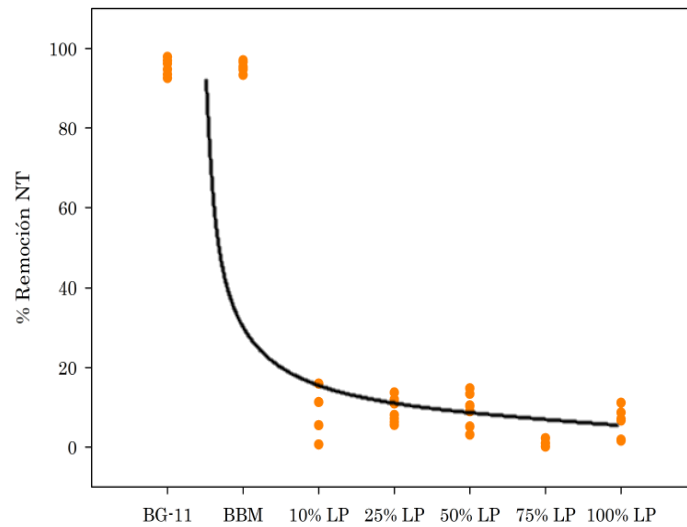


Figura 3.6 Tendencia del porcentaje de remoción de NT por parte de las microalgas nativas expuestas a LP en distintas concentraciones respecto a los medios nutritivos control.

En lo relacionado al consumo en los distintos tratamientos de LP (Tabla 3.4 y 3.5), a rasgos generales las microalgas no lograron consumir más del 20% de NT disponible, mientras el consumo de PT fue variado, siendo menor en los tratamientos de 75% y 100% LP, y mayor entre los tratamientos de 10% y 25%. Sobre las especies en las diferentes concentraciones, en el tratamiento al 10%, la especie C fue la que más consumió ambos nutrientes (15,91% NT y 83,19% PT); mientras en 25% LP la cepa A fue la de mejor desempeño (13,68% NT y 92,58% NP).

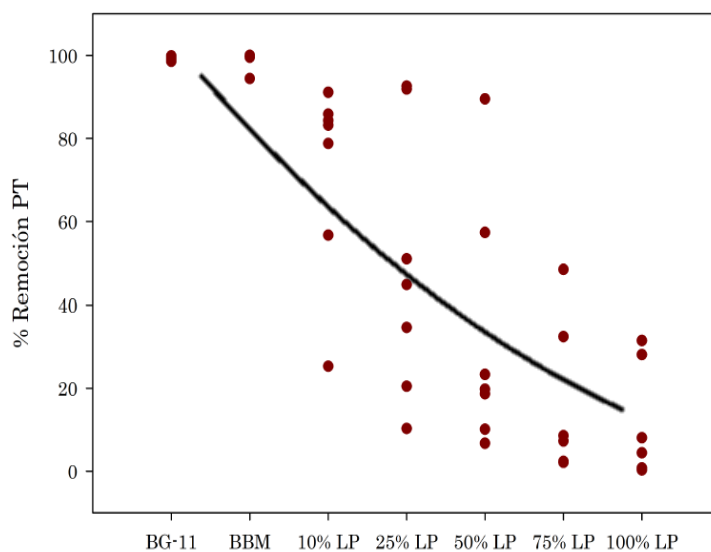


Figura 3.7 Tendencia del porcentaje de remoción de PT por las microalgas nativas expuestas a LP en distintas concentraciones respecto a los medios nutritivos control.

Con LP al 50% de concentración, la cepa F removió 14,72% de NT y 89,47% de PT; en el tratamiento del 75% LP no se logró determinar la concentración de los nutrientes en varias especies, quedando solo la especie A con 2,21% NT y 32,42% PT y la especie B con 0,08% NT y 2,33% PT. Por último, en la concentración del 100%, las cepas A y F tuvieron el mejor rendimiento en remoción del NT (11,10% A y 7,02% F) y PT (31,48% A y 28,10% F).

Tabla 3.4 Porcentajes de remoción de nitrógeno total por parte de microalgas nativas expuestas a LP. nd significa no determinado

Cepa	% LP	% NT	Cepa	% LP	% NT	Cepa	% LP	% NT	Cepa	% LP	% NT
A	10	0,61	C	10	15,91	E	10	11,29	G	10	nd
A	25	13,68	C	25	6,23	E	25	8,03	G	25	5,51
A	50	13,37	C	50	5,13	E	50	10,43	G	50	10,23
A	75	2,22	C	75	0,93	E	75	nd	G	75	nd
A	100	11,11	C	100	1,85	E	100	1,58	G	100	8,64
B	10	nd	D	10	5,45	F	10	nd			
B	25	10,90	D	25	7,13	F	25	11,97			
B	50	3,09	D	50	8,96	F	50	14,73			
B	75	0,08	D	75	nd	F	75	nd			
B	100	6,64	D	100	nd	F	100	7,03			

Tabla 3.5 Porcentajes de remoción de fosforo total por parte de microalgas nativas expuestas a LP. nd significa no determinado

Cepa	% LP	% PT	Cepa	% LP	% PT	Cepa	% LP	% PT	Cepa	% LP	% PT
A	10	91,08	C	10	83,20	E	10	78,74	G	10	56,68
A	25	92,59	C	25	34,61	E	25	50,94	G	25	44,76
A	50	57,32	C	50	10,12	E	50	23,32	G	50	18,64
A	75	32,42	C	75	nd	E	75	7,26	G	75	8,55
A	100	31,49	C	100	0,76	E	100	0,29	G	100	8,03
B	10	25,28	D	10	84,31	F	10	85,82			
B	25	10,27	D	25	20,46	F	25	91,85			
B	50	6,71	D	50	19,75	F	50	89,48			
B	75	2,33	D	75	2,12	F	75	48,39			
B	100	4,40	D	100	nd	F	100	28,10			

DISCUSIÓN

Las microalgas nativas *Desmodesmus* sp. (A), *Coelastrrella* sp. 1 (B), *Tetracystis* sp. (C), *Chlamydomonas* sp. (D), *Acutodesmus obliquus* (E), *Coelastrrella* sp. 2, (F) y *Chlorella* sp. (G) aisladas de la planta de tratamiento RSU COGERSA han sido expuestas a diferentes concentraciones de LP durante 96 h, midiendo como variables el crecimiento y el consumo de nutrientes y así determinar cuál o cuáles cepas serán las mejores en las distintas concentraciones de lixiviado como una alternativa paralela al tratamiento tradicional.

Se encontraron tres tipos de respuesta: las cepas A y B no mostraron crecimiento en LP, las cepas C, D y E crecieron en 10% de concentración y finalmente las cepas F y G crecieron hasta 50% de LP.

La densidad celular en todos los tratamientos fue superior a la que había cuando se inició cada ensayo pero dicho crecimiento medio no fue significativo en concentraciones de 75 y 100% de lixiviado (Fig. 3.8). Para que un cultivo pueda tener buen desarrollo, se hace necesario que las condiciones iniciales sean las óptimas, una de esos requisitos es la concentración del inóculo de partida. En este caso, dicha concentración no fue superior a 100 000 cel ml⁻¹.

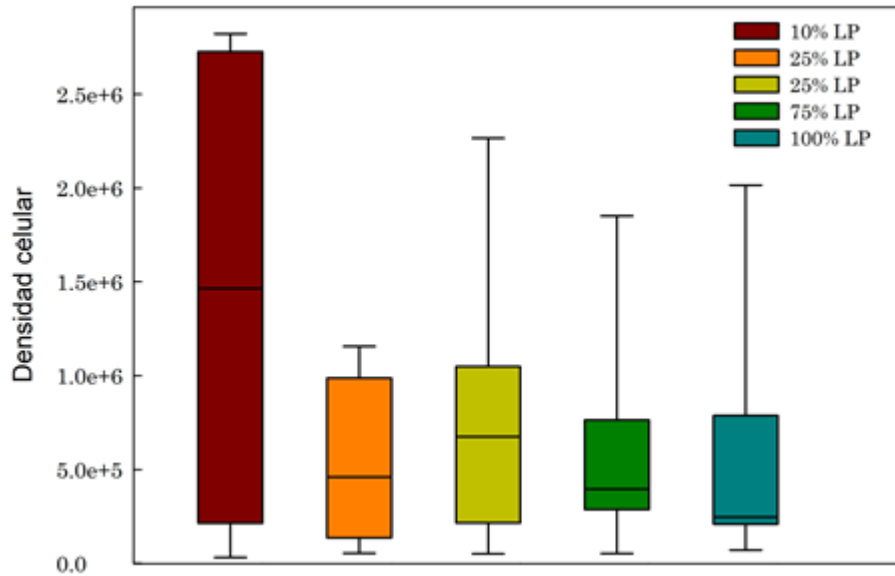


Figura 3.8 Promedio del crecimiento celular de las diferentes cepas en cada tratamiento de lixiviado

Se ha encontrado que la fitorremediación de lixiviado con *Chlamydomonas* sp. SW15aRL (Paskuliakova et al., 2018b) fue significativa partiendo de un inóculo con densidades celulares iniciales máximas de 500 000 cel ml⁻¹. Si bien es cierto que no es el único factor a tener en cuenta, las condiciones fisicoquímicas del lixiviado cumplen un papel fundamental ya que no solo dependen del tipo de tratamiento sino del tipo de residuo del que procedan. Se pudieron determinar características fisicoquímicas distintas entre efluentes en 22 muestras diferentes de lixiviado originario de residuos sólidos urbanos peligrosos y no peligrosos, residuos industriales y residuos domésticos (Clément et al. 1997).

En este trabajo, las condiciones del lixiviado luego de ser tratado por la planta no fueron las mejores para las cepas A y B identificadas aquí. En el caso de *Desmosdemus*, diferentes especies de este género fueron valoradas durante 12 días en lixiviado, encontrando una tolerancia y crecimiento en concentraciones no superiores al 30% de lixiviado (Lin et al. 2007). Por otra parte, el género *Coelastrella* reúne especies que han sido usadas como posibles bioindicadores de calidad ambiental gracias a los cambios en su pigmentación (Abe et al. 2004) y ha sido encontrada como parte de la sucesión fitoplanctónica en un sistema de tratamiento de aguas residuales con luz

solar (Chindah et al. 2007). Es posible que la cepa B identificada acá no haga parte de la comunidad fitoplanctónica común del sistema, esto se deduce debido a la falta de tolerancia en los diferentes tratamientos del lixiviado a la cual fue expuesta (Fig. 3.3), llevando a pensar que sea una cepa oportunista en la que las condiciones únicas en el momento del muestreo le hayan beneficiado para mantenerse, más no para crecer.

En lo que respecta al grupo dos de respuesta, donde las cepas C, D y E toleraron y crecieron al 10% de concentración del tratamiento, *Tetracystis* sp. (cepa C) mostró un crecimiento continuo después de 48 h de exposición, *Chlamydomonas* sp. (cepa D) tuvo un crecimiento continuo desde el inicio, mientras que *A. obliquus* (cepa E), aumentó su densidad celular después de 24 h de exposición al LP. Tanto especies del género *Tetracystis* como *Chlamydomonas* han sido valoradas en distintos efluentes para ver su tolerancia y generación de biomasa, encontrando que *Tetracystis fissurata* ES-67 murió y *Chlamydomonas* sp. ES-47 fue inhibida, ambas en sociedad con distintas especies bacterianas en el tratamiento de agua residual de origen industrial (Safonova et al. 2004)

Por otra parte, en aguas residuales domésticas, el género *Chlamydomonas* fue identificado entre uno de los grupos taxonómicos comunes en estos efluentes, siendo capaz de tolerar condiciones anaerobias y altas cargas de metales pesados en estanques de estabilización como parte del sistema de tratamiento (Amengual-Morro et al. 2012). En lixiviado diluido previamente, *Chlamydomonas* sp. SW15aRL fue capaz de reducir en 83% la carga de amonio del medio teniendo en cuenta una suplementación de fósforo de 1,2 g l⁻¹ para tener una relación N:P apropiada para el lixiviado estudiado (Paskuliakova et al. 2018b). *A. obliquus*, por su parte, ha sido aislada del propio sistema de lixiviados y usada para tratar el efluente a diferentes concentraciones en Lazio, Italia (Sforza et al. 2015), los investigadores determinaron su máximo crecimiento en lixiviado al 10% coincidiendo con lo encontrado en este trabajo. Además, lograron demostrar la capacidad de

remoción de amonio y fósforo del medio, siendo el fósforo el nutriente limitante durante el crecimiento.

En el tercer grupo de respuesta se observó un aumento gradual del crecimiento y de la tolerancia al lixiviado de la cepa F (*Coelastrella* sp. 2) y la cepa G (*Chlorella* sp.) hasta un 50% del tratamiento (Fig. 3.5). *Coelastrella* sp. QY01 fue usada para el consumo de nutrientes y producción de lípidos durante en el tratamiento aeróbico y anaeróbico de aguas residuales procedentes de granjas porcinas (Luo et al. 2016). El equipo investigador determinó una tasa de crecimiento entre 0,2-0,3 d⁻¹ y un consumo de nitrógeno en forma de amonio y fósforo total superior al 90% en ambos casos. Durante este trabajo, la cepa F obtuvo mejores tasas de crecimiento encontrándose entre 0,4-0,6 d⁻¹ pero con un consumo de nitrógeno total inferior al 15% (Tabla 3.4) y fósforo total entre 85-91% (Tabla 3.5).

La cepa G (Fig. 3.5) fue la de mayor estabilidad al momento de determinar su crecimiento en los diferentes tratamientos entre las especies aquí probadas. Su crecimiento diario estuvo entre 0,54-0,65 d⁻¹ (Tabla 3.2) a lo largo de 96 h, con un consumo final de NT inferior al 11% y PT al 60%. Durante la valoración sobre la adaptación y uso de una cepa nativa de *Chlorella* sp. aislada de un estanque perteneciente al tratamiento del lixiviado (El Ouaer et al. 2016), el mejor crecimiento fue en una concentración de lixiviado al 10%, los mismo investigadores también determinaron que para un crecimiento óptimo en concentraciones superiores al 30%, la cepa debe tener un tiempo de aclimatación de al menos 14 días para ser comparable con el medio nutritivo control (BBM).

En este trabajo, se demostró que la cepa de *Chlorella* sp. tuvo mejor rendimiento en concentraciones bajas y medias de lixiviado en menor tiempo de exposición, y que no requirió tiempo de adaptación previo a su exposición a los tratamientos. Por otra parte, en este trabajo, la cepa G en su control tuvo mejor crecimiento en medio BG-11 a diferencia de lo visto por El Ouaer et al. (2016) donde el medio seleccionado como control fue BBM.

En lo relacionado a los nutrientes, el consumo tanto de nitrógeno como de fósforo de las cepas entre los tratamientos fue variable. El nitrógeno total fue removido menos del 20% en todas las concentraciones de LP (Tabla 3.4), a diferencia del fósforo total donde la remoción varió de acuerdo a la cepa y del tratamiento (Tabla 3.5). Teniendo en cuenta que el lixiviado es un medio con alta turbidez, donde la penetración de la luz puede ser insuficiente afectando el crecimiento algal, realizar diluciones puede reducir el efecto nocivo del lixiviado a concentraciones altas (Hernández-García et al. 2019; Lin et al. 2007) y mejorar el color característico del efluente (café oscuro a negro) debido a la presencia de ácidos fúlvicos y húmicos procedentes de la degradación de la materia orgánica (Renou et al. 2008) .

A pesar de esto, se deben tener otras alternativas en cuenta ya que al diluir el efluente se reducen sustancias nocivas como elementos o iones importantes para el metabolismo celular. El tratamiento de lixiviado suplementado con minerales para la fitorremediación con *Chlamydomonas* sp. SW15aRL (Paskuliakova et al. 2018a) demostró que el hierro y el magnesio cumplen un papel importante en la reducción de N y P, actuando como cofactores en la conversión de los nutrientes dentro de los ciclos biogeoquímicos.

Respecto a la relación de N:P, para mantener una relación adecuada durante el proceso de nitrificación-desnitrificación, la planta de depuración se ve obligada a la adición de metanol como fuente de carbono y ácido fosfórico como fuente de fósforo por la alta concentración de amonio en el efluente manteniendo así una relación de 100:10:1. No obstante, luego de salir de la depuradora, al no ser parte de los procedimientos estándar, y enfocándose prioritariamente en la reducción del amonio hasta niveles no tóxicos teniendo en cuenta la normativa ambiental, se estimó una relación de N:P de 55.

Especies del género *Coelastrella* han sido fuente de estudio por su capacidad de producir carotinoides de gran valor, gracias a su capacidad antioxidante (Abe et al. 2007); adicionalmente, debido a los cambios en su pigmentación según las condiciones de nutrientes disponibles en el medio y la

temperatura a la que pueden crecer, se han categorizado como bioindicadores (Hu et al. 2013; Abe et al. 2004). Durante la experimentación, las especies de *Coelastrrella* usadas mantuvieron siempre el color verde, señal de haber nitrógeno disponible en el medio. En ensayos preliminares (datos no mostrados), el cambio de verde a naranja fue evidenciado en los cultivos de mantenimiento al momento de la renovación del medio nutritivo, al cabo de varios días, ambas cepas de *Coelastrrella* retomaron de nuevo su color verde, coincidiendo con lo encontrado por Hu et al. (2013).

Una mezcla de agua residual-lixiviado al 7% demostró ser la mejor mezcla para el crecimiento de especies nativas del género *Desmodesmus* y de *S. obliquus* para la producción de biomasa, carbohidratos y lípidos, encontrando una relación óptima N:P de 29,4 para el crecimiento de las microalgas, lo cual coincide con una relación teórica N:P ideal entre 5 y 30 (Hernández-García et al. 2019). En la remediación de agua residual y la influencia en la composición de nitrógeno y fósforo (Whitton et al. 2016) se hizo necesario realizar una adición de ambos elementos para mantener los nutrientes necesarios durante el crecimiento de *Stigeoclonium* sp., *C. vulgaris*, *C. sorokiniana*, *S. obliquus* y *Microcystis aeruginosa*. En este caso, Whitton y colaboradores sostienen que en una actividad microalgal adecuada para la remediación, la relación de N:P no debe ser mayor a 22. En pruebas con *C. vulgaris*, Pereira et al. (2016) demostraron que una relación N:P no adecuada afecta el consumo de sales y el ion K^+ , factores importantes para un buen crecimiento en lixiviados.

Teniendo como referencia la capacidad media de remoción de nutrientes dependiendo de las cepas (Fig. 3.6 y Fig. 3.7), donde el fósforo a concentraciones bajas y medias fue igual o superior al 50%, se puede pensar que este nutriente también puede ser uno de los factores limitantes (además de iones, elementos u otras sales) del crecimiento en los distintos experimentos. Teniendo en cuenta que uno de los objetivos principales del proyecto ReCO₂very y de esta investigación es el uso del lixiviado pretratado como única fuente de nutrientes, esto implicó usar dicho efluente sin cambios

en su composición fisicoquímica original al momento de salir de la planta depuradora

De acuerdo a los crecimientos y el consumo de nutrientes reportados para las diferentes cepas nativas provenientes del sistema de depósito y tratamiento de residuos y la formación de lixiviado, se determinó que no todas las cepas respondieron de forma significativa a las diferentes concentraciones de LP usadas aquí. Si bien es cierto que se encuentran en el mismo sistema y varias de ellas han sido reportadas en otros sistemas parecidos, la forma en que se originan o reaccionan los distintos componentes químicos que aparecen en la degradación de materia orgánica, pueden causar condiciones para las que algunas de las cepas probadas no sean tolerantes.

Otro aspecto a resaltar es el tratamiento que lleva el lixiviado crudo (alto en concentraciones de amonio) a la formación del lixiviado pretratado o LP (rico en nitratos). Se considera que una parte de este proceso puede ser el que desde un inicio no se den las condiciones básicas para el crecimiento de las algas y se vea la necesidad de suplementarlo con minerales o nutrientes, como el fósforo, para una mayor remoción de nitrógeno del medio.

El hecho de hacer diluciones ayuda a que ciertos compuestos puedan ser más fácilmente captados por las microalgas y, al mismo tiempo, la penetración de la luz en el medio sea mucho mejor; sin embargo, la misma dilución puede causar una limitación de otros elementos o sustancias que son igualmente importantes en el metabolismo celular.

Finalmente, también se concluye que la capacidad de cinco de siete cepas capaces de crecer en diferentes tratamientos de LP es muy importante en ensayos posteriores, ya que ha sido demostrada su capacidad de crecer en estos ambientes y a la vez la importancia que tiene la producción de biomasa para la generación de pigmentos o lípidos, siendo estos altamente apreciados por la industria en la actualidad.

