



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO
NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**Valorización de lactosuero para la obtención de biomasa de
microalgas y cianobacterias**

Tesis que presenta

Erika Rojo Gómez

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGIA

Directores de Tesis:

Dra. Rosa Olivia Cañizares Villanueva

Dr. Alfredo de Jesús Martínez Roldán

México, CDMX

julio, 2022

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante los dos años de mi estancia en la maestría.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN por abrirme las puertas para llevar a cabo mis estudios de posgrado.

Al Instituto Tecnológico de Durango y al Dr. Alfredo de Jesús Martínez Roldán por ser el medio que me permitió ingresar al laboratorio de Sistemas Ambientales del Programa de Posgrado (UPIDET) y realizar la estancia de investigación.

A la central analítica del CINVESTAV-IPN Unidad Zacatenco por el apoyo en la realización de los análisis cromatográficos de este trabajo.

A la empresa Holanda S.A. de C.V., ubicada en Nuevo Ideal, Durango por donarnos su efluente para la realización de este proyecto de investigación.

A mis directores de tesis, la Dra. Rosa Olivia Cañizares Villanueva y el Dr. Alfredo de Jesús Martínez Roldán por su dirección, paciencia y comentarios puntuales, de igual manera por el conocimiento que me brindaron durante el desarrollo de este proyecto.

A mi comité tutorial, por señalarme mis áreas de oportunidad y correcciones en el proyecto.

A mis padres y abuelos por apoyarme en este camino, alentándome y brindándome ánimos en los momentos complicados.

A mi hermana por confiar en mí y recordarme porqué inicié mis estudios de posgrado e igualmente por siempre darme palabras de aliento.

A mis amigas que, a pesar de las diferentes ramas de estudio, se emocionaban conmigo cuando les contaba lo que estaba haciendo y me animaban en los momentos complicados.

A mis compañeras de maestría del CINVESTAV por su apoyo y comentarios durante las reuniones que teníamos para ensayar nuestras presentaciones, por el compañerismo y la amistad brindada durante estos dos años.

A mis compañeros de Laboratorio en el Instituto Tecnológico de Durango por compartir su conocimiento conmigo y brindarme su amistad durante mi estancia.

A Juan Francisco Astorga Sánchez y a su abuelito, por ser el medio para conseguir el efluente lácteo para la realización de este proyecto y especialmente por brindarme su maravillosa amistad, apoyo moral y hospedaje durante los cuatro meses de mi estancia en la Ciudad de Durango, Dgo.

INDICE

Resumen	5
Summary	6
1. Introducción	7
1.1 Panorama de la industria láctea en México	7
1.2 Características del efluente lácteo	9
1.2.1 Lactosuero.....	9
1.4 Problemas ambientales generados por los residuos de la industria láctea .	11
1.5 Valorización y tratamiento del lactosuero	12
1.5.1 Tratamiento de aguas residuales lácteas con microalgas	14
1.5.2 Metabolismo de las microalgas	15
1.5.2.1. Mecanismo de asimilación de nutrientes en las microalgas.....	16
1.6 Microalgas	18
1.6.1 Algas verdes.....	18
1.6.1.1 <i>Chlorella vulgaris</i>	19
1.6.1.2 <i>Stigeoclonium nanum</i>	20
1.6.2. Cianobacterias.....	21
1.6.2.1 <i>Calothrix</i> sp.	21
1.7 Fotobiorreactores.....	23
1.7.1 Fotobiorreactores abiertos.....	23
1.7.2 Fotobiorreactores cerrados	23
2. JUSTIFICACIÓN.....	25
3. HIPÓTESIS.....	25
4. OBJETIVOS.....	26
4.1 Objetivo General.....	26
4.2 Objetivos Específicos	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
5.1. Microorganismos	27
5.2 Medios de cultivo.....	28
5.3. Condiciones de operación del reactor	28
5.4 Métodos analíticos.....	29
5.4.1 Demanda Química de Oxígeno (DQO)	30

5.4.2 Cuantificación de Nitratos	30
5.4.3 Cuantificación de Nitrógeno Amoniacal.....	30
5.4.4 Cuantificación de Fósforo Inorgánico	31
5.5. Parámetros determinados en la biomasa algal:	31
5.5.1 Determinación de pigmentos fotosintéticos	31
5.5.2 Peso seco (PS)	32
5.5.3 Liofilización.....	32
5.5.4 Carbohidratos totales	32
5.5.4.1 Cuantificación colorimétrica	32
5.5.4.1 Perfil de carbohidratos	33
5.5.5 Proteínas totales	33
5.5.5.1 Cuantificación colorimétrica	33
5.5.6 Lípidos Totales.....	33
5.5.6.1 Extracción	33
5.5.6.2 Perfil de lípidos.....	34
5.5.7 Carotenoides.....	35
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
7.1 Crecimiento de las microalgas en medio mineral y lactosuero	36
7.1.1 Biomasa	36
7.1.2 Nitrógeno y Fósforo.....	43
7.2 Tratamiento del efluente.....	49
7.3 Análisis bioquímico de la biomasa.....	52
7.3.1 Carbohidratos.....	52
7.3.2 Proteínas.....	57
7.3.3 Lípidos.....	58
7.3.4 Carotenoides	62
8. CONCLUSIONES	67
9. REFERENCIAS	68
10. ANEXOS.....	79
10.1 Anexo 1. Medio mineral BG-11	79
10.2 Anexo 2. Medio mineral Basal Bold.....	80
10.3 Anexo 3. Cuantificación de nitrógeno de nitrato (N-NO ₃): Método del resorcinol.....	81

10.4 Anexo 4. Cuantificación de fósforo inorgánico (Pi): Método modificado de Taussky y Shorr (González <i>et al.</i> 2000)	82
10.5 Anexo 5. Nitrógeno amoniacal. Método del Fenato. Standard Methods: (4500-Nitrogeno (Amonio))......	83
10.6 Anexo 6. Pigmentos fotosintéticos.....	84
10.7 Anexo 7. Cuantificación de Carbohidratos Totales: Método modificado de Dubois	85
10.8 Anexo 8. Determinación de Proteínas Totales por Lowry.....	86
10.9 Anexo 9. Curvas de calibración de fosfatos, nitratos, amoniaco, carbohidratos y proteínas.	87
10.10 Anexo 10. Cálculo de Clorofilas específicas	90
10.11 Anexo 11. Cálculo de velocidades de consumo NO ₃ , PO ₄ y NH ₃	92
10.12 Anexo 12. Cromatogramas de carbohidratos	97
10.13 Anexo 13. Cromatogramas de lípidos	100
10.14 Anexo 14. Cromatogramas de carotenos	103

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Principales Estados productores de leche en la República Mexicana. (SIAP-SAGARPA, 2019).....	7
Figura 2. Producción y consumo de queso en México (SIAP-SAGARPA, 2019)....	8
Figura 3. Aprovechamiento y generación de biomasa en un sistema alga-bacteria (Hamed <i>et al.</i> , 2019).	17
Figura 4. <i>Chlorella vulgaris</i> (Ramaraj <i>et al.</i> , 2016).....	20
Figura 5. <i>Stigeoclonium nanum</i> (CCALA, 2013).	21
Figura 6. <i>Calothrix sp.</i> (ATLAS, 2013).	22
Figura 7. Sistemas cerrados. A) tubular horizontal, B) Columna, C) Cara plana "flat panel", D) Tanque agitado (Martínez-Roldán y Cañizares-Villanueva, 2015). 24	
Figura 8. Esquema general de metodología.	27
Figura 9. Pigmentos fotosintéticos en medio mineral a) y b) BG-11 y c) BBM. $\bar{x} \pm SEM$ n=2.	37
Figura 10. Pigmentos fotosintéticos en lactosuero. $\bar{x} \pm SEM$ n=2.	39
Figura 11. Peso seco en las microalgas a) <i>Stigeoclonium nanum</i> , b) <i>Calothrix sp.</i> y c) <i>Chlorella vulgaris</i> . $\bar{x} \pm SEM$ n=2.	42
Figura 12. Cuantificación de nitrógeno de nitrato en a) <i>Stigeoclonium nanum</i> y <i>Calothrix sp.</i> en medio mineral BG-11 y en b) <i>Chlorella vulgaris</i> en medio BBM. $\bar{x} \pm SEM$ n=2.	44
Figura 13. Cuantificación de nitrógeno de nitrato en a) <i>Stigeoclonium nanum</i> y <i>Calothrix sp.</i> y b) <i>Chlorella vulgaris</i> en lactosuero. $\bar{x} \pm SEM$ n=2.	45

Figura 14. Cuantificación de fósforo de fosfatos en a) <i>Stigeoclonium nanum</i> y <i>Calothrix</i> sp. en medio mineral BG-11 y en b) <i>Chlorella vulgaris</i> en medio BBM. $\bar{x} \pm \text{SEM}$ n=2.	47
Figura 15. Cuantificación de fósforo de fosfatos en a) <i>Stigeoclonium nanum</i> , <i>Calothrix</i> sp. y b) <i>Chlorella vulgaris</i> en lactosuero. $\bar{x} \pm \text{SEM}$ n=2.	47
Figura 16. Cuantificación de nitrógeno amoniacal en lactosuero. $\bar{x} \pm \text{SEM}$ n=2 ...	49
Figura 17. Composición bioquímica de la biomasa cultivada en medio mineral (mm) y en lactosuero (ls).	54
Figura 18. Perfil de azúcares de la biomasa cultivada en medio mineral (mm) y lactosuero (ls).	56
Figura 19. Perfil de ácidos grasos en la biomasa cultivada en medio mineral (mm) y lactosuero (ls).	59
Figura 20. Comportamiento de astaxantina en medio mineral (mm) y lactosuero (ls).....	66
Tabla 1. Composición de lactosuero derivado de la producción de queso.....	10
Tabla 2. Caracterización del efluente de la empresa Holanda S.A. de C.V.	28
Tabla 3. Parámetros cinéticos obtenidos en medio mineral y lactosuero.....	43
Tabla 4. Porcentajes de remoción y consumo de N, P y DQO en lactosuero. Valores de error representados $\pm \text{DS}$ n=2.	51
Tabla 5. Carotenoides identificados en <i>C. vulgaris</i> , <i>S. nanum</i> y <i>Calothrix</i> sp.	63