También es interesante mencionar que, ya teniendo estas cepas identificadas, y como uno de los resultados relevantes del proyecto

ReCO₂very, el mantenimiento de estas cepas puede resultar valioso al momento de seguir valorando su explotación de forma comercial, requiriendo un estudio más detallado y prolongado en el tiempo.

Capítulo 4

Producción de lípidos y perfil lipídico de microalgas nativas en lixiviado pretratado.

INTRODUCCIÓN

Debido a que las microalgas tienen la capacidad de alimentarse de forma autotrófica mediante la captación de CO₂ como fuente de carbono para producir oxígeno, por su habilidad para generar energía química útil en diferentes procesos intracelulares, por su composición nutricional prometedora y su producción de metabolitos de gran valor, se constituyen en una pieza estratégica en la producción de alimento y fuente de energía con menor impacto en el ambiente, al mismo tiempo podrían ayudar a mitigar la creciente demanda de alimentos debido al crecimiento que vive la población a nivel global. Al no tener un complejo sistema de reproducción, esta se puede inducir incluso bajo condiciones de estrés generando proteínas, carbohidratos, lípidos y pigmentos en altas concentraciones, sin olvidar la capacidad de crecer en aguas tanto óptimas como atípicas (Varfolomeev y Wasserman, 2011), lo anterior representa una ventaja para la generación de biomasa.

La producción de lípidos, en particular, es de gran interés por su aporte de ácidos grasos esenciales como son el omega-3 y omega-6, necesarios en la dieta y usados como suplemento tanto en humanos como animales (Marques et al. 2012). Especies tales como *Chlorella vulgaris*, *Porphyridium cruentum*, *Dunaliella salina*, *Isochrysis galbana*, *Spirulina platensis* son algunas referencias que han sido usadas como fuente de investigación (Chacón-Lee y González-Mariño, 2010).

La generación de aceites con fines energéticos también ha sido estudiada, donde el factor dominante es el uso de efluentes o aguas residuales (Wu et al. 2012; Sydney et al. 2011); ayudando, a su vez, a disminuir el efecto nocivo en su descarga sobre los ambientes acuáticos. Más al detalle, la producción de lípidos usando lixiviados, como un tipo de agua residual generada a partir de la degradación de materia orgánica y la percolación de agua superficial en capas de residuos sólidos dispuestos en vertederos (Kjeldsen et al. 2002), está causando gran interés (Chang et al. 2018; Zhao et al. 2014; Richards y Mullins, 2013).

Las características de los lixiviados procedentes de plantas RSU muestran complejidad y es difícil establecer su composición respecto a compuestos orgánicos presentes. En lo que compete a contaminantes convencionales, compuestos como cloruros, sulfatos, hierro o manganeso suelen estar presentes en diferentes cantidades debido a la alta variedad de materia orgánica presente. Además, compuestos orgánicos específicos también son hallados, requiriendo mayor prevención en la depuración con el fin de asegurar la calidad del efluente producido y menor impacto sobre los ecosistemas a la hora de se descarga (Pitarch et al. 2007).

Especies como *C. vulgaris*, *P. oculatum*, *Chlamydomonas biconvexa*, *Nannochloropsis* sp. *Desmodesmus* sp. y *S. obliquus* han sido utilizadas en la disminución de la contaminación en estas aguas y la generación de lípidos con fines energéticos (Dogaris et al. 2019; Ferreira et al. 2019; Hernández-García et al. 2019; Chang et al. 2018); no obstante, este proceso sigue presentando inconvenientes a niveles productivo y logístico que requieren una pronta solución para que los biocombustibles basados en algas se conviertan en una realidad comercial (Guieysse et al. 2013)

Otra alternativa es la utilización de estas aguas residuales para el crecimiento de biomasa, enfocándola en el consumo humano o animal, sin embargo, esto sigue siendo un tema de difícil manejo ya que sugiere un dilema tanto ético, como de seguridad alimentaria. Como punto de partida, se ha comprobado el gran potencial que tienen las microalgas para proporcionar alimentos, compuestos bioactivos, biocombustibles y nuevas capacidades para el control de la contaminación (Varfolomeev y Wasserman, 2011, Chacón-Lee y González-Mariño, 2010;) pero, también es cierto que debe manejarse más de una tonelada métrica de agua por cada kilogramo de biomasa obtenida (Guieysse et al. 2013) , indicando que el uso del agua representa un desafío particular de gran importancia.

En África, se proyecta un aumento de la población cuatro veces mayor al actual para el año 2037 y a su vez, mayor producción de agua residual concentrándose la mayor generación en zonas urbanas. Por otro lado, la

región árabe es considerada como la más árida del mundo teniendo a 18 de los 22 países que la conforman por debajo del umbral de pobreza en lo que respecta al acceso al agua y varios de estos países no tienen la infraestructura mínima para tratar el agua residual que pueda generarse (WWAP, 2017).

Se estima para la región de Asia y el Pacífico que entre el 80 y el 90% de todas las aguas residuales producidas se vierten sin tratar, contaminando los recursos hídricos subterráneos y superficiales, así como los ecosistemas costeros. Europa y Norteamérica están caracterizadas por el elevado uso de los recursos y la falta de incentivos para el uso eficiente del agua, es así que grandes volúmenes de agua suministrada se traducen en aguas residuales, donde la mayoría del vertido tiene un tratamiento primario siendo este insuficiente o simplemente es colectado y vertido sin tratamiento alguno (WWAP, 2017). Finalmente, en Sudamérica y el Caribe se proyecta una inversión superior a \$ 33 billones de dólares para 2030 para aumentar la infraestructura para el tratamiento de aguas residuales y otros \$30 billones de dólares más para reducir al 50% las aguas residuales que no son tratadas (WWAP, 2017)

Todas estas estadísticas y proyecciones apuntan a un replanteamiento o un mejor aprovechamiento del agua residual, y aquí es donde un tema controvertido como el uso de la biomasa a partir del tratamiento de agua residual para el sector de la agricultura, la acuicultura y hasta la medicina o cosmética juega un papel importante y merece ser discutido. Por una parte, las entidades públicas y privadas encargadas de velar por la protección y bienestar de la población en general, deben asegurarse que las empresas dedicadas a esta labor productiva cumplan con los requisitos exigidos por la normativa vigente. Específicamente, controlar que la biomasa tenga una caracterización química, física y microbiológica según el uso que se le vaya a dar, acompañado de posibles niveles tóxicos que puedan estar presentes en el agua y vayan a ser depurados por las microalgas (Rawat et al. 2016).

Por otra parte, diferentes investigaciones han validado el uso de la biomasa generada en agua residual para la creación de fertilizantes

(Cabanelas et al. 2013), producción de pigmentos de interés en la industria alimentaria (Liu et al. 2012) y la acuicultura (Olguín, 2003). Proyectos como SABANA, con presupuesto de 10,6 millones de euros, duración de cuatro años, coordinado por España y apoyado por instituciones públicas y privadas de Italia, Alemania, Hungría y República Checa (<http://www2.ual.es/iq/?p=171>), tiene como objetivos la obtención de nuevos biofertilizantes y biopesticidas alternativos a los productos químicos convencionales ofreciendo frutas y hortalizas de mejor calidad con una producción más sostenible y segura para el consumidor, y la adición de la biomasa en la fabricación de piensos para la acuicultura y así reducir el uso de harinas y aceites de pescado, siendo estos más escasos cada vez por el agotamiento de los recursos pesqueros.

Todo lo anterior hace evidente la necesidad de mantener el debate sobre el uso de agua residual para la producción de microalgas y sus implicaciones. Estas implicaciones no solo obligan a medir las consecuencias éticas y de sanidad, sino además las repercusiones sociales y económicas para la ciudadanía en general, enfocándose en aquella población vulnerable que puede verse beneficiada con este tipo de medidas. Los lixiviados generados por la planta RSU COGERSA (Asturias, España) son el resultado de la recolección y tratamiento de los desechos sólidos almacenados en el vertedero central luego de un tratamiento químico seguido de una ultrafiltración, lo que genera el lixiviado pretratado con características únicas gracias a su tratamiento (Tabla 4.1).

Gracias a la iniciativa generada por COGERSA a través del proyecto ReCO₂very, cuyo objetivo general era el uso de microalgas para la captación de CO₂ producido por una planta incineradora y de usar el lixiviado como una fuente de nutrientes para el crecimiento de los cultivos, surgió como idea usar las propias microalgas que se desarrollan en el vertedero como una herramienta de tratamiento de estas aguas, pensando a futuro como una alternativa al tratamiento del lixiviado después de ser tratado y al mismo tiempo la producción de biomasa para múltiples usos.

Tabla 4.1 Variables fisicoquímicas del LP usado en este diseño experimental.

Parámetro	LP
pH	6,88
Alcalinidad total (CaCO ₃) (mg l ⁻¹)	22,6
Conductividad (μs m ² s ⁻¹)	11270
DBO ₅ (mg l ⁻¹)	12
DQO (mg l ⁻¹)	1010
Amonio (mg l ⁻¹)	< 5
Nitratos (mg l ⁻¹)	414
Nitritos (mg l ⁻¹)	< 1,3
Fosfato (mg l ⁻¹)	3,8
Cadmio (mg l ⁻¹)	< 0,05
Cromo Total	0,18
Cobre (mg l ⁻¹)	< 0,09
Hierro (mg l ⁻¹)	0,92
Manganeso (mg l ⁻¹)	0,09
Níquel (mg l ⁻¹)	< 0,18
Plomo (mg l ⁻¹)	< 0,2
Zinc (mg l ⁻¹)	0,08
Sulfatos (mg l ⁻¹)	< 100
Cloruro (mg l ⁻¹)	2027
Fluoruro (mg l ⁻¹)	2,3

Debido a todo lo anterior y teniendo en cuenta el estudio de la comunidad fitoplanctónica hecho anteriormente (Capítulo 2) y el mantenimiento e identificación de las cepas nativas para el estudio de crecimiento y remoción de nutrientes de LP en distintas concentraciones (Capítulo 3), surgió como objetivo para esta Tesis, la caracterización de la producción lipídica y perfil de ácidos grasos de las cepas de microalgas nativas teniendo en cuenta las concentraciones de LP a las que se encontraron los mejores resultados (ver capítulo 3). En adición a este objetivo, se hizo un seguimiento al consumo de nutrientes, producción de pigmentos fotosintéticos como clorofila *a* y β -carotenoides y la producción de carbohidratos totales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas de microalgas usadas son descritas en la tabla 4.2. Se hicieron cultivos en biorreactores de plásticos con capacidad de 3,5 L y volumen de cultivo de 3 L.

Tabla 4.2. Cepas de microalgas nativas usadas para este experimento.

Especie	Código
<i>Desmodesmus sp.</i>	Cepa A
<i>Coelastrella sp. 1</i>	Cepa B
<i>Tetracystis sp.</i>	Cepa C
<i>Chlamydomonas sp.</i>	Cepa D
<i>Acutodesmus obliquus</i>	Cepa E
<i>Coelastrella sp. 2</i>	Cepa F
<i>Chlorella sp.</i>	Cepa G

Teniendo en cuenta las concentraciones a las que las cepas dieron mejores respuesta al LP, se hicieron diluciones agua destilada estéril (121 °C durante 20 min) y usando como inóculo 300 ml de cultivo de cada cepa con densidad celular de 100.000 cel ml⁻¹, los tratamientos fueron los siguientes: Cepa A y B solo crecimiento en el medio nutritivo control correspondiente, Cepa C, D y E crecimiento en LP al 10% de concentración y Cepa F y G crecimiento en LP en concentraciones de hasta 50%. El seguimiento se realizó durante 18 días con intensidad lumínica de 100 μmol m² s⁻¹, fotoperiodo de 12 h luz-oscuridad y aireación continua. Tanto los controles como los tratamientos fueron hechos por triplicado (Fig. 4.1).

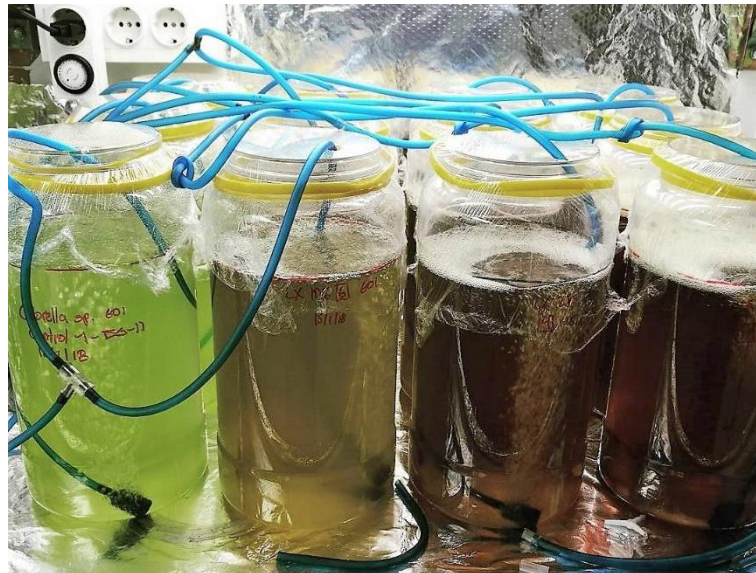


Figura 4.1 Crecimiento de microalgas en biorreactores durante 18 días.

El crecimiento fue estimado por cámara de Neubauer cada tres días en microscopio óptico. La determinación de clorofila *a* y β -carotenos se llevó a cabo siguiendo la metodología de Arredondo y Voltolina (2007) por espectrofotometría al inicio, día 9 y día 18 de seguimiento, usando acetona al 90% y extrayendo entre 24-48 h a 4 °C (Fig. 4.2). El consumo de nutrientes fue hecho en los mismos días que la determinación de los pigmentos, se tomaron muestras para luego ser filtradas con filtros de microfibra de vidrio de 47 mm y guardadas en tubos de ensayo de 15 ml a 4 °C hasta su uso. El método de cuantificación de nutrientes es el usado por el autoanalizador de flujo segmentado SKALAR San Plus siguiendo los protocolos de Nitrógeno (5-500 ppb N) y Fósforo (2-200 ppb P) del equipo.

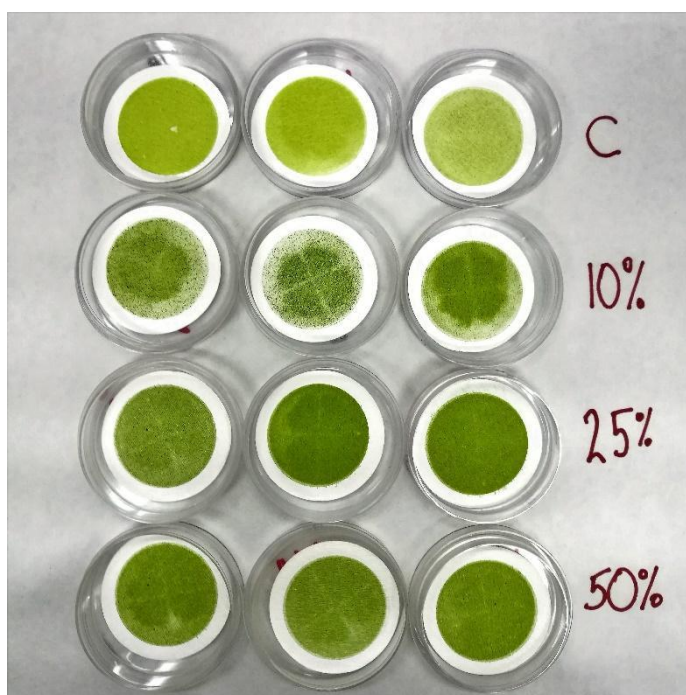


Figura 4.2 Biomasa para la determinación de pigmentos fotosintéticos.

Al cabo de los 18 días, la biomasa producida de cada cepa fue cosechada y liofilizada obteniendo una biomasa entre 0,5 y 1 g de peso seco. Entre 10 y 15 mg fueron puestos en tubos de ensayo de vidrio de 12 ml para la determinación de carbohidratos totales por métodos espectrofotométricos siguiendo el protocolo descrito por Arredondo y Voltolina (2007). Se agregó al tubo de ensayo con muestra 1 ml de H_2SO_4 1M a temperatura ambiente, con una varilla de vidrio se maceró la biomasa durante unos minutos y luego fue

puesta en un sonicador durante 15 min. Luego, se añadieron 4 ml de H₂SO₄ 1M y se taparon los tubos con papel *parafilm* y puesto en termobañó a 100 °C durante 1 h. Transcurrido ese tiempo, se dejaron enfriar a temperatura ambiente para luego centrifugar 4000 rpm durante 15 min. Se retiró el sobrenadante en un tubo de ensayo intermedio para luego tomar 1 ml de este ponerlo en otro tubo de vidrio limpio. Se añadió 1 ml de fenol al 5% y se mezcló manualmente. Se dejó reposar entre 45-60 min, enfriándose a temperatura ambiente y se leyó por espectrofotómetro a una absorbancia de 485 nm usando como blanco 1 ml de H₂SO₄ 1M. Para calcular el porcentaje o el contenido total se tuvieron en cuenta las fórmulas descritas por el manual (Arredondo y Voltolina, 2007).

La biomasa restante fue enviada al Banco Español de Algas ubicado en Las Palmas de Gran Canaria (España) para la determinación y cuantificación de lípidos totales y perfil de ácidos grasos (AG). El laboratorio analítico estimó la producción de lípidos totales usando una mezcla de cloroformo-metanol 2:1 (Folch et al. 1957) en las muestras por triplicado. Para el perfil de ácidos grasos, se realizó un proceso de trans-esterificación con H₂SO₄ al 1% en metanol obteniendo así los ácidos grasos metil esteres y luego cuantificados por Cromatógrafo de Gases (AGILENT TECHNOLOGIES GC SYSTEM) modelo 7820A.

Los AG aislados fueron separados con Helio como gas portador a una presión constante de 100 KPa usando una columna Supelcowax 10 de 30 m x 0,32 mm y 0,25 i.d (Ref.: 24080-U). La temperatura inicial de la columna fue de 170 °C durante 2 min, luego se incrementó hasta 220 °C manteniéndose por 15 min más, para un tiempo total de 40 min. La detección de los picos se realizó con un detector de ionización de llama (FID) y el método de trabajo utilizado fue en SPLIT. La temperatura de los puestos de inyección y de ionización de llama fue de 250 °C. Por último, los AG se identificaron por comparación con estándares externos (EPA 28).

Para el tratamiento de los datos, se realizaron prueba para dos muestras (Prueba T) para cepas con un solo tratamiento o entre sí y análisis

de la varianza (ANOVA) para determinar las diferencias entre la producción lipídica entre controles y tratamiento con 95% de significancia. Cuando los datos no cumplían los criterios de normalidad, se llevó a cabo una transformación a logaritmo neperiano.

RESULTADOS

Luego de 18 días de seguimiento y donde algunas de las cepas crecieron en las concentraciones de LP evaluadas anteriormente, se ha caracterizado la producción de pigmentos, carbohidratos totales, lípidos totales y perfil de ácidos grasos. De la cepa A y B, se encontraron diferencias significativas (Prueba T, p-valor = 0,0004) en su desarrollo siendo mejor la B (Tabla 4.2). Entre cepas y su tratamiento del 10% LP (cepa C, D y E), el LP mostró mejor crecimiento (ANOVA, p-valor = 0,0025) que los controles en estas cepas (Tabla 4.2). Sin embargo, ninguna de estas especies fue mejor que otra mostrando un efecto similar a la exposición de LP (ANOVA, p-valor = 0,9386). Por otro lado, las cepas F y G (Tabla 4.2) fueron significativamente diferentes los tratamientos a sus controles (ANOVA, p-valor < 0,0001) y entre cada tratamiento de cada especie (p-valor < 0,0001).

Referente a los niveles de clorofila *a* y β -carotenoides (Tabla 4.2), la cepa B produjo mayor pigmento en ambos casos (Prueba T, p = 0,0002 para Chl-*a* y p-valor = 0,00016 β -carotenoides). Para las cepas expuestas al 10% LP (Tabla 4.2), los tratamientos arrojaron mejor producción de clorofila (Prueba T: Cepa C, p-valor = 0,0302; Cepa D, p-valor = 0,0412; Cepa E, p-valor < 0,0001). Además, la cepa C fue la de mejor producción respecto a la cepa E, pero igual a la cepa D (ANOVA, p-valor = 0,0471 con E y p-valor = 0,950 con D). Con respecto a los β -carotenoides por su parte (Tabla 4.2), solo la cepa D y E mostraron mejor producción que su respectivo control (Prueba T, p-valor = 0,0266 para D y p-valor < 0,0001 para E).