Resumen

En los últimos 10 años el consumo de fermentos lácteos ha aumentado, alcanzando en 2021 un consumo de 559,000 toneladas de queso. Se estima que por cada kilo de queso producido se generan 9 L de lactosuero, el cual es considerado como desecho peligroso para el ambiente, debido a las altas concentraciones de DQO, DBO, fósforo y nitrógeno. La aplicación de microalgas para el tratamiento de este efluente es una alternativa atractiva debido a la versatilidad que estos organismos presentan para crecer en aguas residuales domésticas e industriales.

En el presente trabajo se cultivaron dos microalgas *Stigeoclonium nanum* y *Chlorella vulgaris* y una cianobacteria *Calothrix* sp., en lactosuero diluido al 40% para evaluar su crecimiento y capacidad para remover el nitrógeno y el fósforo presente en el efluente. La biomasa resultante fue evaluada bioquímica y cromatográficamente.

Los resultados obtenidos mostraron que *Stigeoclonium nanum* fue capaz de utilizar los nutrientes en el lactosuero obteniendo una densidad celular de 0.51 g L⁻¹ y remociones de 99.20% DQO, 60% PO₄, 98.73% NO₃ y 91.01% NH₃. Por su parte, *C. vulgaris* y *Calothrix* sp. no presentaron una diferencia significativa en su crecimiento cuando se cultivaron en medio mineral y lactosuero, sin embargo, lograron reducir en un 68.94% el PO₄ y 94.72% el nitrógeno amoniacal, respectivamente, sugiriendo a *S. nanum* como candidata para el tratamiento de lactosuero y para la producción de biomasa.

La caracterización bioquímica de la biomasa demostró que el lactosuero promovió la acumulación de proteínas y lípidos en la biomasa, siendo candidatos para su utilización en la industria alimentaria, así mismo, el lactosuero favoreció la acumulación de astaxantina en *Calothrix* sp., lo que la convierte en una alternativa potencial para la producción de este pigmento.

Summary

In the last 10 years the consumption of dairy ferments has increased, reaching in 2021 a consumption of 559,000 tons of cheese. It is estimated that for each Kg of cheese produced, 9 L of whey is generated, which is considered as hazardous waste to the environment, due to the high concentrations of COD, BOD, phosphorus, and nitrogen. The application of microalgae for the treatment of this effluent is an attractive alternative due to the versatility that these organisms present to grow in domestic and industrial wastewater.

In present work two microalgae, *Stigeoclonium nanum* and *Chlorella vulgaris*, and the cyanobacteria *Calothrix* sp. were cultivated in 40% mineral medium diluted whey to evaluate their growth and ability to remove nitrogen and phosphorus present in the effluent, and to analyze the biochemical composition of the biomass and its chromatographic profile.

The results showed that *S. nanum* was able to use the nutrients in the whey to obtain high cell density of 0.51 g L⁻¹ and removals of 99.20% COD, 60% PO₄, 98.73% NO₃ and 91.01% NH₃, while *C. vulgaris* and *Calothrix* sp. had low cell densities, but good percentages of removal of PO₄ (68.94%) and NH₃ (94.72%), respectively, suggesting that *S. nanum* is candidate for the treatment of whey and the production of biomass from culture in whey.

Biochemical characterization of biomass showed that whey promotes the accumulation of proteins and lipids in biomass, being candidates for use in the food industry, as well as whey favored the accumulation of astaxanthin in *Calothrix* sp, being an alternative to produce this pigment.

1. Introducción

1.1 Panorama de la industria láctea en México

A nivel mundial, México ocupa el decimocuarto lugar en la producción de lácteos, reportando hasta el 2018, una producción anual de 12,008 millones de litros, de los cuales, el 70% es empleada para la generación de derivados y fermentos lácteos como yogurt, crema y queso, alcanzando, para el mismo año, volúmenes de producción de 150 mil toneladas (Rumiantes, 2019; SADER, 2019).

La producción, tanto de leche como de sus derivados, se desarrolla a lo largo de toda la República Mexicana; sin embargo, la mitad de la producción nacional está concentrada en cuatro entidades principales, las cuales son Jalisco con 20.3% de la producción, seguido de Coahuila con un 11.3%, Durango con 11.2% y Chihuahua con 9.4% de producción, siendo los primeros tres los más importantes (Fig. 1).



Figura 1. Principales Estados productores de leche en la República Mexicana. (SIAP-SAGARPA, 2019).