Por último, de las cepas expuestas hasta 50% LP (Tabla 4.2), la cepa F obtuvo mayor producción de clorofila en LP (ANOVA, p-valor < 0,0001), siendo el mejor (Test de Tukey) a 50% LP con un 95% de confianza. La cepa G no mostró diferencias significativas en clorofila (ANOVA, p-valor = 0,3717)

respecto al control. Por último, no se encontraron diferencias en la producción de clorofila entre ambas cepas. Con los β -carotenoides, nuevamente la cepa F mostró mayor contenido de pigmento en los tratamientos (ANOVA, p-valor < 0,001) y el 50% LP con la mayor producción con un 95% de confianza. La cepa G no mostró diferencias estadísticas (ANOVA, p-valor = 0,4327) respecto al contenido de este pigmento. Comparando entre cepas tampoco se encontraron diferencias en la producción de β -carotenoides.

Tabla 4.2 Crecimiento (d^{-1}), pigmentos fotosintéticos ($\mu g\ ml^{-1}$) y biomasa total ($g\ l^{-1}$) de cepas nativas luego de 18 días de seguimiento.

Grupo 1	D. celular	T. crecimiento	Chl-a	β -carotenoides	Biomasa final
Cepa A	4,09±0,86	0,7	0,29	nd	0,161
Cepa B	11,73±0,76	1,18	3,3	2,14	0,250
Grupo 2					
Cepa C	6,79±1,22	1,33	0,224	0,015	0,190
10% LP	10,73±2,03	1,82	2,656	0,623	0,418
Cepa D	5,43±2,12	0,82	0,257	0,048	0,272
10% LP	10,39±2,35	1,14	2,948	0,892	0,418
Cepa E	3,45±2,17	0,95	0,207	0,251	0,176
10% LP	8,00±1,06	1,23	1,108	0,656	0,433
Grupo 3					
Cepa F	0,40±0,12	0,59	0,177	nd	0,396
10% LP	0,71±0,11	0,83	2,106	0,723	0,401
25% LP	0,65±0,06	0,83	1,484	1,381	0,430
50% LP	8,05±0,60	0,13	2,604	2,285	0,126
Cepa G	10,36±1,91	1,38	1,23	0,376	0,456
10% LP	9,66±1,20	1,45	10,053	3,676	0,148
25% LP	14,51±0,84	1,47	12,802	4,77	0,286
50% LP	12,65±2,17	1,27	6,54	3,405	0,132

La remoción de NT y PT al cabo de 18 días de exposición al LP fue estimada. El consumo de NT en 10% de LP se encontró entre 29-33% para las cepas C, D y E, mientras que el porcentaje de PT retirado del medio fue más variable, siendo mayor en la cepa C (62%), seguido de la cepa D (55%) y por último la cepa E (28%). Para el caso de la cepa F, el NT consumido estuvo entre 17-33,1 % siendo mayor en el tratamiento 10% LP. El PT removido fue superior al 70% y en un caso hasta 90% en concentraciones altas. Para

finalizar, la cepa G no superó el 7% en consumo de NT en los tratamientos y el PT consumido no fue superior al 80% en general.

Es interesante resaltar que para este caso, en comparación con el seguimiento de 96 h hecho previamente (Capítulo 3), 18 días fueron suficientes para determinar que el mayor retiro de ambos nutrientes ocurrió durante los primeros nueve días, mientras que en los siguientes nueve días se mantuvo constante con leves descensos respecto a la concentración inicial. Esto muestra que el crecimiento logarítmico de las especies en LP se observó hasta el noveno día y desde ese día hasta el día 18 un periodo de latencia o estabilidad.

La generación de carbohidratos totales fue variada tanto en especies como entre los tratamientos de las especies expuestas a LP, sin embargo la producción no fue superior a la estimada por los controles. La producción general fue: Cepa A > Cepa C > Cepa B > Cepa D > Cepa E > Cepa F > Cepa G, mientras que la producción en los tratamientos fue 10% LP > 25% LP > 50% LP (Tabla 4.3). Respecto a los lípidos totales, de mayor a menor, la producción fue: Cepa A > Cepa B > Cepa C > Cepa G > Cepa D > Cepa E > Cepa F, con rangos de producción entre tratamientos fue 13,32-14,75%. Con diferencias significativas (ANOVA, p-valor < 0,05), los tratamientos de LP al 10% de la cepa C y D fueron mayores que sus controles. Con la cepa F, todos los tratamientos fueron mayores que el control (ANOVA, p-valor < 0,001), siendo la mejor producción: 50% > 25%-10% > Control. Finalmente la cepa G, solo mostró diferencias significativas entre el control y 50% LP (ANOVA, p-valor < 0,005) siendo la de menor producción. Por otro lado, en la cepa F, la producción fue: Control-10%-25% > 50%.

Para el análisis del perfil lipídico, se calculó la cantidad de aceite saturado (SFA), monoinsaturado (MUFA) y poliinsaturado (PUFA), y la proporción de omega-6 y omega-3 obtenido del aceite poliinsaturado encontrado. Tanto la generación como la cantidad producida de ácidos grasos puede ser diferente en cada especie y su respectivo tratamiento, tanto las grasas saturadas como insaturadas están representadas por los ácidos grasos

energéticos o A.G.E siendo: C14:0 Ácido Mirístico, C15:0 Ácido Pentadecanoico, C16:0 Ácido Palmítico, C16:1 Ácido Palmitoleico, C18:0 Ácido Esteárico, C18:1 Ácido Oleico, C20:0 Ácido Araquídico, C20:1 Ácido Eicosenoico; y los ácidos grasos de interés biotecnológico (A.G.B); siendo las grasas poliinsaturadas: C16:2 Ácido Hexadecadienoico, C16:3 Ácido Hexadecatrienoico, C18:2 Ácido Linoleico, C18:3n3 Ácido α -Linolénico, C18:3n6 Ácido γ -Linolénico, C20:4 Ácido Araquidónico, C20:5 Ácido Eicosapentaenoico, C22:6 Ácido Docosahexaenoico. De esta manera, fue posible agrupar a las especies de mejor manera teniendo en cuenta la mayoría de atributos en términos de producción de lípidos, tanto general como específico, según la especie y al tratamiento de LP expuesto.

Tabla 4.3 Carbohidratos y lípidos totales procedentes de las microalgas nativas usadas. Los valores reportados son la media de un triplicado.

Cepa	Carbohidratos totales (%)	Lípidos totales (%)	Productividad de lípidos ($\text{g l}^{-1} \text{d}^{-1}$)
A	20,44±11,88	26,04±0,43	0,234
B	14,54±3,90	24,30±0,52	0,338
C	17,48±9,23	18,32±2,30	0,277
10% LP	8,99±,217	14,24±0,37	0,331
D	12,49±1,71	21,33±1,54	0,225
10% LP	12,96±6,98	16,47±0,06	0,382
E	9,99±5,49	14,44±1,02	0,141
10% LP	12,03±3,05	16,57±1,23	0,399
F	9,24±2,08	2,65±0,29	0,058
10% LP	7,24±1,66	9,56±0,50	0,213
25% LP	5,05±3,70	8,41±0,12	0,201
50% LP	7,09±1,99	14,07±1,01	0,099
G	8,20±2,48	19,37±0,37	0,491
10% LP	nd	16,93±0,83	0,139
25% LP	5,93±2,30	18,28±1,35	0,291
50% LP	6,39±7,06	14,49±0,53	0,107

La cepa A y B produjeron mayor cantidad de lípidos insaturados (Fig. 4.3). En los tratamientos con lixiviado al 10%, las cepas C, D y E tuvieron mayor concentración de lípidos insaturados respecto a sus controles (Fig. 4.4). Por último, en los diferentes tratamientos con lixiviados en la cepa F y G, los lípidos insaturados fueron predominantes (Fig. 4.5).

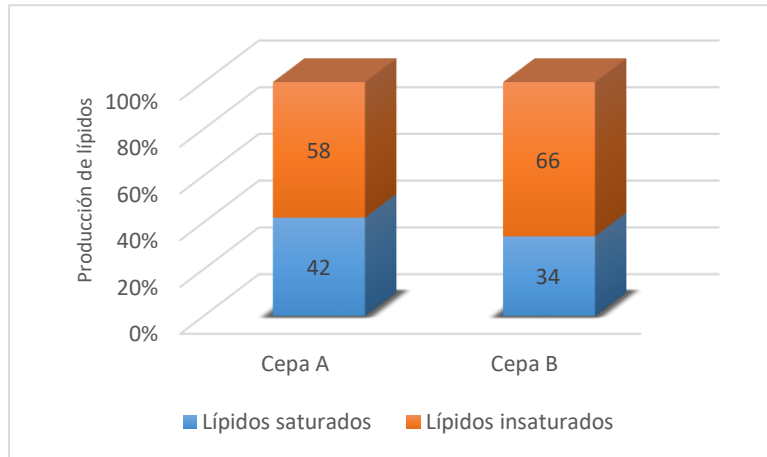


Figura 4.3 Producción de lípidos de la cepa A y B.

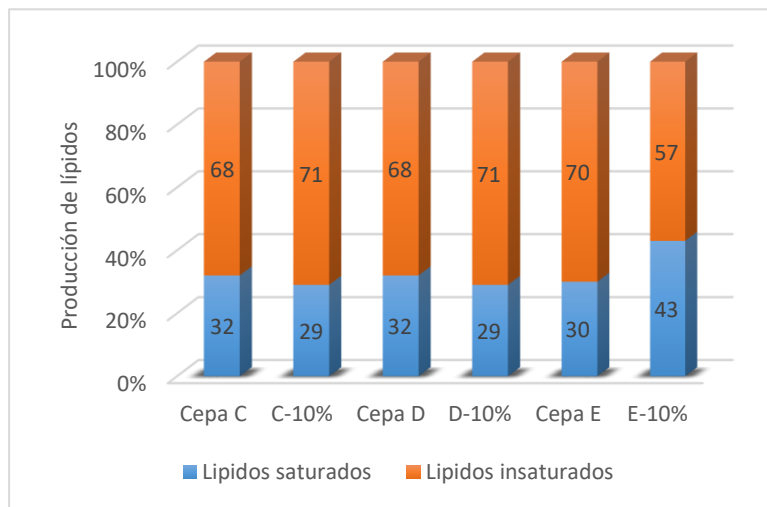


Figura 4.4 Producción de lípidos de las cepas C, D y E en lixiviado permeado al 10%.

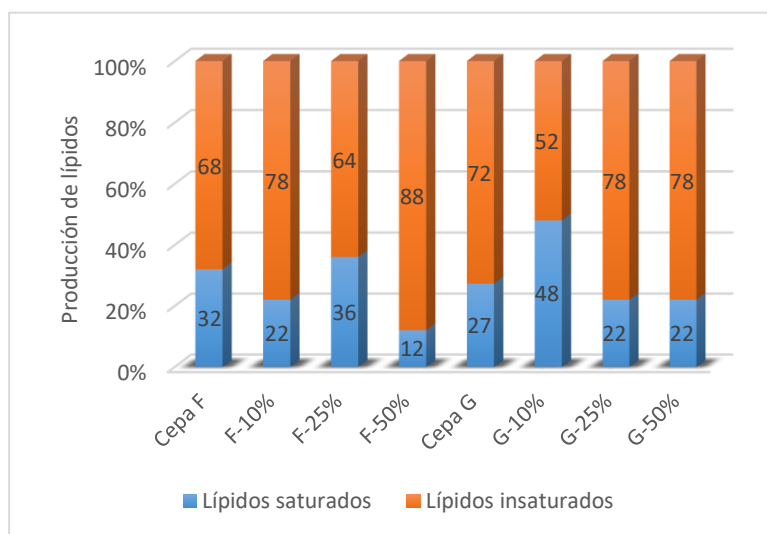


Figura 4.5. Producción de lípidos de las cepas F y G en concentraciones hasta de 50 % de lixiviado permeado.

Por su parte, la cantidad o aporte de A.G.E (Tabla 4.4) y A.G.B (Tabla 4.5) fue diferente, tanto entre las diferentes microalgas como entre los tratamientos. En general, los ácidos grasos de mayor producción de interés energético fueron C16:0, estando entre 24,66 - 37,93%, siendo la cepa A la de mayor producción y la menor la de la cepa G; en cuanto a los tratamientos, se encontró la menor concentración en la cepa F a 50% LP y la mayor la cepa G a 10% LP, con un intervalo entre 11,13-44,03%.

Tabla 4.4 Perfil de ácidos grasos con fines energéticos (A.G.E.)

A.G.E.	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C20:0	C20:1
Cepa A	0,21	0,09	37,93	1,96	3,19	33,38	0,62	0,28
Cepa B	1,1	0,27	25,33	0,72	7,39	17,96	0,3	0,1
Cepa C	0,33	0,06	29,76	0,3	1,74	22,58	0,15	0,17
C-10%LX	0,2	0,05	27,16	0,29	1,49	19,03	0,12	0,11
Cepa D	0,32	0,07	29,21	2,93	1,65	21,53	0,17	0,18
D-10%LX	0,2	0,04	27,21	4,08	1,48	17,4	0,15	0,11
Cepa E	0,7	0,31	28,56	3,25	-	20,59	0,45	0,73
E-10%LX	0,97	0,26	39,66	2,9	1,41	20,49	0,3	0,24
Cepa F	0,55	0,16	26,56	3,57	4,01	38,84	0,6	0,82
F-10%LX	0,32	0,11	19,82	2,85	1,08	16,57	0,18	0,63
F-25%LX	0,48	0,15	33,3	3,61	1,83	19,13	0,24	0,34
F-50%LX	0,11	0,1	11,13	1,21	0,55	7,08	0,18	0,53
Cepa G	0,35	0,2	24,66	2,46	1,55	19,73	0,27	0,57
G-10%LX	0,27		44,03	1,78	3,03	24,98	0,7	0,43
G-25%LX	0,19	0,21	19,97	3,5	1,35	13,99	0,38	0,41
G-50%LX	0,21	0,37	20,16	3,78	1,02	11,14	0,43	0,95

En el caso de C18:1, su presencia fue de alrededor de 17,96-38,84%, siendo las cepas B y F la menor y mayor respectivamente. En los tratamientos, la concentración de este ácido graso fue menor en la cepa F a 50% LP (7,08%) y mayor en la cepa G a 10% LP (24,98%). En lo relacionado a los ácidos grasos con interés biotecnológico, C18:2 y C18:3n3 produjeron mayor porcentaje. Para C18:2, la cepa C (27,74%) y las cepas A y F (9,34-9,42%) fueron las encargadas de producir más y menos cantidad. Por su parte, el tratamiento con mayor producción fue el de la cepa G con 25% LP y menor porcentaje en 10% LP de las cepas G y E.

Tabla 4.5 Perfil de ácidos grasos con interés biotecnológico (A.G.B.).

A.G.B.	C16:2	C16:3	C18:2	C18:3n6	C18:3n3	C20:4	C20:5	C22:6
Cepa A	0,002	0,06	9,34	0,59	6,44	0,01	0,01	0,05
Cepa B	0,04	0,06	27,33	0,02	16,16	0,01	-	0,02
Cepa C	0,02	0,1	27,74	0,01	9,03	0,11	0,03	0,05
C-10%LX	0,02	0,1	25,95	0,01	12,53	0,04	0,06	0,04
Cepa D	0,02	0,11	26,02	0,07	8,49	0,07	0,04	0,06
D-10%LX	0,03	0,09	25,41	-	11,51	0,05	0,01	0,02
Cepa E	-	1,95	10,73	1,04	6,43	0,39	0,11	0,81
E-10%LX	-	2,29	8,43	0,95	9,12	0,92	-	0,52
Cepa F	0,008	3,32	9,42	0,3	6,69	0,48	0,07	0,13
F-10%LX	0,11	5,41	11,46	0,98	20,94	0,9	0,16	0,35
F-25%LX	0,056	2,92	11,89	0,47	12,93	2,19	-	0,12
F-50%LX	-	0,26	9,31	1,59	36,33	0,51	1,56	0,6
Cepa G	0,17	0,25	25,71	0,35	10,19	0,35	0,3	0,38
G-10%LX	0,03	0,08	8,05	0,64	7,36	0,09	0,14	0,11
G-25%LX	0,26	0,22	29,69	0,43	16,72	0,36	0,34	0,33
G-50%LX	0,25	0,84	28,44	0,53	18,22	0,81	0,44	

Finalmente, el C18:3n3 fue encontrado con mayor presencia en la cepa B (16,16%) y menor presencia en las cepas A, E y F, con valores inferiores al 7%; por su parte, el más productivo de los tratamientos fue 50% LP para la cepa F, con 36% aproximadamente, mientras que el de menor porcentaje fue 10% LP de la cepa G, con menos del 8%. Cabe mencionar que C20:4, C20:5 y C22:6, los ácidos más buscados en microalgas, no tuvieron una producción superior a 1,5% en ninguno de los ensayos bajo las condiciones experimentales aquí usadas.

DISCUSIÓN

Entre las cepas sin exposición al LP, la cepa A obtuvo menor producción de biomasa y de pigmentos en comparación a la cepa B. Entre las especies que fueron expuestas solamente a 10% LP (Cepa C, D y E), los cultivos control mostraron menor tasa de crecimiento y contenido de pigmento generado respecto al tratamiento (Tabla 4.2). Por otra parte, las cepas F y G tuvieron respuestas similares en los tratamientos de 10 y 25% de lixiviado en cuanto a

la tasa de crecimiento y contenido pigmentario. Además, el tratamiento al 50% de la cepa G y F tuvieron menor tasa de crecimiento afectando directamente a una producción de biomasa menor al control, no obstante, se comportan de forma similar en la producción de pigmentos como en los demás tratamientos (Tabla 4.2).

Contrastando, se encuentran especies como *C. vulgaris* que obtuvo una producción de entre 15 mg L⁻¹ y 35 mg L⁻¹ de clorofila *a* en lixiviado al 7% a lo largo de 8 días (Chang et al. 2018); *Kirchneriella* sp. que, después de 21 días en agua residual, generó niveles superiores a 5 mg L⁻¹ tanto de clorofila como de β -carotenos (Frampton et al. 2013) o *C. pyrenoidosa* donde la exposición a distintas dosis de lixiviado-agua residual generó mayor cantidad de clorofila *a* respecto a su control (Zhao et al. 2014). Adicionalmente, se ha determinado la capacidad productora de pigmentos de *Coelastrrella* sp. F50 bajo condiciones de estrés salino, nutrientes e intensidad lumínica en fase estacionaria durante un mes (Hu et al. 2013).

Se debe tener en cuenta que la producción de pigmentos fotosintéticos se debe principalmente a la disponibilidad de la luz para su crecimiento y la intensidad con que esta luz sea emitida y captada por las células es de gran importancia ya que afecta directamente la fotosíntesis. Teniendo presente dicha intensidad lumínica, las células pueden inhibirse o aclimatarse haciendo un mejor aprovechamiento de la luz y directamente de la eficiencia fotosintética (Juneja et al. 2013). Es conocido que para una buena generación y acumulación de pigmentos es necesario un cultivo a mayor escala como también establecer dos fases de crecimiento donde la primera se basa en el aumento de la biomasa bajo condiciones ideales y la segunda fase donde se genera el estrés adecuado para el aumento de pigmentos (Sun et al. 2018).

Teniendo en cuenta estas condiciones para este caso, concentraciones de 10 y 25 % LP fueron suficientes para el aumento de los pigmentos y a su vez en una sola fase de cultivo. Es posible que las características, tanto químicas como físicas del lixiviado sean suficientes para que la diferencia entre los pigmentos generados entre controles y tratamientos deba ser tenida

en cuenta, sin embargo, es necesario seguir haciendo análisis a futuro donde la tasa de dilución del lixiviado sea óptima para incrementar la producción de biomasa de forma que no sea necesaria una segunda fase de estrés para la generación de pigmentos.

Otra de las características generales del lixiviado es su color oscuro, pudiendo alterar la capacidad de captación de luz por parte de las células teniendo que adaptarse a dicha situación. Dicha fotoadaptación puede ocurrir a través de múltiples mecanismos como los cambios en los tipos y cantidades de pigmentos, la tasa de crecimiento o la disponibilidad de ácidos grasos esenciales (Fábregas et al. 2004). Esto coincide con lo encontrado en las tasas de crecimiento y concentración de pigmento (Tabla 4.2) por parte de las cepas expuestas al lixiviado en comparación a los controles. Además, la producción de ácidos grasos insaturados se vio también beneficiada en presencia del lixiviado en todas las cepas expuestas a los tratamientos (Fig. 4.4. y Fig. 4.5.).

Sobre la base de haberse usado un fotoperiodo básico de 12:12 luz-oscuridad en este experimento, este parámetro puede tener algo que ver en la producción de pigmentos como de biomasa ya que, al tener mayor intensidad lumínica, los resultados aquí obtenidos podrían cambiar. Se demostró que *Nannochloropsis* sp. expuesta a condiciones limitadas de luz, un aumento gradual de la intensidad lumínica generó mayor producción de proteína al tiempo de una disminución en la concentración de carbohidratos y lípidos (Fábregas et al. 2004). Para este caso, independiente del tratamiento de lixiviado usado, el color de este parece ser suficiente para generar una limitación en la disponibilidad de luz en los diferentes ensayos, y dar mayor contenido de pigmentos, producción de biomasa y ácidos grasos insaturados respecto a las condiciones habituales como lo fueron los ensayos control.

En los últimos años se han investigado diferentes usos de la biomasa microalgal más allá de sus cualidades nutricionales, por ejemplo, para el uso de las biomoléculas o compuestos como los pigmentos a modo de alternativa a ciertos aditivos en la industria alimentaria, siendo cada vez más demandados, reemplazando los típicos suplementos de origen químico

(Chacón-Lee y González-Mariño, 2010). Reportes han demostrado la posibilidad real de la inclusión de esta biomasa como pigmento e ingrediente funcional en productos alimentarios. Pigmentos como astaxantina, ficocianina o β -carotenos encontrados en especies marinas y de agua dulce, han llegado a ser usados no solo en la industria alimentaria sino cosmética (Grubišić et al. 2019; Sun et al. 2018; Varfolomeev y Wasserman, 2011).

Respecto a la captación de nutrientes, cada especie tuvo diferentes niveles de remoción demostrando la singularidad de cada especie según el medio en el que se encuentre. El radio N:P encontrado para este experimento fue muy superior (datos no mostrados) teniendo como referencia teórica una tasa de N:P = 16. Por otra parte, esto puede mostrar que, a pesar de que el lixiviado pase por el mismo proceso de tratamiento una y otra vez, sus características químicas no siempre serán las mismas. En el caso de *Desmodesmus* sp y *Scenedesmus obliquus* (Hernández-García et al. 2019), la tasa N:P estuvo por encima al teórico, siendo en ese caso el factor limitante el nitrógeno. Luego de establecer una tasa N:P adecuado, la remoción de nitrógeno y fósforo fueron de 41% y 78% respectivamente. Por otra parte, concentraciones superiores al 10% de lixiviado limitaron el crecimiento teniendo como característica una baja penetración de luz en los cultivos gracias al color del lixiviado (café oscuro), lo cual resulta en una intensidad lumínica insuficiente ($53 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$, siendo probablemente un factor inhibitorio para el crecimiento.

Pruebas con *Desmodesmus* sp. y otras dos especies de cianobacterias (cultivo mixto) mostraron un consumo entre 55% y 83% del nitrógeno disponible y 30% a 60% del ortofosfato en agua residual dispuesta en sistemas abiertos de 20 L y fotoperiodos de 12:12 luz-oscuridad (Komolafe et al. 2014). Ellos determinaron que el bajo consumo de fósforo pueda relacionarse al tiempo de residencia del cultivo en el medio, ya que al superar dicho tiempo, las células retornan los nutrientes al medio durante o posterior a su muerte. Esto coincide con ensayos previos realizados a lo largo de este trabajo donde las microalgas expuestas al lixiviado durante rangos distintos de tiempo

mostraron ligeros incrementos en la concentración de nutrientes durante y posterior al seguimiento.

Después de probar 11 especies diferentes (Xin et al. 2010), establecieron que *Scenedesmus* sp. LX1, una especie propia de agua residual, no solo fue la mejor en la captación de nutrientes sino también la de mejor producción de lípidos respecto a las otras especies que no se desarrollaban de forma natural en la planta de tratamiento de aguas residuales. Esto refuerza la idea de usar microalgas propias del sistema de tratamiento, ya que al estar adecuadas a estas condiciones en comparación a una cepa que no lo está, son mejores candidatas en la fitorremediación de estos sistemas.

Para el caso de producción de lípidos, se han encontrado diferentes estudios relacionados con la producción de ácidos grasos (Tabla 4.7) y cómo su variación puede verse afectada no solo debido a la tasa de dilución a la que puede estar el agua residual o lixiviado, sino también por el tiempo de exposición y las especies usadas. Fuentes de nutrientes como el agua residual y lixiviados de residuos urbanos han sido probados de forma individual y como una mezcla respecto a los medios nutritivos estándar en el cultivo de microalgas (Ferreira et al. 2019; Hernández-García et al. 2019; Komolafe et al. 2014).

Tabla 4.7 Comparativa en la producción de ácidos grasos saturados (SFAs), monosaturados (MUFAs) y poliinsaturados (PUFAs) en diferentes cultivos con agua residual y/o lixiviados.

Lípidos	Este trabajo		Ferreira et al. 2019		Hernandez-Garcia et al. 2019		Komolafe et al. 2014
	Sin LP	Con LP	Medio comercial	Agua residual	Lixiviado 0%	Lixiviado 7%	Agua residual
SFAs	27,3-42	12,9-48,1	17,7-64,8	27,8-63,6	32,1-38,8	30,4-34,5	37,9-59,2
MUFAs	21,6-46,1	14,4-33,4	31,2-42,6	35,6-47,1	7,6-11,9	7,6-10,3	18-38,2
PUFAs	18,6-44,2	22,1-73,7	27,3-46,	5,8-32,3	49,3-60,4	55,2-62	12,1-34,3

Los resultados aquí encontrados tanto de SFAs como MUFAs entran entre los valores medios publicados por diferentes investigadores (Tabla 4.7). Por otra parte, los rangos aquí presentados son el resultado de la producción de una sola especie (este trabajo) respecto a otros donde no solo han sido probados monocultivos (Ferreira et al. 2019; Hernández-García et al. 2019)

sino en cultivos mixtos (Komolafe et al. 2014). Es de resaltar que la formación de ácidos grasos en condiciones óptimas de cultivo se encuentran entre los valores reportados en otros trabajos (Tabla 4,7), mientras que los datos de producción de lípidos en microalgas en el tratamiento de aguas residuales sugieren un resultado beneficioso pensando en la generación de PUFAs dependiendo teniendo en cuenta la concentración del medio y la especie a usar.

Enfocándose en la producción de AG, estos lípidos debe cumplir requerimientos básicos, como el poseer una cadena larga de carbono, el grado de insaturaciones y el ratio de ácidos grasos saturados:insaturados (Guldhe et al. 2016). Los ácidos Mirístico (C14:0) Palmítico (C16:0) y Oléico (C18:1) han sido caracterizados como de buena calidad para la producción de biodiesel (Song et al. 2013). Comparando el contenido porcentual de estos frente a otras fuentes como el aceite de soya o el aceite de pescado (Sarpal et al. 2019), el valor de C14:0 fue inferior en este trabajo sin superar el 1% de los A.G.E tenidos en cuenta. Para el caso de C16:0, tanto los controles como los tratamientos en diferentes concentraciones de LP fueron mayores que lo encontrado en la soya o el aceite de pescado (14,1% y 17,9% respectivamente). Por otra parte, el C18:1 en los ensayos control fue inferior solamente en la cepa B, mientras que la cepa E y G al 10% de LP fueron superiores. Las demás cepas obtuvieron mejores resultados comparando solamente uno de los dos aceites y la cepa F al 50% de LP fue la única en producir por debajo de los niveles comparados (Sarpal et al. 2019).

Por su parte, los A.G.B son de gran interés por sus largas cadenas de carbono con insaturaciones sobre la cadena principal (Varfolomeev y Wasserman, 2011). En este caso, los ácidos Linoléico (C18:2) y α -Linolénico (C18:3n3) fueron los de mayor producción, tanto en controles como en LP. Comparando con el aceite de soya (Sarpal et al.2019), las microalgas aquí probadas generaron menor cantidad de C18:2, mientras que las cepas F y G al 10% LP produjeron ambos AG inferior a lo reportado. Con el aceite de atún y sardina (Suseno et al. 2014) ocurrió lo contrario, en donde los ensayos

control y los tratamientos de todas las cepas superaron la producción de estos ácidos grasos. Existe la posibilidad de que el aceite de pescado sea una baja fuente de estos ácidos poliinsaturados ya que los autores (Sarpal et al. 2019; Suseno et al. 2014) han determinado sus cantidades por debajo del 1% o inexistentes, haciendo de las cepas aquí probadas una fuente importante de estos compuestos que son considerados esenciales ya que el cuerpo no los puede sintetizar; especialmente en el caso de C18:3n3, porque de este se pueden sintetizar los ácidos eicosapentaenoico (EPA C20:5n3) y docosahexaenoico (DHA C22:6n3), altamente valorados en la nutrición (Packer et al. 2016) con un valor en el mercado de 650 USD el kilogramo (Griffiths et al. 2016)

Más allá del uso para el cual sean óptimas las microalgas, generalmente se deben tener en cuenta factores importantes como las instalaciones pensando en su capacidad, el tipo de sistema (*raceways* o fotobiorreactores), el crecimiento *indoor* o *outdoor*, entre otros. Estos componentes harán que el cultivo de microalgas no solo sea productivo sino también rentable al momento de evaluar qué tipo de producto es el que se quiere y a qué mercado va dirigido.

En el campo energético, se han realizado diferentes análisis técnico-económicos en donde se establece una producción de biomasa mínima realista de 13 g m⁻² d, con un porcentaje de lípidos entre 15%-30%, cuyo biodiesel resultante podría venderse por un valor aproximado de 5 USD el litro. Además, la producción de un litro de biodiesel con este procedimiento requeriría 8,45 Kg de CO₂, 0,3 Kg de nitrógeno, 0,02 Kg de fósforo, decenas hasta cientos de litros de agua y una demanda de energía aproximada entre 5-3000 MJ dependiendo del sistema. Para reducir los costos de esta producción, se han generado alternativas para el uso de la biomasa restante en la búsqueda de co-productos como los pigmentos, proteína para alimento animal, productos cosméticos o la fitorremediación de aguas residuales y la biomasa generada para la creación de bioestimulantes agrícolas (Louw et al. 2016).

En el caso de otras líneas de interés comercial, los carotenoides son pigmentos con colores entre café y amarillo, dependiendo de la especie que los produzca. Suelen estar agrupados en β -carotenos, astaxantina, pasando por luteína y zeaxantina, todos de gran interés comercial ya que son buscados como colorantes naturales y aditivos para alimento animal. También son solicitados en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica por su capacidad antioxidante, precursores de vitamina A y capacidad anti-inflamatoria. La síntesis de estos pigmentos puede hacerse a bajo costo y el mercado de formas naturales de β -carotenos le puede dar al comprador una percepción de una forma natural del producto, llegando a facturarse entre 2000-2500 USD el kilogramo como aditivo y superior a 100.000 USD el kilogramo como suplementos saludables (Griffiths et al. 2016).

Teniendo en cuenta toda esta información y acorde a los resultados obtenidos durante la fase de experimentación durante el crecimiento, su desarrollo en el medio y la producción de compuestos de interés, sea como uso directo de la biomasa o en la búsqueda de co-productos (Tabla 4.8), los resultados sugieren que: a) *Desmodesmus* sp. (A) y *Acutodesmus obliquus*, sin estar y estando expuestas al lixiviado, son buenos candidatos en cuanto a la producción energética; b) tanto *Coelastrella* sp. 2 al 25% de LP (F 25) como *Chlorella* sp. al 10% LP (G 10) pueden tener doble uso; c) *Coelastrella* sp. 1 (B), *Tetracystis* sp. (C) y *Chlamydomonas* sp. (D), expuestas o no al lixiviado, *Coelastrella* sp. 2 al 10% y 50% de LP, y *Chlorella* sp., tanto el control como expuesta al 25% y 50% de lixiviado, son candidatos para su explotación con fines biotecnológicos; d) se sugiere realizar más seguimientos con las cepas C y D con lixiviados, ya que los resultados en la producción de lípidos han sido similares, llegándose a plantear una concentración de lixiviado menor al 10%.

Por otra parte, el cultivo control de la cepa F requiere de mayores pruebas a futuro ya que los resultados no fueron concluyentes (Tabla 4.8), por lo que sugiere realizar pruebas a futuro con la adición de otros componentes que complementen al lixiviado u optimizando la tasa de dilución probada en cada ensayo para mejorar los resultados aquí obtenidos.

Tabla 4.8 Clasificación de los cultivos e microalgas teniendo en cuenta los atributos evaluados en este trabajo.

Cepa	Biomasa		Pigmento		Lípidos			Interés	
	SI	NO	SI	NO	SFA	MUFA	PUFA	Energía	Biotecnología
<i>Desmodesmus</i> sp. (A)		X		X	X			X	
<i>Coelastrella</i> sp. 1 (B)		X	X				X		X
<i>Tetracystis</i> sp. (C)		X		X			X		X
C 10% LP	X			X			X		X
<i>Chlamydomonas</i> sp. (D)		X		X			X		X
D 10% LP	X			X			X		X
<i>A. obliquus</i> (E)		X		X		X		X	
E 10% LP	X			X	X			X	
<i>Coelastrella</i> sp. 2 (F)	X			X					
F 10% LP	X			X			X		X
F 25% LP	X		X		X			X	X
F 50% LP		X	X				X		X
<i>Chlorella</i> sp. (G)	X		X				X		X
G 10% LP	X		X		X			X	X
G 25% LP	X		X				X		X
G 50% LP	X		X				X		X

Capítulo 5

Retos y mejoras en la producción de *Nannochloropsis gaditana* a escala industrial para la producción de lípidos

INTRODUCCIÓN

El cultivo de microalgas a escala de laboratorio ha sido, y seguirá siendo fundamental para identificar especies de interés comercial, tanto de agua dulce como marinas. Es así que la generación de biomasa como materia prima es considerada de alto valor en mercados como los biocombustibles, aditivos, alimentarios, químicos, farmacéuticos y cosméticos (Fret et al. 2017).

Al mismo tiempo, el escalado de estos cultivos a volúmenes de producción comercial es complejo ya que requiere personal con experiencia y cualificado. Este equipo de trabajo debe considerar optimizar el proceso de producción teniendo suficiente inóculo para los sistemas, minimizando así el tiempo y los costos. Teniendo en cuenta esto, el sistema de cultivo (abierto o cerrado), la fuente de nutrientes (autótrofa o heterótrofa) y el volumen de inóculo en términos de concentración celular, juegan un papel importante en dicho escalado.

Desde el punto de vista de la nutrición, las vías autótrofas y heterótrofas han sido valoradas como alternativas a gran escala. La primera vía puede requerir pasos intermedios para lograr una concentración como volumen suficiente y así poder ser escalado al siguiente nivel. Sin embargo, la segunda vía puede requerir no solo menos volumen de cultivo inicial en cada paso de escalado, sino también menos días de crecimiento apoyándose en fermentadores para optimizar el aumento de biomasa (Barros et al., 2019).

Una alternativa a la adición de nutrientes es el reciclado del medio debido a que la adición nueva de nutrientes y de agua puede aumentar los costos en la producción de la biomasa además del impacto negativo sobre el ambiente por el uso desmedido de agua, sin embargo, debe tenerse en cuenta que restos de residuos, bacterias y compuestos orgánicos excretados por las microalgas también pueden estar presentes (Fret et al. 2017).

En el caso del inóculo, se ha establecido una regla en que cada volumen escalado debe ser inoculado en una proporción de 1:10, esto indica un 10% de

volumen de inóculo respecto al volumen total en cada paso del cultivo escalado. Es posible que estos volúmenes sean variables respecto a la especie a cultivar, como en el caso de especies sensibles a la luz, en donde se hace necesario que la proporción del inóculo sea reducida a 1:5 para minimizar la foto-inhibición luego de la inoculación (Borowitzka y Vonshak, 2017)

La producción microalgal a gran escala ha sido probada desde 1950, dando un alto potencial comercial a las empresas ya que su biomasa contiene un amplio rango de moléculas de gran valor económico. No obstante, los costos de una alta producción de esta biomasa pueden restringir la comercialización de productos de valor añadido en mercados especializados como los suplementos alimentarios (Barros et al. 2019). Gran parte de los altos costos se debe a las técnicas de cultivo utilizadas y estos métodos se ven influenciados por el tipo de cepa, fuente de nutrientes y los costos de inversión inicial. Sistemas cerrados como fotobiorreactores o PBR tubulares verticales u horizontales, biorreactores con agitación y PBR en forma de panel, y sistemas abiertos como estanques, sistemas circulares, sistemas *raceways* o *race-track* han sido probados y fabricados en diferentes partes del mundo obteniendo resultados prometedores; sin embargo, problemas como la evaporación, la optimización en el uso de la luz, la calidad del producto, el periodo de crecimiento, el sistema de cosechado y costos del personal (Chew et al. 2018) siguen estando presentes, ya que estos sistemas no son óptimos para todas las especies.

Luego de escoger el sistema de producción adecuado y viable económicamente, se deben tener en cuenta problemas técnicos como la escogencia del material para la fabricación del biorreactor, la durabilidad del material, entre otros. También surgen retos desde el ámbito biológico como la concentración de oxígeno, control de la temperatura o la contaminación, que deben resolverse para que el funcionamiento a gran escala sea óptimo (Lopes da Silva y Reis, 2015). Se estima que la puesta en marcha y la optimización básica de estos sistemas tome aproximadamente tres años considerando un volumen productivo de hasta 300 000 litros (Lopes da Silva y Reis, 2015).

En la industria de los biocombustibles, por ejemplo, se cree que con las tecnologías existentes, su producción sea hasta cinco veces más cara que la de los combustibles fósiles, dependiendo básicamente del rendimiento del cultivo, diseño del sistema de cultivo y el método de cosecha empleado; además, la generación de coproductos (inherentes a la producción de la biomasa u otros compuestos) y su valor de estos en el mercado respecto a los biocombustibles tiendan a ser mejor valorados económicamente (de Boer y Bahri, 2015).

De la información técnico-económica que se encuentra publicada con relación a la producción de biomasa a nivel industrial, dichos análisis económicos se han orientado de sistemas abiertos o híbridos (usando biorreactores cerrados para la producción del inóculo para luego ser escalado en los sistemas abiertos) y, en sistemas cerrados como PBRs, esto ha causado que dicha información no pueda ser comparable ya que los rendimientos y costos referidos a los sistemas de cultivo, diferentes cepas y condiciones socioeconómicas diferentes hacen dichas predicciones poco realistas (Tredici et al. 2016).

Sin embargo, las grandes diferencias en los costos de producción son, principalmente, la variabilidad en la productividad de los cultivos, el escalado, el sistema de cultivo y los nutrientes. En los diferentes escenarios probados teniendo en cuenta sistemas abiertos y cerrados (Vuppaladiyam et al. 2018), el costo relacionado al escalado es el de mayor incertidumbre ya que los datos de casos reales son pocos teniendo que extrapolar una producción a escala laboratorio o planta piloto. Los mismos autores mencionan como segunda variable que juega un rol importante en el análisis económico el sistema de cultivo como tal, sistemas abiertos (*raceways*) y cerrados (tubulares o tipo panel) han mostrado productividades de los cultivos cambiantes dependiendo del tipo de adaptación que tengan las cepas a dichos sistemas.

Un estudio comparativo sobre la producción de biomasa algal en sistemas de *raceways*, PBRs tubulares y tipo panel, teniendo en cuenta el

área productiva de 1-100 ha fue valorada económicamente (Norsker et al. 2011). Dicho trabajo encontró que el sistema PBR tubular en un área productiva de 1 ha (€9,90) y 100 ha (€ 4,15) fue el sistema de menor costo para producir 1 Kg de biomasa seca, mientras que el tanque tipo *raceway* en 1 ha y 100 ha de área productiva, produjo 1 Kg de biomasa seca por €17,72 y €4,95 respectivamente. Además, los mayores costos en dichas proyecciones están relacionados a la radiación lumínica, eficiencia fotosintética y los nutrientes usados.

En los últimos años, especies como *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis* sp., *Tetraselmis* sp., *Phaeodactylum tricornutum* o *Arthrospira platensis* han sido producidas a gran escala en diferentes sistemas de producción con rendimientos y generación de biomasa o co-productos a diferentes niveles (Barros et al. 2019; Quelhas et al. 2019; Pereira et al. 2018; Zhu et al. 2018; Fret et al. 2017); resultado de esto, se han establecido tasas de mitigación de CO₂ en fotobiorreactores tubulares, reciclado de agua y nutrientes en biorreactores de paneles, uso de medios heterotróficos como herramienta de bajo costo y sostenible en el tiempo en fotobiorreactores como fermentadores y prueba de sistemas productivos a bajo costo.