En el marco de la industria láctea, el queso es uno de los productos derivados de la leche que en los últimos años ha presentado un crecimiento importante en México, reportando una producción del 38.8% en el 2018 y un consumo del

43.1% en el mismo año. Durante el año 2021 se estimó un consumo de 559,000 toneladas de queso. Se proyecta un aumento del 1% en el consumo durante 2022 (Inforural, 2021). En la Figura 2 se presentan los datos en toneladas reportadas por (CANILEC, 2021).

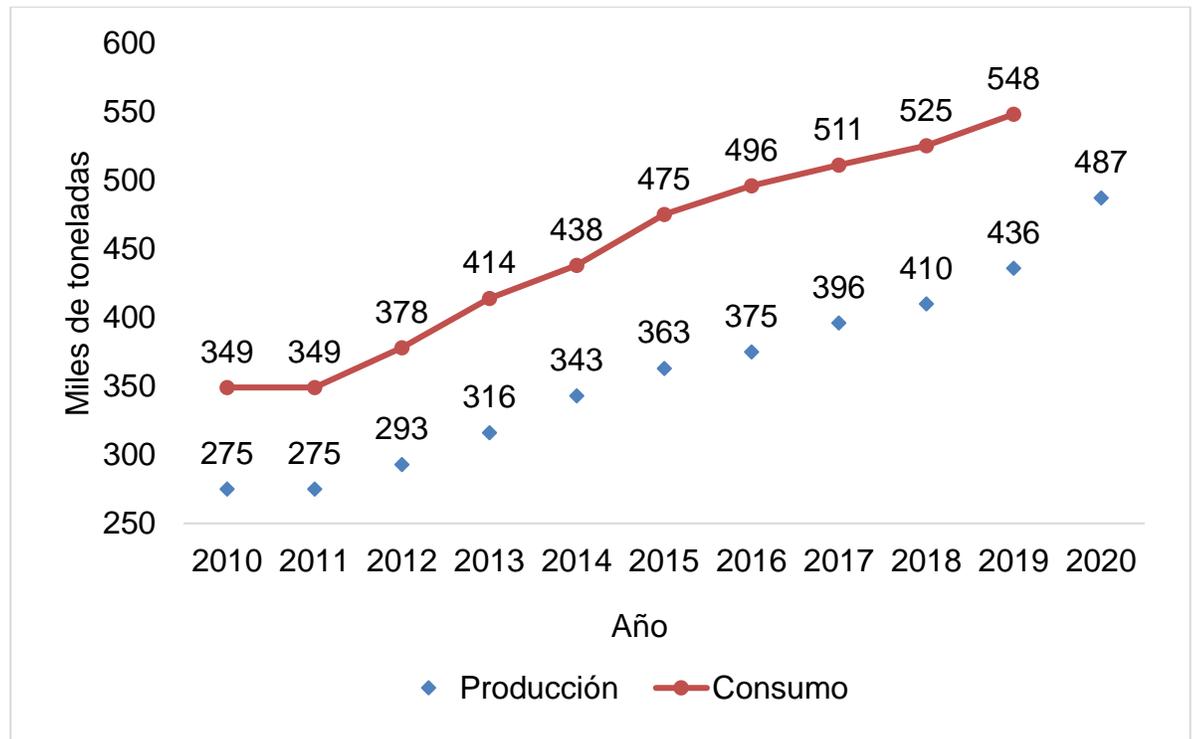


Figura 2. Producción y consumo de queso en México (SIAP-SAGARPA, 2019).

El aumento en el consumo de derivados lácteos como el queso, genera a la par un aumento en los residuos, el principal y más importante es el agua residual, estimándose que por cada litro de leche procesada se generan de 2.5 a 3 litros de aguas residuales y en general, se estima que a nivel mundial se llegan a producir de 4 a 11 millones de toneladas de desechos provenientes de la industria láctea (Ahmad *et al.*, 2019; Ritambhara *et al.*, 2019). El constituyente más abundante en los residuos provenientes del procesamiento de la leche a productos queseros es el lactosuero, seguido de sólidos y lodos, en el caso de tratamiento de aguas. Por las características que poseen los residuos lácteos, su disposición al ambiente sin un tratamiento previo, los convierten en contaminantes potenciales de suelo, agua y aire (Kushwaha *et al.*, 2011).

1.2 Características del efluente lácteo

La composición del efluente de la industria láctea se caracteriza por presentar altas concentraciones de demanda química de oxígeno (DQO) de entre 60-80 g/L y de demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅) de entre 30-50 g/L, además de materia orgánica disuelta como lactosa, grasas y proteínas; nitrógeno proveniente de las proteínas de la leche; fósforo inorgánico en forma de ortofosfato (PO₄³⁻) y polifosfatos (P₂O₇⁴⁻), sólidos suspendidos, residuos de detergentes derivados de las actividades de limpieza y desinfección de las máquinas utilizadas en los procesos de elaboración de productos lácteos, lo que les imparte un carácter alcalino. El efluente de la industria láctea es de apariencia blanquecina, turbio con mal olor y su temperatura es de 17-25° C (Slavov, 2017).