Puntualmente, el género *Nannochloropsis* es conocido por una producción de lípidos totales de entre 12% y 53% (Mata et al. 2010), en especial, *N. gaditana* es de gran interés por su alto contenido de grasas poliinsaturadas entre los cuales se encuentran el Ácido Linoleico (C18:2n6), Ácido α -Linolénico (C18:3n3, ALA), Ácido Araquidónico (C20:4n6, ARA), Ácido Eicosapentaenoico (C20:5n3, EPA) y Ácido Docosaheptaenoico (C22:6n3, DHA) (Mitra et al. 2015; Brown et al. 1997).

Estos compuestos hacen que dicha especie pueda situarse en un nicho de mercado para el consumo humano (10⁴ ton año) o para animales (10⁵ ton año) acercándose a la producción real de biomasa a nivel global de 10⁴ ton por año (Vuppaladadiyam et al. 2018). En escenarios diversos y teniendo en cuenta parámetros como la ubicación geográfica (sur-centro-norte de Europa), especies a producir, área productiva (10-100 ha) y producto final como EPA-

DHA (van der Voort et al. 2017), el costo de producir un 1 Kg de biomasa seca tanto en el panorama optimista como conservador fue de \$3,14 y \$9,15 respectivamente, mientras que 1 Kg de aceite EPA/DHA en la proyección optimista fue de \$12,57 y conservadora de \$43,76. Para este caso, la diferencia en costos de estas proyecciones es debido al precio de la maquinaria necesaria para producir y centrifugar la biomasa.

Debido a su geografía, el sur de España brinda condiciones climáticas ideales para la producción de algas, obteniendo mejores rendimientos en costo-efectividad en diferentes sistemas de cultivo (Quelhas et al. 2019; Vuppaladadiyam et al. 2018); sin embargo, esta área también es reconocida por épocas de largas sequías y bajas precipitaciones, obligando a reducir los volúmenes de agua requeridos. En cambio, la zona norte es conocida por gran vegetación y altas tasas de precipitación, pero condiciones ambientales como la irradiación solar y la temperatura hacen que las empresas dedicadas a la producción de microalgas usen parte de su inversión en la adecuación de instalaciones para el mantenimiento de los cultivos haciendo que el gasto sea mayor en la construcción de invernaderos, sistemas de tuberías complejos para el bombeo y conducción de agua, conexiones eléctricas complejas, entre otros.

ALGATEK S.L. es una empresa de inversión privada creada hace cinco años, ubicada al suroeste de la ciudad de Oviedo, en Asturias. Esta empresa maneja especies como *A. maxima*, *P. cruentum* y *N. gaditana*, especies con una valoración económica notable en el mercado (Borowitzka, 2013) debido a su contenido de proteína, hidratos de carbono en forma de azúcares, lípidos en forma de ácidos grasos poliinsaturados y pigmentos como ficocianina y ficoeritrina. La continua búsqueda para la optimización y mejoramiento, tanto en las condiciones de cultivo como del sistema de producción, hace que esta empresa y muchas otras centren esfuerzos en realizar mayor inversión en investigación y desarrollo y así estar a la vanguardia en el mundo empresarial y a su vez elaborar productos que satisfagan las necesidades del mercado.

Debido a las necesidades de establecer una metodología base para la producción de *N. gaditana*, enfocándose en la producción de lípidos y generación de ácidos grasos poliinsaturados como omega-3 y omega-6, el objetivo de esta investigación es la optimización en la producción de la microalga *N. gaditana* desde escala de laboratorio hasta fotobiorreactores (PBR) de 700 L, siendo este volumen el inóculo de un PBR con capacidad de 30 m³ dividido en tres secciones de 10 m³ cada una. En paralelo, se estimaron diferentes costos relacionados a algunas materias primas que son importantes en la producción de biomasa en dicha empresa.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en las instalaciones de ALGATEK (43°10'09.6"N-6°05'55.8"W). Las condiciones del PBR de donde fue tomado el inóculo de *N. gaditana* eran 22±1 °C de temperatura, fotoperiodo de 12 h luz-oscuridad, pH a 7,5 con adición de CO₂ para su control.

Los nutrientes utilizados fueron Proline (Proline-Pentair) en dos soluciones: solución A contiene los macronutrientes y solución B contiene minerales y metales traza. Dichas soluciones eran dosificadas 1,3 ml L⁻¹ cada una. Para mayor control de la toma de muestras y su seguimiento, se diseñó un calendario de cultivo que tuviera en cuenta inicio y final de cada etapa de los escalados, toma de muestras y medición de parámetros (Tabla 5.1), y un esquema general indicando la cantidad de nutrientes, sal y volumen de inóculo para cada momento de escalado (Fig. 5.1).

El diseño de escalado se dividió en tres etapas: a) Inóculo y crecimiento en botellas de 1 L, b) Inóculo y crecimiento en botellas de 20 L y c) Inóculo y crecimiento en PBR de 700 L. El seguimiento de los cultivos de 1 y 20 L fue hecho en la sala de inoculación del laboratorio, mientras que el cultivo en PBR fue realizado en la zona de producción.

Tabla 5.1 Calendario de cultivo y escalado de *N. gaditana*. IB inóculo botella, IPBR inóculo PBR, TM toma de muestra, C cosechado.

Inicial	Día 1	Día 3	Día 6	Día 9
IB-1L	TM-1L	TM-1L	TM-1L	TM-1L / IB 20L
Día 10	Día 12	Día 15	Día 19	Día 20
TM-20L	TM-20L	TM-20L	TM-20L / IPBR-700 L	TMPBR-700L
Día 22	Día 25	Día 29		
TMPBR-700L	TMPBR-700L	CPBR-700L		

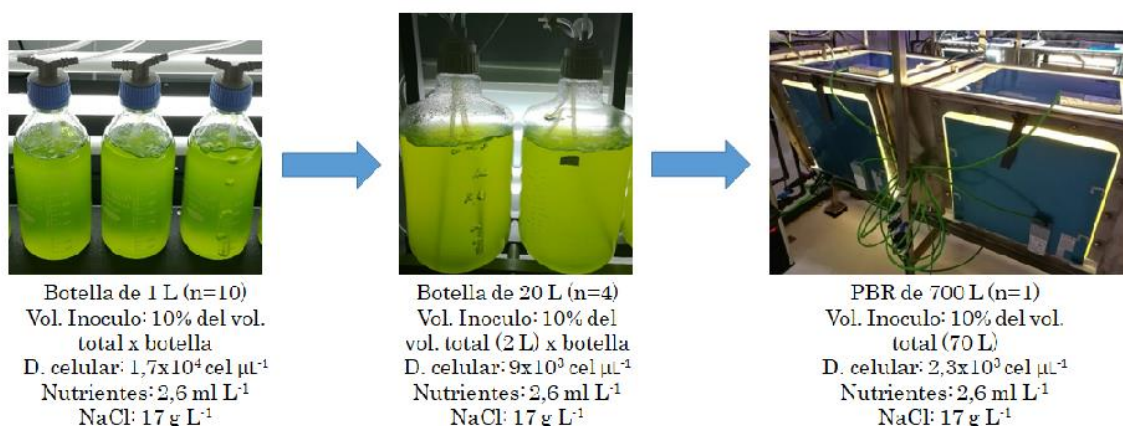


Figura 5.1 Esquema general del diseño de escalado de *N. gaditana*.

Antes de iniciar, todo el material necesario para llevar a cabo el diseño experimental fue lavado y esterilizado en autoclave a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 min. Para el cultivo en botellas de 1 L, se usaron 10 botellas de vidrio con tapón de doble vía y aireación por burbujeo. La intensidad lumínica media fue $28,8 \pm 5,1 \mu\text{mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, con fotoperiodo de 12 h luz-oscuridad emitida por dos tubos de luz halógena (Fig. 5.2) y sin dosificación de CO_2 . La decisión de no suministrar CO_2 se debe a que es uno de los gastos en la producción de la biomasa que la empresa quiere suprimir teniendo en cuenta el gran volumen de cultivo que se maneja a diario. Para determinar la concentración celular, se tomaron muestras de tres botellas al azar a los día 1, 3, 6 y 9 de crecimiento en tubos de ensayo limpios previamente con isopropanol al 70% y lavados varias veces con agua destilada, y se hicieron conteos por cámara de Neubauer por triplicado en microscopio óptico.



Figura 5.2 Cultivo de *N. gaditana* en botellas de 1 L.

Al noveno día de crecimiento, se realizó el escalado a cuatro botellas de 20 L, las cuales llevaban tapones de triple vía, y se usó el mismo tipo de aireación que en los cultivos de 1 L. La fuente de luz estaba compuesta por cuatro tubos de luz halógena con una intensidad lumínica media total de $124,5 \pm 10 \mu\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ y fotoperiodo de 12 h (Fig. 5.3). De igual manera que en las botellas de 1 L, se hicieron conteos por triplicado al microscopio en los días 10, 12, 15 y 19. Por último, se tomaron 20 ml de cada botella para determinar el peso seco inicial y final al cabo de 10 días de seguimiento en esta etapa del escalado. Las muestras se filtraron mediante filtros de membrana de 47 mm de diámetro y tamaño de poro $0,2 \mu\text{m}$ (VWR). Los filtros se secaron en horno a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 h y finalmente en desecador por 10 min antes de pesar. El peso se realizó en balanza analítica de cuatro cifras (VWR) antes y después del filtrado y así se determinó la biomasa. Tanto los cultivos de 1L y 20 L tuvieron temperatura programada a $21 \text{ }^\circ\text{C}$ y no tuvieron dosificación de CO_2 .



Figura 5.3 Cultivo de *N. gaditana* en botellas de 20 L.

En el día 19 de seguimiento se llevó a cabo el último paso del escalado a PBR de 700 L (Fig. 5.4). Este PBR está fabricado en acero inoxidable con forma cónica y tiene cuatro ventanas en vidrio templado de 1 cm de grosor y dos ventanas en la parte superior con tapa en metacrilato, en estas ventanas están ubicados los paneles de luz led. La toma de muestras para el conteo se hizo en los días 20, 22, 25 y 29 de seguimiento usando una jeringa de 50 ml con una manguera introducida hasta la mitad de la profundidad del PBR y puesta en botes plásticos limpiados previamente con isopropanol al 70% y lavados varias veces con agua destilada. En este caso, el fotoperiodo fue 24:0 luz-oscuridad, controlado por medio de seis paneles de luz led (cuatro a los lados y dos en la parte superior del reactor) con una intensidad total media de $253,4 \pm 26,9 \mu\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ ((Wholesale Inc) modelo PL-55W-66-28-TG-01, por su parte, una bomba de aireación soplante, compuesta por una manguera con micro-burbuja y controlada por una válvula de paso central en PVC de forma manual, está situada en la base del sistema. Finalmente, la temperatura del cultivo fue de $25 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$, siendo controlada por un sistema helicoidal en la base del reactor y como complemento se usó un equipo de calentamiento-enfriamiento Chiller que toma el agua del medio, la pasa a través del calentador y la deposita al sistema nuevamente.

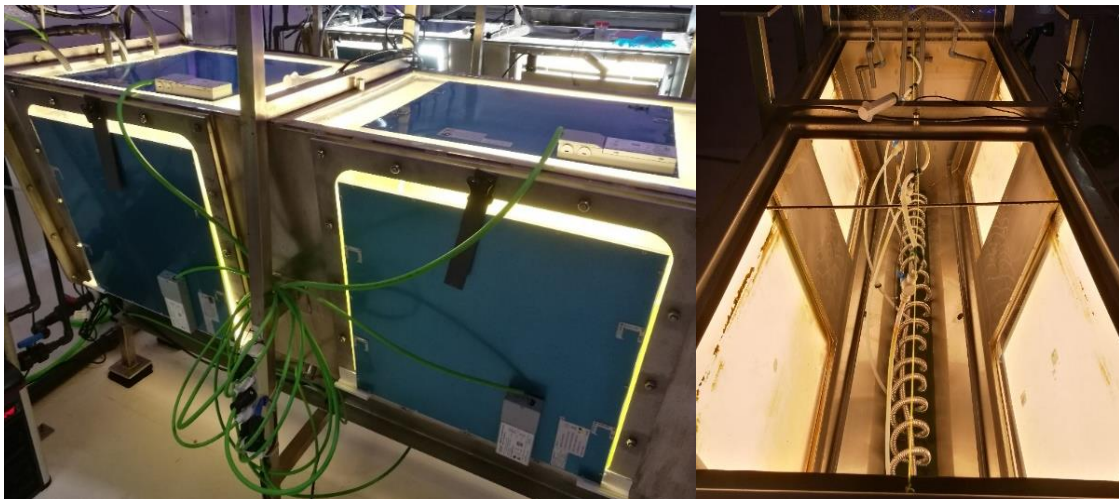


Figura 5.4 PBR con capacidad de 700 L usado en el escalamiento de *N. gaditana*.

Por otra parte, se llevó a cabo el pesado en seco al inicio y final del seguimiento nuevamente. En las tres etapas de escalado se hizo el

seguimiento del pH por medio de un pH-metro de mesa (VWR) para determinar el rango de variación al no tener CO₂ controlando el medio. Acabado el seguimiento, el PBR fue cosechado por centrifugación con capacidad de 750 L h⁻¹ (EVODOS) y la biomasa fue pesada (Fig. 5.5). Posteriormente, se tomó una muestra para ser congelada a -80 °C y luego fue liofilizada durante 48 h para asegurarse de que la biomasa quedase con la menor cantidad de humedad posible.

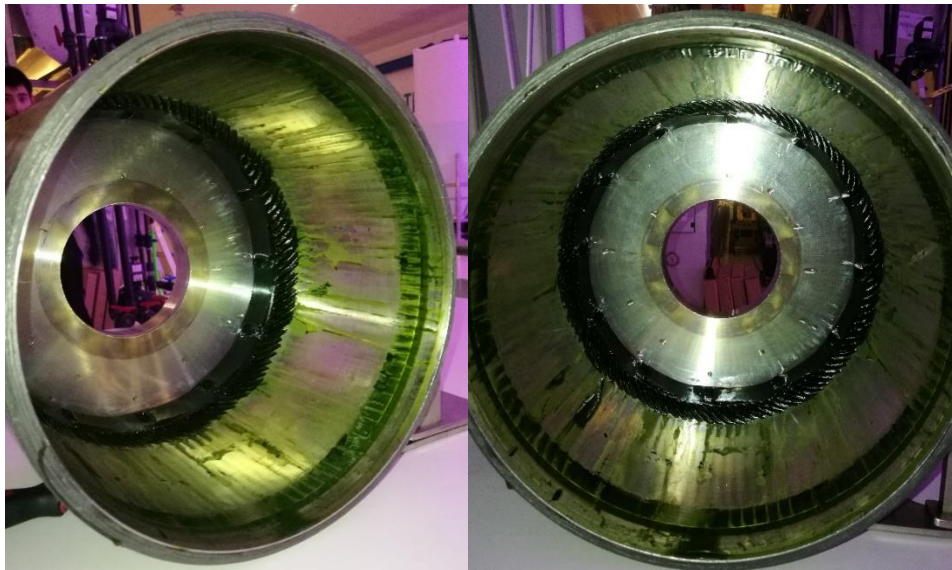


Figura 5.5 Centrifugación y obtención de la biomasa luego de 29 días de seguimiento del cultivo de *N. gaditana*.

La biomasa liofilizada se envió al Banco Español de Algas (BEA, Las Palmas de Gran Canaria) para la determinación de lípidos totales y un perfil de ácidos grasos detallado. El laboratorio analítico estimó la producción de lípidos totales usando una mezcla de cloroformo-metanol 2:1 (Folch et al. 1957) en las muestras por triplicado. Para el perfil de ácidos grasos, se realizó un proceso de trans-esterificación con H₂SO₄ al 1% en metanol, obteniendo así los ácidos grasos metil-esteres y luego cuantificados por Cromatógrafo de Gases (AGILENT TECHNOLOGIES GC SYSTEM) modelo 7820A. Los AG separados fueron separados usando Helio como gas portador a una presión constante de 100 KPa en una columna Supelcowax 10 de 30 m x 0,32 mm y 0,25 i.d (Ref.: 24080-U).

La temperatura inicial de la columna fue de 170 °C durante 2 min, luego se incrementó hasta 220 °C, manteniéndose por 15 min más; para un tiempo total de 40 min. La detección de los picos se realizó con un detector de ionización de llama (FID) y el método de trabajo utilizado fue en SPLIT. La temperatura de los puestos de inyección y de ionización de llama fue de 250 °C. Por último, los AG se identificaron por comparación con estándares externos (EPA 28).

Para el tratamiento de los datos, se realizaron diagramas de caja para determinar el comportamiento de la densidad celular y el pH con respecto a los volúmenes de escalado del cultivo. Además, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar diferencias significativas en la densidad celular y pH durante todo el escalado. Referente al contenido de lípidos totales y porcentaje de ácidos grasos en la biomasa, se realizó una comparación descriptiva teniendo en cuenta los análisis hechos anteriormente por la empresa en otros laboratorios y los encontrados en este trabajo.

Como parte del acuerdo de colaboración con la empresa, los resultados obtenidos en este trabajo fueron presentados en diferentes sesiones con los trabajadores y la gerencia de la empresa para darles asesoría y recomendaciones en la optimización en el proceso productivo. Finalmente, se determinaron costos de algunas de las materias primas usadas cotidianamente en dicho proceso para que la gerencia de la empresa pueda darle a la biomasa un precio competitivo en el mercado.

RESULTADOS

Después de 29 días de seguimiento de *N. gaditana* desde cultivos de 1 L hasta PBR de 700 L (Fig. 5.6 y Fig. 5.7)) y no tener problemas durante el crecimiento en cada fase, el volumen sobrante o de respaldo (2 L en la primera etapa y 10 L en la segunda etapa) fue tenido en cuenta al momento de inocular el siguiente volumen de cultivo.

Teniendo en cuenta lo anterior, se determinó una concentración final, al cabo de nueve días de $4,1 \times 10^7$ cel ml^{-1} y una variación de pH entre 6,3 y 9

y la tasa de crecimiento media se estimó en $0,90 \pm 1,40 \text{ d}^{-1}$ en la primera fase del escalado (Fig. 5.6 y Fig. 5.7). En la segunda etapa del escalado (20 L), la concentración celular luego de 19 días fue de $1,5 \times 10^7 \text{ cel ml}^{-1}$ (Fig. 5.6) y un rango de pH entre 5,8 y 9 (Fig. 5.7).

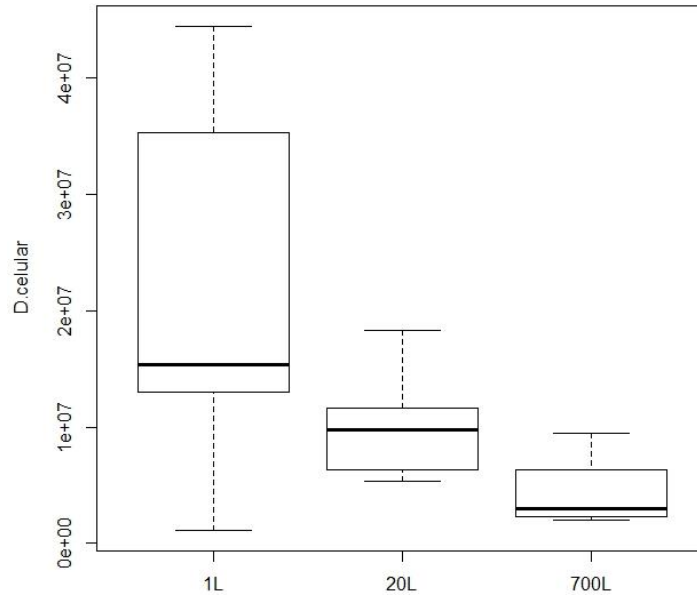


Figura 5.6. Distribución de la densidad celular en cada uno de los volúmenes de cultivo.

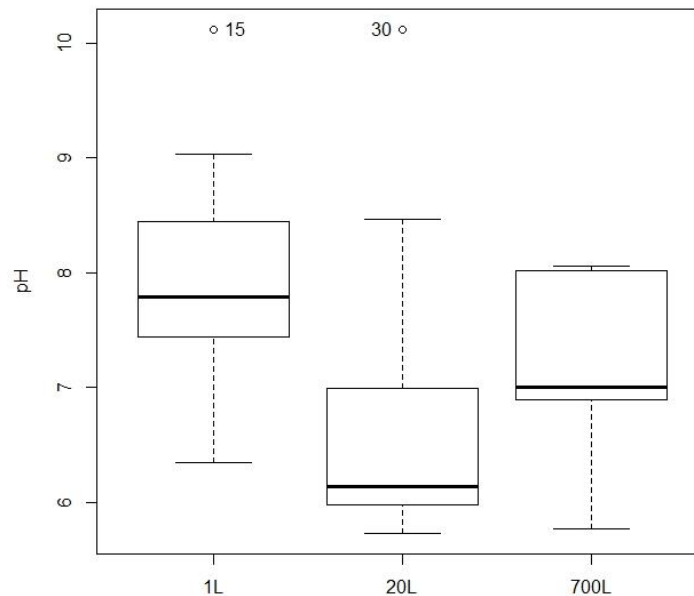


Figura 5.7. Distribución del pH cada volumen del cultivo.