Las aguas residuales provenientes del procesamiento de la leche pueden dividirse en dos grupos, el primero engloba a las aguas residuales obtenidas del proceso y el segundo, a las que provienen de la transformación de la leche en queso, o algún otro producto (Kushwaha *et al.*, 2011).

El queso es uno de los principales derivados de la industria láctea, la cual destina el 63% de la producción nacional de leche para su elaboración (González, 2012). El lactosuero es uno de los principales desechos de este sector de la industria y el que genera mayor contaminación, debido a que posee valores elevados de DQO y DBO debido a su contenido de lactosa, grasas, proteínas, minerales y vitaminas (Valencia y Ramírez, 2009; Ahmad *et al.*, 2019).

1.2.1 Lactosuero

El suero de leche o lactosuero es el producto lácteo de apariencia amarillo-verdosa (debido a la presencia de riboflavina), que se deriva del proceso de obtención de queso. Dicho proceso consiste en realizar una ruptura en el sistema coloidal de la leche, por medio de acción enzimática o ácida, dando lugar a dos fracciones: 1) una fracción sólida, compuesta principalmente por

proteínas insolubles y lípidos y 2) una fracción líquida, llamada lactosuero. Esta fracción líquida está constituida por 90% de agua proveniente de la leche, 98% de lactosa, ~25% de proteínas y ~50% de sales inorgánicas, las cuales no fueron integradas durante la coagulación del subproducto (Prazeres *et al.*, 2012; Poveda *et al.*, 2013). El lactosuero contiene partículas suspendidas solubles y no solubles (proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales).

De acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas, el lactosuero se clasifica en: dulce y ácido (Tabla 1). El lactosuero dulce es obtenido por la fragmentación de la caseína de la leche por acción enzimática (cuajo o enzimas proteolíticas), provocando la precipitación de las proteínas por desestabilización. Este proceso se da en condiciones de pH ligeramente ácidas (5.8 y 6.6) y temperaturas entre 15°C y 50°C. Los quesos de pasta cocida y prensada son algunos de los productos elaborados por acción enzimática. El lactosuero ácido es obtenido por la coagulación de la caseína, resultado de la adición de ácidos orgánicos o ácidos minerales. A valores de pH ácidos (4.5 o 4.6) la caseína alcanza su punto isoeléctrico, ganando una carga neta de cero, provocando la precipitación de la caseína por desestabilización de la micela proteica, dejando en la solución proteínas séricas. Entre los quesos elaborados por adición de ácidos orgánicos, se encuentran los quesos frescos de pasta blanda, obtenidos de leche de vaca y cabra (Parra-Huertas, 2009; Callejas-Hernández *et al.*, 2012; Hernández-Pérez y Labbé, 2014;).

Tabla 1. Composición de lactosuero derivado de la producción de queso.

Característica	Lactosuero ácido (g/kg de lactosuero)	Lactosuero dulce (g/kg de lactosuero)
Materia seca	55 - 65	55 - 75
Lactosa	40 - 50	40 - 50
Grasa bruta	0 - 5	0 - 5
Proteína bruta	7 - 12	9 - 14
Cenizas	6 - 8	4 - 6

pH	< 4.5	> 6.0
Fósforo (Fosfato g/L)	0.5 - 0.8 (2.0 - 4.5)	0.4 - 0.7 (1.0 - 3.0)
pH	>6.0	<4.5
Ácido láctico	0 - 0.3	7 – 8
Calcio	1.2 - 1.4	0.4 - 0.6
Potasio	1.4 - 1.6	1.4 - 1.6
Cloruros	2.0 - 2.2	2.0 - 2.2

(Callejas-Hernández *et al.*, 2012).

Durante el procesamiento de queso, aproximadamente se generan 9 L de lactosuero por 1 Kg de queso producido. Con lo anterior, se estima que para el 2023 la producción mundial de lactosuero sea de 230 millones de toneladas (Rama *et al.*, 2019).

El lactosuero, al igual que el efluente lácteo, se caracteriza por altas concentraciones de DQO (50-70 g/L) y DBO (27-60 g/L) debido al contenido de materia orgánica presente y concentraciones importantes de compuestos inorgánicos, que hacen riesgosa su disposición al medio ambiente sin un tratamiento previo, con lo que causan problemas de contaminación (Prazeres *et al.*, 2012).

1.4 Problemas ambientales generados por los residuos de la industria láctea

Debido a la alta carga orgánica presente en los residuos de la industria láctea, su descarga al ambiente, sin tratamiento previo, puede traer problemas ambientales, afectando las propiedades fisicoquímicas del suelo y provocando eutrofización en cuerpos de agua, aunado a la contaminación del aire, provocada por la descomposición de sus componentes orgánicos, con la consecuente generación de mal olor.

La descarga de los residuos provenientes del procesamiento de los derivados lácteos (quesos, mantequilla, yogurt, entre otros) en los cuerpos de agua,

provocan eutrofización, debido a las altas concentraciones de fósforo, nutriente que estimula el crecimiento de microorganismos y plantas acuáticas y provoca una disminución en el oxígeno disponible y en la filtración de la luz, causando la muerte de las especies acuáticas, como resultado del disturbio ecológico que sufre su hábitat (Valencia y Ramírez, 2009; Ahmad *et al.*, 2019).