La biomasa registrada de los cultivos al principio de esta segunda parte del escalado fue una media de $0,33 \text{ g L}^{-1}$ y al día 19 de $0,45 \text{ g L}^{-1}$, dejando una productividad diaria de $0,012 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Se pudo observar que durante los primeros tres días el cultivo decayó y comenzó a crecer después del día tres. Por su parte, el pH mostró pequeñas variaciones hasta el día seis donde aumentó en forma notoria.

Por último (etapa tres del escalado), en el PBR se encontró un crecimiento final (día 29) de $9,5 \times 10^6 \text{ cel ml}^{-1}$ (Fig. 5.6) y un pH entre 6,9 y 8,1 aproximadamente (Fig. 5.7). De nuevo, se observó una disminución en la concentración celular durante 24 h desde su inoculación, teniendo el registro de pH más bajo. Entre las 24 y 72 h el cultivo comenzó a crecer y de nuevo los valores de pH aumentaron; esto coincide con lo visto en cultivos de 20 L. La biomasa inicial reportada fue de $0,30 \text{ g L}^{-1}$ y final de $0,42 \text{ g L}^{-1}$, siendo $0,03 \text{ g}$ menos que lo visto en la segunda etapa de escalado; esto indica una transferencia de biomasa desde botellas hasta el PBR superior al 90%, teniendo posibles pérdidas por la adherencia de biomasa en las paredes de las botellas durante el crecimiento.

Otra posible razón para esto es que, al aumentar el volumen de cultivo, la cepa de *N. gaditana* toma un poco más de tiempo en adaptarse a las nuevas condiciones de crecimiento. La productividad diaria en este paso fue de $0,012 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, la misma que en botellas de 20 L. Luego de centrifugar el volumen total en dos tiempos, la biomasa cosechada fue de 450 g, se congeló a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ y finalmente fue liofilizada para su análisis de ácidos grasos

El análisis de ANOVA encontró diferencias significativas en la densidad celular respecto al volumen de cultivo (P-valor $< 0,005$), siendo cada vez menor cuando el volumen de escalado es mayor (Test de Tukey P-valor $< 0,05$). Esto concuerda con lo estimado por los conteos celulares en donde a los días 9 y 19 del escalado las concentraciones celulares disminuyeron con el aumento el volumen de cultivo (Fig. 5.9). Por otra parte, el pH mostró diferencias significativas en todo el escalado (ANOVA P-valor $< 0,05$), pero no

lo suficiente para diferenciar las variaciones de dicha variable en cada etapa de escalado.

Según los resultados reportados por el laboratorio del BEA, *N. gaditana* con una humedad relativa menor al 10%, produjo una media de 18,8 ± 1,5 % de lípidos totales de los cuales 8,32 % pertenecen a grasas saturadas (SFAs), 16,05 % grasas monoinsaturadas (MUFAs) y 75,63 % poliinsaturadas (PUFAs). Del porcentaje de PUFAs, omega-6 representó el 34,7 % y omega-3 de 36,75%.

Por último, se estimó un ratio n3:n6 de 1,06, indicando mayor cantidad de aceites omega-3 en *N. gaditana*. De los 48 ácidos grasos analizados, solo nueve no fueron detectados y los más relevantes (fuente para energía y alimentario) fueron tenidos en cuenta para realizar la comparativa con lo obtenido anteriormente por la empresa (Tabla 5.2).

Por otra parte, se cuantificaron las diferentes materias primas usadas para la obtención de la biomasa final con el fin de evaluar, en cierta manera algunos costos en dicha producción. Sin embargo, algunos valores, como el costo de producir el PBR, no fueron suministrados por la empresa ya que se encuentra a la espera de ser patentado.

Las variables a tener en cuenta fueron: a) composición del medio (nutrientes, sal, CO₂), b) material fungible (botellas, mangueras, tapones) y c) material consumible (energía, agua) (Tabla 5.3).

El precio de una botella de CO₂ de 50 L fue de 66,84 €, aunque no se llegó a usar durante los cultivos, y el valor del KW de energía fue de 0,088 €; sin embargo, el gasto energía para este PBR no pudo calcularse ya que parte de los equipos son compartidos por otros sistemas cuya demanda fuentes de luz y de aireación es graduada de acuerdo a las necesidades, haciendo que la demanda de energía sea diferente.

Tabla 5.2 Perfil y porcentaje de ácidos grasos más relevantes de *N. gaditana*.

Ácido Graso	Nomenclatura	%
<i>A. Mirístico</i>	C14:0	0,84
<i>A. Pentadecanoico</i>	C15:0	0,29
<i>A. Palmítico</i>	C16:0	5,68
<i>A. Palmitoleico</i>	C16:1n7	5,21
<i>A. Esteárico</i>	C18:0	0,74
<i>A. Oleico</i>	C18:1n9	5,92
<i>A. Araquídico</i>	C20:0	0,46
<i>A. Eicosenoico</i>	C20:1n7	0,58
<i>A. Hexadecadienoico</i>	C16:2n4	0,29
<i>A. Hexadecatrienoico</i>	C16:3n4	0,44
<i>A. Linoleico</i>	C18:2n6	30,39
<i>A. α-Linolénico</i>	C18:3n6	0,37
<i>A. γ-Linolénico</i>	C18:3n3	14,81
<i>A. Araquidónico</i>	C20:4n6	3,08
<i>A. Eicosapentaenoico</i>	C20:5n3	17,73
<i>A. Docosahexaenoico</i>	C22:6n3	1,11

Tabla 5.3 Costos (€) del material usado para el escalado de *N. gaditana* en cultivo *Batch* o discontinuo.

<i>Item</i>	<i>Precio mercado</i>	<i>Cantidad usada</i>	<i>Gasto aproximado</i>
<i>Nutriente A</i>	85,04	0,95 L	4,04
<i>Nutriente B</i>	85,04	0,95 L	4,04
<i>Sal</i>	224	11,9 kg	2,67
<i>Botella 1 L</i>	39,63	10	39,63
<i>Botella 20 L</i>	94,84	4	94,84
<i>Tapón 20 L</i>	24,91	4	99,64
<i>Manguera</i>	3,95	5 m	3,95
<i>Llave 3 vías</i>	8	4	32
<i>Tubo de ensayo</i>	39,07	10 tubos	3,12
<i>Bote plástico</i>	75,75	4 botes	0,8
<i>Agua</i>	1,65	1 m ³	1,65
<i>Luz</i>	0,0088169 KW/h	1044 h	92,05

DISCUSIÓN

En los diferentes trabajos o investigaciones acerca de la producción a escala no es común observar análisis detallados o a profundidad, ya que, por el número de variables a tener en cuenta según el tipo de sistema usado,

producto objetivo (biomasa, pigmentos, lípidos, etc.) o eficiencia en los diferentes procesos de producción y cosechado, algunos factores suelen ser dejados de lado por falta de prevención o desconocimiento. Otro factor que dificulta una buena planeación es la falta de información de ciertos procesos que normalmente los propietarios no dan a conocer de forma pública (Borowitzka y Vonshak, 2017).

Para este caso, la mayoría de los pasos y explicaciones de cómo realizar el trabajo de producción a diarios fueron enseñados y explicados, pero no pueden ser divulgados ya que hacen parte de la investigación y desarrollo que lleva la empresa internamente para el mejoramiento de los sistemas de cultivos que allí usan. Por otra parte, el mejoramiento biológico del cultivo de *N. gaditana* se logró con éxito, teniendo como base lo ya implementado por la empresa desde su creación a la actualidad ayudando así en la creación en nuevos protocolos de cultivo los cuales no estaban establecidos previamente.

Este sistema de escalado se basó bajo el principio de tener como inóculo inicial el 10% del volumen al cual se quiera llegar, siendo 100 ml el inóculo para 1 L, 2 L inóculo para 20 L y 70 L para 700 L y de esta manera llegar a tener el doble de biomasa al cabo de aproximadamente 10 días, y que este último volumen (700 L) sea el complemento para tener una producción de 7m³ de cultivo. Esto coincide con lo presentado como modelo genérico de producción de Borowitzka y Vonshak (2017), donde se realiza un escalado cada cinco días para tener en un mes una producción de 10000 L. Sin embargo, los autores hacen referencia que esto dependerá también de la especie a producir y la concentración del volumen de inóculo. También recomiendan probar diferentes alturas de cultivo (dependiendo de si se usan sistemas abiertos o cerrados), ya que esto puede beneficiar el inicio con baja densidad celular o tener sistemas cubiertos para tener menor fluctuación en la temperatura o la cantidad de luz.

Una de las características más notorias en este proceso de escalado fue la disminución en la densidad cada vez que se aumentaba el volumen de cultivo (Fig. 5.9). Una posibilidad para solventar de cierta manera esto es

aumentar el porcentaje de inóculo inicial en cada etapa, logrando que se tarde menos en llegar a la concentración de biomasa ideal para el siguiente escalado. No obstante, especies como *Arthrospira* (Borowitzka y Vonshak, 2017) requieren de una tasas de dilución menor al 10% evitando así la fotoinhibición.

Otro aspecto que merece ser revisado es la modalidad de cultivo usada teniendo tres alternativas: a) es discontinuo cuando se cosecha el volumen total del volumen de cultivo producido (recomendado a escala laboratorio), b) es semicontinuo cuando se cosecha un porcentaje dejando un volumen suficiente que sirve como inóculo del siguiente cultivo (recomendado en sistemas cerrados o abiertos) y c) es continuo cuando el volumen retirado de cultivo es reemplazado de forma simultánea con nuevo medio (recomendado en sistemas cerrados y abiertos).

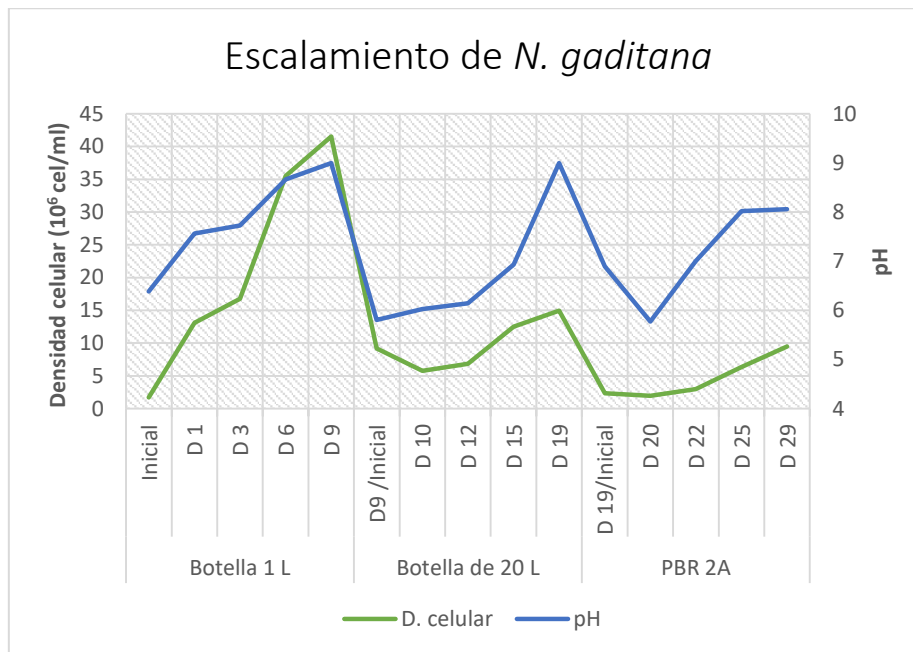


Figura 5.9 Diferentes fases de escalado de *N. gaditana* durante 29 días.

Para este caso, el sistema usado fue en forma discontinua, obteniendo mayor cantidad de biomasa posible en un tiempo fijo. Se ha establecido que *Chlorella minutissima* (Tang et al. 2012) no tuvo diferencias significativas en cultivos continuos con suplementación de CO₂ y luz continua, presentando menor concentración al cabo de tres meses. En cultivos semicontinuos, la

producción puede depender de la fase de crecimiento en donde se obtenga mayor cantidad del compuesto de interés, debido a esto, se plantea como alternativa el aumento de biomasa, primero usando sistemas como fermentadores donde se puede incrementar la densidad celular del inóculo en pocos días y generar al mismo tiempo más compuesto de interés en el volumen de producción comercial (Borowitzka y Vonshak, 2017).

En particular, comparando la producción de lípidos previos a este trabajo, el tiempo de producción medio se encontraba entre 50 y 60 días independiente del volumen cultivado, dando tiempo a la adaptación de la microalga y el efecto de estrés buscado fuese el mínimo. En este tiempo de cultivo se obtuvo 15,02 % y 26,20% de omega 3 y 6, respectivamente, con dosificación de CO₂ continua, manteniendo el pH inferior a 8. En este trabajo, dichos valores fueron superados (36,7 % omega 3 y 34,6 omega 6) en la mitad de tiempo y sin control de pH. Los datos demostraron que, al reducir tiempos de cultivo, las variaciones de pH fueron menores a medida que se aumentaba el volumen de escalado. Es posible que sea necesario un control de pH en pequeños volúmenes con medios heterotróficos (con glucosa como fuente de carbono), fortaleciendo el cultivo al tiempo que se aumenta la biomasa y se reducen costos. Esa reducción sería importante ya que, en promedio, en una producción de 7m³, la cantidad de CO₂ requerida para mantener un solo sistema duraría entre 3-4 días, haciendo insostenible su mantenimiento que sería más económico con otra fuente de carbono como glucosa o bicarbonato.

Respecto al contenido de ácidos grasos, se realizó una comparativa teniendo en cuenta el primer análisis hecho, los resultados de este trabajo y una prueba posterior en sistemas de producción comercial de 8m³ (Tabla 5.4). Bajo condiciones de fotoperiodo, tipo de luz, dosificación de nutrientes y sin adición de CO₂ similares a las de este trabajo, se mejoró la producción de los mismos ácidos grasos analizados en 2017, teniendo como única diferencia el tiempo de crecimiento (55-95 días en 2017, 30 días en PBR de 700 L y 40-45 días en PBR de 10m³ en 2018). Además, el contenido de omega 3 aumentó y omega 6 disminuyó con respecto a lo encontrado en este trabajo. Se debe

aclarar que estos tiempos de crecimiento corresponden a todo el proceso desde la inoculación del sistema comercial hasta su cosechado. Además, el diseño del PBR usado aquí fue la base para la fabricación del sistema productivo de mayor volumen (30 m³) en el que se obtuvieron mejores resultados.

Tabla 5.4 Comparativa en la producción de ácidos grasos antes y después de la optimización del cultivo de *N. gaditana* con aplicación en sistemas productivos a gran escala de la empresa.

<i>A.G</i>	<i>Análisis laboratorio 1 09-2017</i>	<i>Este trabajo 03-2018</i>	<i>Análisis laboratorio 2 07-2018</i>
C18:2n6	12,36	30,39	3,6
C18:3	12,36	15,18	8,4
C20:4n6	0,55	3,08	4
C20:5n3+C22:6n3	2,65	18,84	35,6

Poder incrementar los niveles de ARA, EPA y DHA hace que la biomasa producida por la empresa tenga mejor mercado en la actualidad. Se sabe que el consumo de estos AG se asocia con la prolongación en la gestación y disminución de los nacimientos prematuros, así como la disminución en la mortalidad por enfermedades coronarias. Se estima que la mayor fuente de omega 3 y 6 proviene de la comida de mar, sin embargo, estos alimentos llegan a contener concentraciones elevadas de contaminantes como metales pesados o compuestos persistentes (PCBs) debido a su capacidad bioacumuladora (Watters y Edmonds, 2012).

La comercialización de omega 3 en algas y en productos que contengan aceite de pescado ha sido valorada anteriormente. En algas, el precio por kilogramo de este aceite fue de \$140, mucho mayor que las fuentes derivadas del pescado. En Suramérica, la pesca de anchoa suplió la necesidad de 300.000 ton de aceite de pescado con 30% de EPA+DHA, aproximadamente, pero en el año 2013 solo se logró una producción cercana a 175.000 ton lo cual es insuficiente para suplir dicha demanda (Borowitzka, 2013), además de ser de amplio conocimiento la disminución de los recursos pesqueros en el mundo debido a la sobreexplotación. Estas condiciones hacen del cultivo de microalgas una gran alternativa, no solo para la producción de dichos

compuestos sino además como una fuente rica en proteína, carbohidratos, minerales y vitaminas tanto para consumo humano como animal.

Por último, en relación a los gastos generados durante este trabajo, parte del material usado es amortizado por su uso continuo al iniciar un nuevo inóculo desde laboratorio hasta los sistemas de producción. En el caso de los nutrientes, sería recomendable probar con fertilizantes comerciales, teniendo en cuenta los ingredientes de las recetas usadas en la elaboración de medios nutritivos para cultivos microalgales como f/2, BG-11 entre otros. Estos fertilizantes son encontrados en mercados locales, teniendo la ventaja que pueden ser adquiridos al momento de la compra y en las cantidades deseadas. Se debe tener en cuenta el contenido de metales en estos fertilizantes, ya que dependiendo de cuál sea y en qué concentración se encuentre, pueden llegar a ser nocivos para el cultivo teniendo en cuenta que estos compuestos químicos están diseñados para la agricultura o jardinería.

En el caso de la energía, debido a que la maquinaria relacionada con el diseño experimental no fue usada de manera exclusiva para este fin, no se pudo establecer un gasto aproximado. Por otra parte, se supo que el costo de energía en esta región es cobrado mensualmente y el valor aproximado por KW h^{-1} es de 0,0882 € según el plan de energía contratado por la empresa. El costo del CO_2 por su parte, aunque no se usó en este diseño, es de 66,84 € por 50 L, siendo esta cantidad insuficiente para el volumen de producción actual. Una alternativa a probar sería la dosificación de CO_2 únicamente en los inóculos para que este llegue en las mejores condiciones de concentración celular al volumen de producción (10 000-12 000 L) y que en esta última fase sea en donde se presenten las condiciones de estrés, reduciendo así los tiempos de crecimiento como gastos en fases previas.

Ya que el gasto de agua es continuo y teniendo en cuenta la problemática de buscar mejorar procesos que ayuden a disminuir el impacto sobre los recursos no renovables, se recomienda realizar una reutilización del agua luego de cosechar la biomasa. En la producción de aceites para la generación de biocombustible (Farooq et al. 2015), el reciclado de agua no solo

es importante para reducir la “huella hídrica” sino además minimiza la energía requerida en la etapa de producción del cultivo.

Por otra parte, también se puede ahorrar en nutrientes al ver que estos no han sido consumidos por las algas en su totalidad. En el montaje y puesta en marcha de un PBR para la producción de microalgas (Martins et al. 2018), la huella hídrica generada estuvo entre 2,4-6,8 m³ por kilogramo de biomasa generada. Además, la fase de operación fue la responsable de más del 60% de consumo de agua asociado a la producción de electricidad y nutrientes requeridos en esta fase.

Es de vital importancia establecer previamente la tasa de reciclado, ya que existe la posibilidad de requerir un volumen determinado de agua fresca manteniendo así la calidad del agua de manera aceptable y una suplementación adecuada de nutrientes para el nuevo cultivo. Se ha encontrado una tasa de reciclado del medio entre el 70-85% con resultados notables en la producción de biomasa en un segundo cultivo, aunque esto es variable dependiendo de la especie usada (Lowrey et al. 2015).

Para este trabajo, la modalidad de cultivo discontinuo o *batch* usado no es el más adecuado para una producción a escala industrial, ya que iniciar un volumen productivo viable económicamente desde pequeños volúmenes cada vez que ese coseche por completo, hace que la producción de la biomasa sea más costosa. Se ha demostrado que una producción con mayor continuidad generalmente tiene menor costo, teniendo en cuenta una menor inactividad de los sistemas por limpieza, desinfección y mantenimiento del sistema productivo (Coelho et al. 2014).

Como medida final, es muy importante tener en cuenta el objetivo por el cual se lleva a cabo un cultivo de microalgas, si se busca la generación de biomasa o de algún producto o metabolito particular. Debido a que al modificar los parámetros básicos que influyen el crecimiento de la biomasa o la producción de lípidos como en este caso, uno de estos productos se verá afectado ya que la célula no logra invertir la energía necesaria en reproducirse o producir metabolitos. A la hora de un mercado específico, el por qué se

producen microalgas será determinante para la estabilidad económica a futuro de cualquier empresa siendo determinante el nicho de mercado en el que esta se encuentre.