En el suelo, las altas concentraciones de nitrógeno soluble disminuyen el rendimiento de las cosechas, además de que provocan fenómenos de lixiviado. Aun cuando el nitrógeno se encuentra disponible de manera natural o por adición de fertilizantes, su incorporación al suelo eleva la concentración de este nutriente. El exceso de nitrógeno en el suelo no permite su absorción por las plantas, además de que se inhibe el transporte de este nutriente a través de la raíz. El exceso de nitrógeno se filtra a través de las capas del suelo hasta llegar a los mantos freáticos, convirtiéndose en un peligro para la salud humana y animal (Valencia y Ramírez, 2009).

El tratamiento de los efluentes lácteos es importante para la preservación del medio ambiente y de la salud humana. En este sentido, la valorización del lactosuero es una alternativa para su aprovechamiento, no solo por la obtención de productos de alto valor agregado sino también por la disminución de la carga orgánica tomándose como un tratamiento del residuo.

1.5 Valorización y tratamiento del lactosuero

La valorización del lactosuero tiene como propósito aprovechar los nutrientes presentes en el mismo, para convertirlo de un “residuo” a un producto de valor agregado. Entre los nutrientes importantes presentes en el lactosuero se encuentra la lactosa, siendo este el carbohidrato más abundante, seguido de proteínas como β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, lactoferrina, lacto peroxidasa, inmunoglobulinas y glicomacropéptidos (Parra-Huertas, 2009), minerales (K, Ca, P, Na y Mg), vitaminas del grupo B (tiamina, ácido pantoténico, riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico y cobalamina) y ácido ascórbico (González *et al.*, 2017), todos con un alto grado nutricional e interés industrial.

En términos generales, el proceso de valorización se divide en: fisicoquímico y biológico. De acuerdo con el capital y el tamaño de la empresa productora de queso, será el tipo de tratamiento que se le dará al lactosuero. Los tratamientos fisicoquímicos buscan la recuperación de proteína, lactosa y otros componentes de interés comercial presentes en el efluente, por medio de operaciones de precipitación y separación por membrana (filtración, ultrafiltración y/o nanofiltración), obteniéndose como productos: lactosuero en polvo, concentrado proteico, permeado de lactosa, lactosa y minerales. Sin embargo, este proceso de separación presenta desventajas como el “taconamiento” de la membrana, disminuyendo su eficiencia y aumentando costos de mantenimiento, además, dependiendo de la fracción separada (proteínas o azúcares), el permeado resultante debe ser tratado, debido a su alto contenido de lactosa y/o proteínas. Por su parte, el tratamiento biológico involucra el aprovechamiento de la lactosa presente en el lactosuero para ser utilizada como sustrato en procesos de fermentación para la obtención de bioproductos como ácidos orgánicos, alcoholes, plásticos, proteínas unicelulares, hidrógeno y metano para producir energía (Prazeres *et al.*, 2012; Zotta *et al.*, 2020). En América Latina, la mayoría de las empresas productoras de queso son pequeñas y medianas, lo que dificulta el uso de tecnologías para valorizar el lactosuero, debido al elevado costo de los procesos fisicoquímicos, siendo una opción el tratamiento biológico (González *et al.*, 2017). La valorización no solo puede estar enfocada en la transformación o recuperación de nutrientes, sino además como un tratamiento, de tal forma que se reduzca la contaminación y al mismo tiempo se obtengan dos beneficios, agua con una calidad aceptable y productos de valor agregado. En este sentido, las microalgas han demostrado una amplia versatilidad para ser usadas en procesos de tratamiento de diferentes aguas residuales (González *et al.*, 1997) así como en la acumulación y producción de diversos productos, convirtiendo su biomasa en materia valiosa para su transformación.

1.5.1 Tratamiento de aguas residuales lácteas con microalgas

Los tratamientos biológicos más utilizados en la industria láctea son los procesos aerobios y anaerobios, los cuales han mostrado una efectividad en la oxidación de la materia orgánica presente en el agua residual láctea y en la disminución de sólidos sedimentables. Sin embargo, la principal limitación de estos tratamientos es la alta carga orgánica del efluente, lo cual causa problemas operacionales como lo son acidificación del medio, limitación de la transferencia de oxígeno y dificultad de sedimentación de lodos por crecimiento excesivo de microorganismos filamentosos, por mencionar algunos (Prazeres *et al.*, 2012). Estos tipos de procesos no resultan efectivos para eliminar compuestos inorgánicos como nitrógeno y fósforo, compuestos que se encuentran en altas concentraciones en las aguas residuales industriales y agrícolas.