Capítulo 6

Discusión General

En las últimas décadas el deterioro en la calidad ambiental ha ido en aumento, la contaminación se ha visto relacionada con el aumento de la población, urbanización e industrialización a nivel mundial (Renuka et al. 2015; Rawat et al. 2011). Este incremento, a su vez, va ligado con la generación de residuos sólidos y aguas residuales, causando un impacto negativo en los ecosistemas; estas aguas suelen tener altas cargas, tanto de nutrientes como de contaminantes, que al momento de su descarga en los diferentes cuerpos de agua generan una eutrofización del sistema teniendo como consecuencia pérdidas en biodiversidad y económicas considerables (Cai et al. 2013). El trabajo desarrollado durante esta tesis de doctorado quiere mostrar la viabilidad de las microalgas como tratamiento de aguas residuales generadas a partir de residuos sólidos urbanos (lixiviados), en donde su carga de materia orgánica e inorgánica puede ser usada como fuente de nutrientes para su crecimiento y generación de biomasa con valor añadido en la biotecnología.

Para tener una visión general de lo que se puede encontrar en estos sistemas, se hizo una caracterización fitoplanctónica de un sistema de tratamiento de residuos teniendo en cuenta puntos de formación, recolección y tratamiento de lixiviados, encontrándose un rango amplio de especies allí (capítulo 2). Establecido esto, fue necesaria una selección morfológica y molecular teniendo en cuenta el establecimiento de un cultivo base y así evaluar su crecimiento, consumo de nutrientes y producción de compuestos de interés (capítulos 3 y 4), para finalmente aplicar el conocimiento adquirido en una producción de microalgas a nivel industrial mejorando las distintas técnicas adquiridas en laboratorio (capítulo 5). En resumen, los resultados aquí expuestos han mostrado la capacidad de siete especies de microalgas de sobrevivir a diferentes concentraciones de lixiviado pre-tratado (LP) como su único aporte de nutrientes durante ensayos de 96 h hasta 18 días, en donde

su capacidad de consumo de nitrógeno y fósforo, y su tasa producción de pigmentos y lípidos fueron diferentes en cada una de ellas.

Lixiviados como objeto de estudio

Los lixiviados son el resultado de una serie de complejos procesos físicos, químicos y microbiológicos en donde la filtración del agua desde la superficie y a través de las diferentes capas de residuos arrastra todo tipo de material, generando agua residual con material orgánico disuelto, componentes inorgánicos, metales pesados y compuestos xenobióticos (Kjeldsen et al. 2002). Un tratamiento no adecuado de estas aguas puede causar una mezcla con las aguas subterráneas o superficiales, contribuyendo a la contaminación del suelo y de los distintos cuerpos de agua cercanos. Además, su composición específica será dependiente del lugar de tratamiento, las características de los residuos sólidos depositados (condiciones fisicoquímicas), el régimen de lluvias de la zona y la edad del vertedero (Gotvajin y Pavko, 2015), haciendo necesaria la búsqueda de alternativas que puedan complementar dicho tratamiento para así reducir aún más el impacto negativo en el medio.

En este contexto, la fitorremediación basada en el uso de microalgas aparece como un método viable para el tratamiento de estas aguas residuales, ya que representan una parte integral de la diversidad microbiana que allí se encuentra. Gracias a esta diversidad, estos microorganismos son capaces de adaptarse a ambientes complejos, siendo de mayor interés para la comunidad científica en su búsqueda de géneros y especies para el desarrollo prometedor de tratamientos de aguas residuales basado en estos organismos (Renuka et al. 2015).

Varios de los trabajos desarrollados se han enfocado en la captación, principalmente, de distintos compuestos nitrogenados (amonio, amoniaco, nitrato), de fósforo y de metales pesados u otros elementos que en altas concentraciones, pueden ser tóxicos o letales (Paskuliakova et al. 2018;

Renuka et al. 2015; Sforza et al. 2015; Chen et al. 2013; Renuka et al. 2013; Monteiro et al. 2012; Rawat et al. 2011; Lin et al. 2007; Clément et al. 1997; Chu et al. 1996). Viendo su capacidad de remoción, se ha valorado la producción de biomasa para la generación de lípidos, pigmentos y otros metabolitos que en la actualidad manejan un amplio mercado en la industria farmacéutica, cosmética o alimentaria (Ferreira et al. 2019; Hernández-García et al. 2019; Sarpal et al. 2019; Chang et al. 2018; Sun et al. 2018; Cheah et al. 2016; Zhao et al. 2014; Abomohra et al. 2013; Varfolomeev y Wasserman, 2011; Chacón-Lee y González-Mariño, 2010). Las microalgas evaluadas en este estudio, a pesar de tener una baja capacidad de remoción de nitrógeno, han podido consumir más de la mitad del fósforo disponible en el medio.

Las diferentes especies aquí probadas respondieron de una forma distinta a cada concentración de LP expuesta, esto indica que realizar diluciones previas (Paskuliakova et al. 2018b; Sforza et al. 2015; Chinnasamy et al. 2014; Cheng y Tian, 2013; Ji et al. 2013; Lin et al. 2007) puede traer ventajas al momento de exponer a cualquier microalga a este tipo de ambientes por su contenido de sustancias, compuestos y otros elementos nocivos, cuya presencia en el medio puede estar disminuida haciendo que su efecto sobre el cultivo sea bajo. Sin embargo, esta dilución también conlleva una disminución de elementos limitantes que desde un inicio ya vienen en baja concentración, como algunos iones, minerales o hasta ciertos nutrientes (Paskuliakova et al. 2018b, 2018a, 2016), explicando por qué en los ensayos realizados en remoción de nitrógeno no se encontró un consumo relevante frente al fósforo.

Otro aspecto a resaltar es el volumen de inóculo. Si bien es verdad que las concentraciones de los inóculos iniciales usados a lo largo de esta investigación (10^5 - 10^6 cel ml^{-1}) fueron bajas a comparación de lo referenciado en otros trabajos (Tam y Wong, 1989), en ensayos preliminares siempre se pudo observar una tolerancia como crecimiento al exponerla al LP sin diluir. De todas maneras, es recomendable, de acuerdo a las características

fisicoquímicas del agua residual, para mejores resultados sea posible el uso de un inóculo de mayor tamaño tanto previniendo de cierta manera que al no crecer las microalgas en el medio no sea por un volumen de inóculo adecuado.

Aplicaciones biotecnológicas

Durante el desarrollo de este trabajo, especies como *Coelastrella* sp. 1 y 2 han producido gran cantidad de β -carotenoides estando y sin estar expuestas al LP. Estos pigmentos han sido de gran interés en la investigación por su capacidad antioxidante al igual que en la alimentación como un agente colorante natural (Abe et al. 2004) y alivio de los síntomas en diferentes enfermedades (Sun et al. 2018). En grandes operaciones, también se ha podido determinar su producción en especies como *A. platensis*, llamativa por su contenido nutritivo y otras de gran importancia en la acuicultura (di Lena et al. 2019; Gu et al. 2005). Los géneros *Chlamydomonas* (Paskuliakova et al. 2018; Pham et al. 2014) y *Desmodesmus* (Hernández-García et al. 2019; Komolafe et al. 2014; Jemec et al. 2012) no suelen usarse en cultivos de microalgas; sin embargo, son géneros que se encuentran en aguas con alto impacto de contaminación como aguas residuales, su incremento en la generación de biomasa y su resistencia en ensayos de toxicidad, hace que puedan ser tenidas en cuenta como posibles bioindicadores de aguas con alta carga de materia orgánica, entre otros compuestos.

Tetracystis sp. no solo ha tenido la capacidad de tolerar hasta un 10% de LP, sino que también puede generar biomasa en estas condiciones. Especies como *Tetracystis intermedium* (Cuellar-Bermudez et al. 2015) han sido reportadas con la capacidad de producir carotenoides secundarios importantes en la industria biotecnológica. No obstante, *Tetracystis fissurata* (Safonova et al. 2004) no ha sido capaz de crecer en agua residual, siendo esta tóxica bajo dichas condiciones experimentales durante 10 días. *Acutodesmus obliquus* ha sido aislada y usada para el tratamiento de lixiviados urbanos (Sforza et al. 2015), siendo la mejor en producir biomasa y remoción de nutrientes del medio. En este trabajo no fue la mejor en crecimiento, pero sí

una de las que más nitrógeno total removió del medio y del fósforo total consumió más del 70% de lo disponible, produjo más biomasa, carbohidratos y lípidos en LP que en condiciones estándar de cultivo.

El género *Chlorella* ha sido estudiado ampliamente en estos ambientes (Chang et al. 2018; Ouaer et al. 2016; Ji et al. 2013; Barthel et al. 2008; Lin et al. 2007; Tam y Wong, 1989) y su respuesta ha sido variada. Desde su dominio en aguas procedentes de granjas de animales donde los mejores resultados no fueron superiores al 20% de concentración de agua residual (Ji et al. 2013; Barthel et al. 2008), pasando por su adaptación al medio teniendo en cuenta que un inóculo de mayor tamaño tendrá mayor remoción de nutrientes como capacidad de sobrevivir y generar biomasa (Ouaer et al. 2016; Tam y Wong, 1989), hasta una producción a mayor escala para la generación de lípidos en sistemas controlados con un rendimiento de hasta 0,95 g L⁻¹ de biomasa al día (Chang et al. 2018). En este estudio, se pudo determinar que *Chlorella* sp. no fue una de las mejores especies en producir biomasa, pero sí de las que un porcentaje considerable de grasas poliinsaturadas fueron cuantificadas en LP, tanto a concentraciones medias como altas; también fue la única especie que creció en todas las concentraciones probadas de LP a una tasa casi constante y fue capaz de duplicar su densidad celular en 24 h al 50% del valor de referencia diario.

Un futuro más sostenible

El proyecto ReCO₂VERY no solo logró demostrar la viabilidad de generar biomasa a partir de aguas residuales conocidas como lixiviados, generados a partir de una planta de tratamiento de residuos sólidos urbanos con aplicaciones biotecnológicas, sino también mostró la posibilidad de seguir reduciendo el impacto antropogénico sobre los ecosistemas acuáticos. En diferentes partes del mundo se han estado llevando a cabo diferentes investigaciones como proyectos donde estas aguas son protagonistas (Cheah et al. 2016; Dogaris et al. 2019) a diferentes niveles teniendo en cuenta que el uso de agua en cultivos es elevado (Chew et al. 2018; Martins et al. 2018; Farooq et al. 2015).

Otro punto importante es el aprovechamiento de las comunidades algales que pueden verse relacionadas con estos sistemas de tratamiento. Esto genera una gran oportunidad, no solo de estudiar las comunidades que allí existen tanto a corto como a largo plazo, sino además tener diferentes tipos de cepas a disposición ya que al ser parte “natural” de dichos sistemas, los periodos de adaptación que pueden tener las microalgas que no han sido expuestas a estas condiciones, además de la variabilidad fisicoquímica como ambiental a la que pueden estar sujetas de forma cotidiana, hace que estas cepas nativas tengan mayor relevancia al momento de escoger las especies a usar.

Aquí y en otros trabajos (Hernández-García et al. 2019; Renuka et al. 2015b; Costa et al. 2014; Renuka 2013; Safonova et al. 2004), ha sido importante estudiar diferentes especies ya que no todas presentan comportamientos similares ante las mismas condiciones experimentales. Se ha visto que, a pesar de ser una misma especie o perteneciente al mismo género, no se pueden garantizar resultados óptimos, como sucedió en esta investigación con *Coelastrella* sp. 1 y 2, donde la primera no sobrevivió a las condiciones aquí mostradas. Esto hace pensar que tanto *Desmodesmus* sp. como *Coelastrella* sp. 1 no sean especies que se encuentren de forma frecuente en este medio, llevando a plantearse que estos organismos pudiesen actuar como agentes susceptibles a perturbaciones ambientales (Abe et al. 2004) o simplemente sean oportunistas de acuerdo a las condiciones ambientales dadas durante la toma de muestras. Para una mayor certeza, es necesario hacer estudios preliminares que abarquen una escala de tiempo mayor a la que fue tomada en cuenta acá donde, por razones de logística y acceso a las instalaciones debido a políticas de la planta de tratamiento, no se haya logrado cubrir otras épocas del año.

Capítulo 7

Conclusiones Generales

1. Las microalgas y cianobacterias son microorganismos que tienen la capacidad de adaptarse a diferentes condiciones ambientales desfavorables y atípicas para su crecimiento y desarrollo. En el lixiviado, estos organismos mostraron la capacidad de crecer, consumir nutrientes y producir compuestos que son altamente valorados en el mercado alimentario, energético, farmacéutico, entre otros.
2. La determinación taxonómica del fitoplancton presente en el sistema de estanques y charcas que hacen parte de la planta de tratamiento COGERSA da una visión global de las condiciones fisicoquímicas a las que puede estar expuesta la comunidad, encontrando una relación con las características morfométricas de los estanques y charcas muestreados.
3. Los parámetros fisicoquímicos del lixiviado usado no son constantes en el tiempo, estos dependen de la naturaleza de la materia orgánica en descomposición, la presencia de agua, el tiempo de descomposición que lleva el proceso y el tratamiento de nitrificación-desnitrificación bacteriano hecho por la planta depuradora.
4. La respuesta de las cepas de microalgas a los tratamientos con lixiviado tratado probadas fue distinta. A pesar de ser cepas aisladas del propio vertedero, el grado de tolerancia estimado muestra que las cepas no están continuamente en el sistema a lo largo del tiempo ni de los parámetros fisicoquímicos del lixiviado.
5. Tanto *Desmosdesmus* sp. y *Coelastrrella* sp. 1 no crecieron en el lixiviado. Por otra parte, *Tetracystis* sp., *Chlamydomonas* sp. y *A. obliquus* lograron crecer hasta una concentración de 10% de lixiviado tratado. Por último, *Coelastrrella* sp. 2 y *Chlorella* sp. fueron las únicas en crecer en concentraciones hasta de 50% de lixiviado.

6. En la producción de lípidos, *Desmodesmus* sp. y *Coelastrella* sp. 1 produjeron más ácidos grasos saturados. *Tetracystis* sp. y *Chlamydomonas* sp. fueron mejores productoras en lípidos poliinsaturados tanto controles como en tratamientos, mientras que *A. obliquus* obtuvo mayor cantidad de lípidos saturados en presencia de lixiviado. Finalmente, *Coelastrella* sp. 2 produjo mayor lípido poliinsaturado en los tratamientos al igual que lo observado en *Chlorella* sp.
7. El escalado de cultivos a nivel industrial genera grandes retos a la hora de mantener un equilibrio entre la producción de biomasa y el diseño de PBR usado. Además, los costos generados en dicha producción suelen ser elevados y esto obliga a tener claridad sobre las cualidades que debe tener la biomasa según el mercado objetivo.
8. El diseño de un calendario de escalado como el usado en este trabajo es de gran importancia al momento de adquirir un ritmo de trabajo teniendo en cuenta el tiempo de crecimiento del cultivo. El factor tiempo en este calendario de escalado juega un papel importante debido a que la proporción de varios de los subproductos de interés que las microalgas tienen pueden verse afectados.

Capítulo 8

Bibliografía

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., & Ibraheem, I. B. M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *19*(3), 257–275. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>
- Abe, K., Hattori, H., & Hirano, M. (2007). Accumulation and antioxidant activity of secondary carotenoids in the aerial microalga *Coelastrella striolata* var. *multistriata*. *Food Chemistry*, *100*(2), 656–661. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.026>
- Abe, K., Takizawa, H., & Kimura, S. (2004). Characteristics of Chlorophyll Formation of the Aerial Microalga *Coelastrella striolata* var. *multistriata* and Its Application for Environmental Biomonitoring. *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING*, *98*(1), 34–39.
- Abe, K., Takizawa, H., Kimura, S., & Hirano, M. (2004, January). Characteristics of chlorophyll formation of the aerial microalga *Coelastrella striolata* var. *multistriata* and its application for environmental biomonitoring. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Society of Fermentation and Bioengineering. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(04\)70239-X](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(04)70239-X)
- Abomohra, A. E.-F., Wagner, M., El-Sheekh, M., & Hanelt, D. (2013). Lipid and total fatty acid productivity in photoautotrophic fresh water microalgae: screening studies towards biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, *25*(4), 931–936. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9917-y>
- Amengual-Morro, C., Moyà Niell, G., & Martínez-Taberner, A. (2012). Phytoplankton as bioindicator for waste stabilization ponds. *Journal of Environmental Management*, *95*(SUPPL.), 571–576. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.07.008>
- Andersen, R. A. (2005). *Algal Culturing Techniques*. ث (Vol. ٣). Elsevier Academic Press. (ق ق ث ق)

- Arauzo, M., & Alvarez Cobelas, M. (1994). Phytoplankton strategies and time scales in a eutrophic reservoir. *Hydrobiologia*, *291*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/BF00024234>
- Barros, A., Pereira, H., Campos, J., Marques, A., Varela, J., & Silva, J. (2019). Heterotrophy as a tool to overcome the long and costly autotrophic scale-up process for large scale production of microalgae. *Scientific Reports*, *9*(1), 13935. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50206-z>
- Barthel, L., Armando, P., De Oliveira, V., & Ribeiro Da Costa, R. H. (2008). BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY Plankton Biomass in Secondary Ponds Treating Piggery Waste. *Braz. Arch. Biol. Technol.* *V, 51*(6), 1287–1298. Retrieved from <http://www.scielo.br/pdf/babt/v51n6/25.pdf>
- Bellinger, E., & Sigee, D. (2010). *Freshwater algae : identification and use as bioindicators*.
- Bernard, C., J, C. R., & Le Dû-Delepierre, A. (1997). Estimation of the hazard of landfills through toxicity testing of leachates. *Chemosphere*, *35*(11), 2783–2796. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00332-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00332-9)
- Bleakley, S., & Hayes, M. (2017). Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production. *Foods*, *6*(5), 33. <https://doi.org/10.3390/foods6050033>
- Borowitzka, M. A. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, *70*(1–3), 313–321. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00083-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00083-8)
- Borowitzka, M. A., & Vonshak, A. (2017). Scaling up microalgal cultures to commercial scale. *European Journal of Phycology*, *52*(4), 407–418. <https://doi.org/10.1080/09670262.2017.1365177>
- Cabanelas, I. T. D., Arbib, Z., Chinalia, F. A., Souza, C. O., Perales, J. A., Almeida, P. F., ... Nascimento, I. A. (2013). From waste to energy:

- Microalgae production in wastewater and glycerol. *Applied Energy*, *109*, 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.04.023>
- Cai, T., Park, S. Y., & Li, Y. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *19*, 360–369. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.030>
- Chacón-Lee, T. L., & González-Mariño, G. E. (2010). Microalgae for “Healthy” Foods-Possibilities and Challenges. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *9*(6), 655–675. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00132.x>
- Chang, H., Quan, X., Zhong, N., Zhang, Z., Lu, C., Li, G., ... Yang, L. (2018). High-efficiency nutrients reclamation from landfill leachate by microalgae *Chlorella vulgaris* in membrane photobioreactor for bio-lipid production. *Bioresource Technology*, *266*(June), 374–381. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.077>
- Cheah, W. Y., Ling, T. C., Show, P. L., Juan, J. C., Chang, J.-S., & Lee, D.-J. (2016). Cultivation in wastewaters for energy: A microalgae platform. *Applied Energy*, *179*, 609–625. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.07.015>
- Chen, Y. N., Liu, C. H., Nie, J. X., Luo, X. P., & Wang, D. S. (2013). Chemical precipitation and biosorption treating landfill leachate to remove ammonium-nitrogen. *Clean Technologies and Environmental Policy*, *15*(2), 395–399. <https://doi.org/10.1007/s10098-012-0511-4>
- Cheng, H.-X., & Tian, G.-M. (2013). Preliminary Evaluation of a Newly Isolated Microalga *Scenedesmus* sp. CHX1 for Treating Landfill Leachate. In *2013 Third International Conference on Intelligent System Design and Engineering Applications* (pp. 1057–1060). IEEE. <https://doi.org/10.1109/ISDEA.2012.249>
- Chew, K. W., Chia, S. R., Show, P. L., Yap, Y. J., Ling, T. C., & Chang, J.-S. (2018). Effects of water culture medium, cultivation systems and growth

modes for microalgae cultivation: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 91, 332–344.

<https://doi.org/10.1016/j.jtice.2018.05.039>

CHINDAH, A. C., BRAIDE, S. A., AMAKIRI, J., & IZUNDU, E. (2007).

Succession of phytoplankton in a municipal waste water treatment system under sunlight Sucesión del fitoplancton en un medio de tratamiento de aguas provenientes de desechos Municipales utilizando luz solar. *Revista Científica UDO Agrícola*, 7(1), 258–273.