Se ha demostrado la capacidad de algunas microalgas para crecer y tratar efluentes lácteos, tal es el caso de Melo *et al.* (2018) quienes cultivaron la microalga *Chlorella vulgaris* en lactosuero, ajustando la concentración de lactosa a 10 g L^{-1} , obteniendo porcentajes de remoción de 73% de DQO, 100% en nitrógeno total y una productividad de biomasa de 1.60 g L^{-1} , en condiciones mixotróficas. Por otro lado, Marazzi *et al.* (2020) evaluaron la capacidad de *Scenedesmus acuminatus* para tratar agua residual láctea, la cual no recibió un pretratamiento o dilución, lográndose obtener eficiencias de remoción favorables, alcanzándose porcentajes del 93% DQO, 88% nitrógeno total, 69% fósforo y 88% para nitrógeno amoniacal. De igual forma, se utilizó la cianobacteria *Pseudoanabaena* sp para el tratamiento de un efluente lácteo, diluido con agua corriente (de la llave) en una proporción 35:65. Los porcentajes de remoción fueron 90% para DQO, nitrógeno total y fósforo total (Tsolcha *et al.*, 2016). Los trabajos realizados por Tsolcha *et al.*, 2016 y Marazzi *et al.* (2020) aprovecharon las interacciones simbióticas entre microalgas y bacterias y demostraron que existe un efecto positivo durante el tratamiento de efluentes lácteos.

El lactosuero también ha sido utilizado como cosustrato para el tratamiento de otros residuos que carecen de algunos necesarios para el cultivo de microalgas. Tal es el caso de Koutra *et al.* (2021), quienes utilizaron lodos provenientes de un proceso de digestión y lo enriquecieron adicionando lactosuero para el cultivo de *Chlorella vulgaris*, logrando obtener una densidad celular de 1.63 g L^{-1} , una disminución de DQO del 86.5% y reducciones superiores del 60% de nitrógeno y fósforo en el lactosuero. Con lo anterior se demostró que el lactosuero puede ser utilizado como sustrato para la generación de biomasa de microalgas, además de servir para el tratamiento de éste durante el proceso.

Además de lo mencionado anteriormente, el empleo de microalgas en el tratamiento de aguas residuales, presenta varias ventajas frente a los tratamientos aerobios y anaerobios, ya que al ser microorganismos fotosintéticos oxigénicos, han demostrado ser capaces de crecer en altas concentraciones de nitrógeno y fósforo (Kushwaha *et al.*, 2011; Abdel-Raouf *et al.*, 2012) siendo la principal actividad, la generación de lodos no tóxicos con potencial de aprovechamiento de la biomasa producida, baja proliferación de microorganismos patógenos, remoción de metales pesados y la liberación de oxígeno producido por su actividad fotosintética, el cual es aprovechado por bacterias aerobias presentes en el agua residual para su metabolismo (Hamed *et al.*, 2019; Jitendra *et al.*, 2019).

1.5.2 Metabolismo de las microalgas

Las microalgas son capaces de asimilar tanto fuentes de carbono orgánicas como inorgánicas, lo que les confiere una habilidad metabólica aprovechable para obtener biomasa en diferentes medios de cultivo. Con base en la fuente de carbono, el metabolismo se divide en fotoautótrofo, heterótrofo, fotoheterótrofo y mixotrófico. El fotoautótrofo es el metabolismo general utilizado por los organismos fotosintéticos, en el cual usan la luz como fuente de energía para fijar CO_2 y sintetizar compuestos orgánicos. De manera similar, el metabolismo fotoheterótrofo utiliza la luz como fuente de energía, pero la fuente de carbono son compuestos orgánicos. Por su parte, el metabolismo heterotrófico utiliza

compuestos orgánicos como fuente tanto de energía como de carbono. Finalmente, el metabolismo mixotrófico utiliza la luz como fuente principal de energía y como fuente de carbono compuestos tanto orgánicos como inorgánicos, siendo esencial la presencia de ambos en el ambiente. Se ha considerado que este último tipo de metabolismo presenta mejores rendimientos en crecimiento y obtención de biomasa (Martínez-Roldán e Ibarra-Berumen, 2019).

1.5.2.1. Mecanismo de asimilación de nutrientes en las microalgas

Las microalgas fijan CO₂ por medio de la fotosíntesis, proceso que consiste en utilizar la energía lumínica para transformarla en energía química, la cual es aprovechada para la biosíntesis de carbohidratos y producción de biomasa. La primera opción de fuente de carbono que utilizan las microalgas es el CO₂, el cual en sistemas cerrados puede estar disuelto en agua en forma de HCO₃⁻, que también es utilizado por las microalgas como segunda opción, siempre y cuando se encuentre en disolución. Sin embargo, es necesaria la participación de la anhidrasa carbónica para hacer la conversión de HCO₃⁻ a CO₂, lo que provoca un aumento en el pH alterando la química del agua, conduciendo a una precipitación y eliminación del fósforo. Durante el proceso de fijación de CO₂, las microalgas liberan O₂ como producto de “desecho”, el cual puede ser aprovechado por los microorganismos heterótrofos aerobios para el catabolismo de la materia orgánica presente en el agua residual (Hamed *et al.*, 2019; Jitendra *et al.*, 2019). Esta simbiosis se esquematiza en la Figura 3.