Chinnasamy, S., Sood, A., Renuka, N., Prasanna, R., Ratha, S. K., Bhaskar, S., ... Lewis, D. M. (2014). Ecobiological aspects of algae cultivation in wastewaters for recycling of nutrients and biofuel applications. *Biofuels*, 5(2), 141–158. <https://doi.org/10.4155/bfs.13.78>

Chu, L. M., Cheung, K. C., & Wong, M. H. (1996). Algal purification of pretreated landfill Leachate. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 53(1–4), 159–174. <https://doi.org/10.1080/02772249609358281>

Coelho, R. S., Vidotti, A. D. S., Reis, É. M., & Franco, T. T. (2014). High cell density cultures of microalgae under fed-batch and continuous growth. *Chemical Engineering Transactions*, 38, 313–318. <https://doi.org/10.3303/CET1438053>

Costa, R. H. R., Martins, C. L., Fernandes, H., & Velho, V. F. (2014). Consortia of microalgae and bacteria in the performance of a stabilization pond system treating landfill leachate. *Water Science and Technology*, 70(3), 486–494. <https://doi.org/10.2166/wst.2014.249>

Cuellar-Bermudez, S. P., Aguilar-Hernandez, I., Cardenas-Chavez, D. L., Ornelas-Soto, N., Romero-Ogawa, M. A., & Parra-Saldivar, R. (2015). Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: Essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. *Microbial Biotechnology*. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12167>

DE M, V. L. . H., & Nina F., C. (1998). The relationship between phytoplankton composition and physical-chemical variables: a

comparison of taxonomic and morphological-functional descriptors in six temperate lakes. *Freshwater Biology*, *40*(4), 679–696.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.1998.00369.x>

Delgadillo-Mirquez, L., Lopes, F., Taidi, B., & Pareau, D. (2016). Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture. *Biotechnology Reports*, *11*, 18–26.

<https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.04.003>

Di Lena, G., Casini, I., Lucarini, M., & Lombardi-Boccia, G. (2019). Carotenoid profiling of five microalgae species from large-scale production. *Food Research International*, *120*, 810–818.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.043>

Dogaris, I., Loya, B., Cox, J., & Philippidis, G. (2019). Study of landfill leachate as a sustainable source of water and nutrients for algal biofuels and bioproducts using the microalga *Picochlorum oculatum* in a novel scalable bioreactor. *Bioresource Technology*, *282*, 18–27.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.003>

Edmundson, S. J., & Wilkie, A. C. (2013). Landfill leachate--a water and nutrient resource for algae-based biofuels. *Environmental Technology*, *34*(13–16), 1849–1857. <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.826256>

Fábregas, J., Maseda, A., Domínguez, A., & Otero, A. (2004). The cell composition of *Nannochloropsis* sp. changes under different irradiances in semicontinuous culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *20*(1), 31–35.

<https://doi.org/10.1023/B:WIBI.0000013288.67536.ed>

Farooq, W., Suh, W. I., Park, M. S., & Yang, J.-W. (2015). Water use and its recycling in microalgae cultivation for biofuel application. *Bioresource Technology*, *184*, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.140>

Ferreira, G. F., Ríos Pinto, L. F., Maciel Filho, R., & Fregolente, L. V. (2019). A review on lipid production from microalgae: Association between cultivation using waste streams and fatty acid profiles.

Renewable and Sustainable Energy Reviews, 109(July 2018), 448–466.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.04.052>

Fret, J., Roef, L., Blust, R., Diels, L., Tavernier, S., Vyverman, W., & Michiels, M. (2017). Reuse of rejuvenated media during laboratory and pilot scale cultivation of *Nannochloropsis* sp. *Algal Research*, 27(September 2017), 265–273.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.09.018>

Gangl, D., Zedler, J. A. Z., Rajakumar, P. D., Martinez, E. M. R., Riseley, A., Włodarczyk, A., ... Robinson, C. (2015). Biotechnological exploitation of microalgae. *Journal of Experimental Botany*, 66(22), 6975–6990.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erv426>

Gotvajn, A. Ž., & Pavko, A. (2015). Perspectives on Biological Treatment of Sanitary Landfill Leachate. In *Wastewater Treatment Engineering* (pp. 115–151). InTech. <https://doi.org/10.5772/57353>

Grubišić, M., Šantek, M. I., & Šantek, B. (2019). Potential of Microalgae for the Production of Different Biotechnological Products. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 33(2), 161–181.
<https://doi.org/10.15255/CABEQ.2019.1657>

Gu, H., Gao, K., Ma, Z., & Watanabe, T. (2005). Effects of solar ultraviolet radiation on biomass production and pigment contents of *Spirulina platensis* in commercial operations under sunny and cloudy weather conditions. *Fisheries Science*, 71(2), 454–456.
<https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2005.00984.x>

Guieysse, B., Béchet, Q., & Shilton, A. (2013). Variability and uncertainty in water demand and water footprint assessments of fresh algae cultivation based on case studies from five climatic regions. *Bioresource Technology*, 128, 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.096>

Hernández-García, A., Velásquez-Orta, S. B., Novelo, E., Yáñez-Noguez, I., Monje-Ramírez, I., & Orta Ledesma, M. T. (2019). Wastewater-leachate treatment by microalgae: Biomass, carbohydrate and lipid production.

- Ecotoxicology and Environmental Safety*, 174(August 2018), 435–444.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.052>
- Hu, C., Chuang, L., Yu, P., & Chen, C. N. (2013). Pigment production by a new thermotolerant microalga *Coelastrella* sp. F50. *Food Chemistry*, 138(4), 2071–2078. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.133>
- Jemec, A., Tišler, T., & Žgajnar-Gotvajn, A. (2012). Assessment of landfill leachate toxicity reduction after biological treatment. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 62(2), 210–221.
<https://doi.org/10.1007/s00244-011-9703-x>
- Ji, M.-K., Kim, H.-C., Sapireddy, V. R., Yun, H.-S., Abou-Shanab, R. A. I., Choi, J., ... Jeon, B.-H. (2013). Simultaneous nutrient removal and lipid production from pretreated piggyery wastewater by *Chlorella vulgaris* YSW-04. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(6), 2701–2710.
<https://doi.org/10.1007/s00253-012-4097-x>
- Juneja, A., Ceballos, R. M., & Murthy, G. S. (2013, September 3). Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: A review. *Energies*.
<https://doi.org/10.3390/en6094607>
- Khan, M. I., Shin, J. H., & Kim, J. D. (2018). The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1–21.
<https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>
- Khattabi, H., Aleya, L., & Mania, J. (2006). Spatio-temporal distribution and characterisation of phytoplankton populations coupled with abiotic and biotic changes in landfill leachate treatment basins (Etuffont, Belfort, France). *Water, Air, and Soil Pollution*, 174(1–4), 107–125.
<https://doi.org/10.1007/s11270-005-9048-z>
- Kjeldsen, P., Barlaz, M. a., Rooker, A. P., Baun, A., Ledin, A., & Christensen, T. H. (2002). Present and Long-Term Composition of MSW

Landfill Leachate: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 32(4), 297–336.

<https://doi.org/10.1080/10643380290813462>

Komolafe, O., Velasquez Orta, S. B., Monje-Ramirez, I., Noguez, I. Y., Harvey, A. P., & Orta Ledesma, M. T. (2014). Biodiesel production from indigenous microalgae grown in wastewater. *Bioresource Technology*, 154, 297–304. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.048>

Kumari, M., Ghosh, P., & Thakur, I. S. (2016). Landfill leachate treatment using bacto-algal co-culture: An integrated approach using chemical analyses and toxicological assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 128, 44–51.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.02.009>

Lin, L., Chan, G. Y. S., Jiang, B. L., & Lan, C. Y. (2007). Use of ammoniacal nitrogen tolerant microalgae in landfill leachate treatment. *Waste Management*, 27(10), 1376–1382.

<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2006.09.001>

Liu, J., Huang, J., Jiang, Y., & Chen, F. (2012). Molasses-based growth and production of oil and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis*. *Bioresource Technology*, 107, 393–398. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.047>

López Velazco, R. (2015). *Evaluación De La Producción De Lixiviados En Vertederos De Residuos Sólidos Urbanos: Métodos Disponibles Y Aplicación a Vertederos De Cuencas Mediterráneas*. Retrieved from http://apps1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_12/pdf/Cap7_residuos.pdf

Lowrey, J., Armenta, R. E., & Brooks, M. S. (2016). Nutrient and media recycling in heterotrophic microalgae cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(3), 1061–1075. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7138-4>

Manirafasha, E., Vangh, A. V., Murwanashyaka, T., Rugabirwa, B., & Ndi-, T. (2019). Algal Resources Exploitation for Green Economy and Sustainable Development : Algal Resources Exploitation for Green

- Economy and Sustainable Development : A Review, (June).
<https://doi.org/10.29011/2574-7258.001089>
- Markou, G., Vandamme, D., & Muylaert, K. (2014). Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water Research*, *65*, 186–202. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.025>
- Martins, A. A., Marques, F., Cameira, M., Santos, E., Badenes, S., Costa, L., ... Mata, T. M. (2018). Water footprint of microalgae cultivation in photobioreactor. *Energy Procedia*, *153*, 426–431.
<https://doi.org/10.1016/j.egypro.2018.10.031>
- Metsoviti, M. N., Katsoulas, N., Karapanagiotidis, I. T., & Papapolymerou, G. (2019). Current and Potential Applications of Microalgae : A Mini Review, *11*(3), 1–5. <https://doi.org/10.19080/OFOAJ.2019.11.555811>
- Monteiro, C. M., Castro, P. M. L., & Malcata, F. X. (2012). Metal uptake by microalgae: underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnology Progress*, *28*(2), 299–311.
<https://doi.org/10.1002/btpr.1504>
- Mustafa, E. M., Phang, S. M., & Chu, W. L. (2012). Use of an algal consortium of five algae in the treatment of landfill leachate using the high-rate algal pond system. *Journal of Applied Phycology*, *24*(4), 953–963. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9716-x>
- Norsker, N.-H., Barbosa, M. J., Vermuë, M. H., & Wijffels, R. H. (2011). Microalgal production — A close look at the economics. *Biotechnology Advances*, *29*(1), 24–27. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.005>
- Olguín, E. J. (2003). Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnology Advances*, *22*, 81–91.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2003.08.009>
- Ouaer, M. El, Halaoui, M., Trabelsi, I., & Hassen, A. (2016). Adaptation and use of *Chlorella* sp. for landfill leachate treatment. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, *14*(3), 807–816.

- Pacheco, M. M., Hoeltz, M., Moraes, M. S. a, & Schneider, R. C. S. (2015). Microalgae: Cultivation techniques and wastewater phycoremediation. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, *50*(6), 585–601. <https://doi.org/10.1080/10934529.2015.994951>
- Palmer, C. M. (1969). A COMPOSITE RATING OF ALGAE TOLERATING ORGANIC POLLUTION. *Journal of Phycology*, *5*(1), 78–82. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1969.tb02581.x>
- Paskuliakova, A., McGowan, T., Tonry, S., & Touzet, N. (2018a). Microalgal bioremediation of nitrogenous compounds in landfill leachate – The importance of micronutrient balance in the treatment of leachates of variable composition. *Algal Research*, *32*(April), 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.03.010>
- Paskuliakova, A., McGowan, T., Tonry, S., & Touzet, N. (2018b). Phycoremediation of landfill leachate with the chlorophyte *Chlamydomonas* sp. SW15aRL and evaluation of toxicity pre and post treatment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *147*(September 2017), 622–630. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.010>
- Paskuliakova, A., Tonry, S., & Touzet, N. (2016). Phycoremediation of landfill leachate with chlorophytes: Phosphate a limiting factor on ammonia nitrogen removal. *Water Research*, *99*, 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.04.029>
- Pastich, E. A., Gavazza, S., Casé, M. C. C., Florencio, L., & Kato, M. T. (2016). Structure and dynamics of the phytoplankton community within a maturation pond in a semiarid region. *Brazilian Journal of Biology*, *76*(1), 144–153. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.15214>
- Pereira, E., Anne, I., Fidalgo, M. L., & Vasconcelos, V. (2001). Phytoplankton and nutrient dynamics in two ponds of the Esmoriz wastewater treatment plant (Northern Portugal). *Limnetica*, *20*(2), 245–254.

- Pereira, S. F. L., Gonçalves, A. L., Moreira, F. C., Silva, T. F. C. V., Vilar, V. J. P., & Pires, J. C. M. (2016). Nitrogen removal from landfill leachate by microalgae. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(11), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms17111926>
- Pham, D. T., Everaert, G., Janssens, N., Alvarado, A., Nopens, I., & Goethals, P. L. M. (2014). Algal community analysis in a waste stabilisation pond. *Ecological Engineering*, *73*, 302–306. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.09.046>
- Pitarch, D. E., López, F., Marin, J., Residuos, R. De, Plana, L., Reciplasa, S. A., ... Iupa, A. (2007). Estrategia analítica para el control de contaminantes orgánicos prioritarios en aguas de lixiviado de plantas de tratamiento de RSU. *Residuos*, *95*, 46–55.
- Posada, J. A., Brentner, L. B., Ramirez, A., & Patel, M. K. (2016). Conceptual design of sustainable integrated microalgae biorefineries: Parametric analysis of energy use, greenhouse gas emissions and techno-economics. *Algal Research*, *17*, 113–131. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.04.022>
- Prescott, W., & Prescott, G. W. (1978). *How to know the freshwater algae. Library.*
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., & Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, *88*(10), 3411–3424. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.11.025>
- Renou, S., Givaudan, J. G., Poulain, S., Dirassouyan, F., & Moulin, P. (2008). Landfill leachate treatment: Review and opportunity. *Journal of Hazardous Materials*, *150*(3), 468–493. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.09.077>
- Renuka, N., Sood, A., Prasanna, R., & Ahluwalia, A. S. (2015a). Phycoremediation of wastewaters: a synergistic approach using microalgae for bioremediation and biomass generation. *International*

Journal of Environmental Science and Technology, 12(4), 1443–1460.
<https://doi.org/10.1007/s13762-014-0700-2>

Renuka, N., Sood, A., Prasanna, R., & Ahluwalia, A. S. (2015b).

Phycoremediation of wastewaters: a synergistic approach using microalgae for bioremediation and biomass generation. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12(4), 1443–1460.
<https://doi.org/10.1007/s13762-014-0700-2>

Renuka, N., Sood, A., Ratha, S. K., Prasanna, R., & Ahluwalia, A. S. (2013).

Nutrient Sequestration, Biomass Production By Microalgae and Phytoremediation of Sewage Water. *International Journal of Phytoremediation*, 15(8), 789–800.
<https://doi.org/10.1080/15226514.2012.736436>

Renuka, Nirmal, Sood, A., Ratha, S. K., Prasanna, R., & Ahluwalia, A. S.

(2013). Evaluation of microalgal consortia for treatment of primary treated sewage effluent and biomass production. *Journal of Applied Phycology*, 25(5), 1529–1537. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-9982-x>

Reyes, M. (2015). *Lixiviados en plantas de residuos. Una contribución para la selección del proceso de tratamiento (Tesis doctoral)*. Universidad Politécnica de Valencia. Retrieved from

[https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/56763/REYES - Lixiviados en plantas de residuos. Una contribución para la selección del proceso de trat....pdf?sequence=1](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/56763/REYES%20-%20Lixiviados%20en%20plantas%20de%20residuos.%20Una%20contribuci%C3%B3n%20para%20la%20selecci%C3%B3n%20del%20proceso%20de%20trat....pdf?sequence=1)

Romo, S., & Villena, M.-J. (2005). Phytoplankton strategies and diversity under different nutrient levels and planktivorous fish densities in a shallow Mediterranean lake. *Journal of Plankton Research*, 27(12), 1273–1286. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbi093>

Sabancı, F. Ç., & Koray, T. (2011). Annual variation in the diversity, species richness and composition of the phytoplankton assemblages in the Izmir bay (eastern Aegean). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 11(2), 303–313. <https://doi.org/10.4194/trjfas.2011.215>

- Safonova, E., Kvitko, K. V., Iankevitch, M. I., Surgko, L. F., Afti, I. A., & Reisser, W. (2004). Biotreatment of industrial wastewater by selected algal-bacterial consortia. *Engineering in Life Sciences*, *4*(4), 347–353. <https://doi.org/10.1002/elsc.200420039>
- Sánchez-Castillo, P. M., Cruz-Pizarro, L., & Carrillo, P. (1989). Caracterización Del Fitoplancton De Las Lagunas De Alta Montaña De Sierra Nevada (Granada, España) En Relación Con Las. *Limnética*, *5*(1978), 37–50. Retrieved from <http://limnetica.info/Limnetica/Limne5/Limnetica-vol5-pag37-50.pdf>
- Sardi Saavedra, A., Pena Salamanca, E. J., Madera Parra, C. A., & Ceron Hernandez, V. A. (2016). Diversidad de las comunidades de algas asociadas a un sistema algal de alta tasa fotosintética para la biorremediación de lixiviados de rellenos sanitarios. *Latin American Journal of Aquatic Research*, *44*(1), 113–120. <https://doi.org/10.3856/vol44-issue1-fulltext-11>
- Sarpal A, Claudia M T, Paulo R S, V. S. C. (2019). Biodiesel and Polyunsaturated Fatty Acid (PUFA) Potential of Microalgae Biomass-A Short Review. *Research & Development in Material Science*, *10*(4), 1182–1193. <https://doi.org/10.31031/RDMS.2019.10.000744>
- Sforza, E., Khairallah Al Emara, M. H., Sharif, A., & Bertucco, A. (2015a). Exploitation of urban landfill leachate as nutrient source for microalgal biomass production. *Chemical Engineering Transactions*, *43*, 373–378. <https://doi.org/10.3303/CET1543063>
- Sforza, E., Khairallah Al Emara, M. H., Sharif, A., & Bertucco, A. (2015b). Exploitation of urban landfill leachate as nutrient source for microalgal biomass production. *Chemical Engineering Transactions*, *43*, 373–378. <https://doi.org/10.3303/CET1543063>
- Stiles, W. A. V., Styles, D., Chapman, S. P., Esteves, S., Bywater, A., Melville, L., ... Llewellyn, C. A. (2018). Using microalgae in the circular economy to valorise anaerobic digestate: challenges and opportunities.

- Bioresource Technology*, 267, 732–742.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.100>
- Sun, X.-M., Ren, L.-J., Zhao, Q.-Y., Ji, X.-J., & Huang, H. (2018). Microalgae for the production of lipid and carotenoids: a review with focus on stress regulation and adaptation. *Biotechnology for Biofuels*, 11(272), 1–16.
<https://doi.org/10.1186/s13068-018-1275-9>
- Tam, N. F. Y., & Wong, Y. S. (1989). Wastewater nutrient removal by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus* sp. *Environmental Pollution*, 58(1), 19–34. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(89\)90234-0](https://doi.org/10.1016/0269-7491(89)90234-0)
- Tredici, M. R., Rodolfi, L., Biondi, N., Bassi, N., & Sampietro, G. (2016). Techno-economic analysis of microalgal biomass production in a 1-ha Green Wall Panel (GWP®) plant. *Algal Research*, 19, 253–263.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.09.005>
- van der Voort, M., Spruijt, J., Potters, J., de Wolf, P., & Elissen, H. (2017). *Socio-economic assessment of Algae-based PUFA production*.
<https://doi.org/10.18174/440229>
- Varfolomeev, S. D., & Wasserman, L. A. (2011). Microalgae as source of biofuel, food, fodder, and medicines. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47(9), 789–807.
<https://doi.org/10.1134/S0003683811090079>
- Vuppaladadiyam, A. K., Prinsen, P., Raheem, A., Luque, R., & Zhao, M. (2018). Sustainability Analysis of Microalgae Production Systems: A Review on Resource with Unexploited High-Value Reserves. *Environmental Science & Technology*, 52(24), 14031–14049. review-article. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02876>
- Whitton, R., Le Mével, A., Pidou, M., Ometto, F., Villa, R., & Jefferson, B. (2016). Influence of microalgal N and P composition on wastewater nutrient remediation. *Water Research*, 91, 371–378.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.12.054>

WWAP. (2017). *WWAP (United Nations World Water Assessment Programme). 2017. The United Nations World Water Development Report 2017. Wastewater: The Untapped Resource. Paris, UNESCO.*
Retrieved from www.unwater.org

Zhao, X., Zhou, Y., Huang, S., Qiu, D., Schideman, L., Chai, X., & Zhao, Y. (2014). Characterization of microalgae-bacteria consortium cultured in landfill leachate for carbon fixation and lipid production. *Bioresource Technology*, *156*, 322–328. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.112>