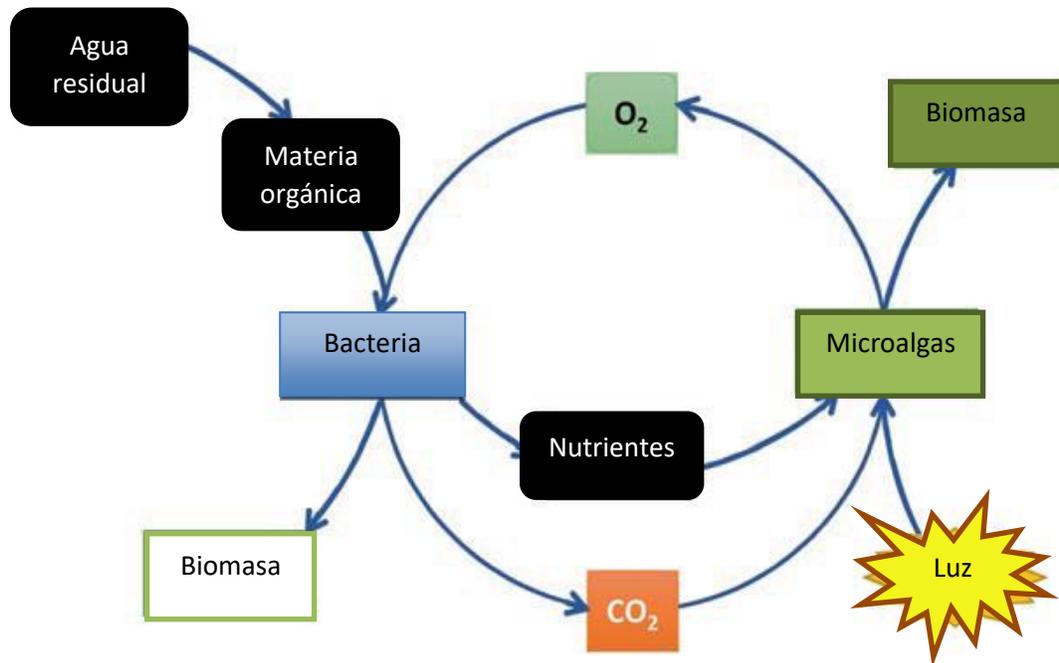


Figura 3. Aprovechamiento y generación de biomasa en un sistema alga-bacteria (Hamed *et al.*, 2019).

Las microalgas también son capaces de reducir la concentración de nutrientes de forma directa e indirecta. La primera consiste en la asimilación de los nutrientes como el fósforo y el nitrógeno presentes en el agua residual, los cuales son utilizados para la síntesis de componentes celulares como aminoácidos y ácidos nucleicos. La segunda es la remoción de nutrientes por precipitación, provocada por cambios de pH, producto de la actividad metabólica de las microalgas residual (Hamed *et al.*, 2019; Jitendra *et al.*, 2019).

El nitrógeno se encuentra en forma de nitratos (NO_3^-), nitritos (NO_2^-), óxido nítrico (NO), amonio (NH_4^+) y nitrógeno molecular (N_2). La forma principalmente utilizada por las algas son los nitratos, debido a su estabilidad. Esta forma de nitrato es tomada por la célula por co-transporte de NO_3^-/H^+ dependiente de H^+ -ATPasa. Los nitratos son reducidos a amonio (NH_4^+) para la biosíntesis de compuestos nitrogenados. El amonio libre puede ser tóxico para varias microalgas, debido a que provoca el desacoplamiento de la fotosíntesis. La disponibilidad de amonio depende del pH del medio. Es importante mencionar

que las cianobacterias son capaces de fijar nitrógeno molecular (N_2), el cual puede ser posteriormente incorporado a compuestos nitrogenados o puede ser excretado residual (Hamed *et al.*, 2019; Jitendra *et al.*, 2019).

El fósforo está disponible como fosfatos u ortofosfatos, los cuales juegan un papel importante en el metabolismo de la microalga, ya que están involucrados en diversos procesos y forman parte de los ácidos nucleicos, lípidos y ATP. El fósforo entra a la membrana celular por medio del transporte activo en forma de $H_2PO_4^-$ y HPO_4^{2-} ; la incorporación de PO_4^{3-} a los compuestos orgánicos ocurre a nivel de sustrato, fosforilación oxidativa y fotofosforilación residual (Hamed *et al.*, 2019; Jitendra *et al.*, 2019).

Además del nitrógeno y el fósforo, los efluentes provenientes de la industria láctea pueden contener metales pesados. Estos metales pueden ser asimilados y reducidos por las microalgas, debido a que presentan afinidad por metales polivalentes. En los procesos de captación de metales, se encuentran involucrados diferentes mecanismos, pero de manera general, las microalgas son capaces de acumular metales como Co, Ca, Cu, Cr, Mg, Mo, Pb, Se y Zn de manera intracelular, mediante transporte activo a través de la membrana (Hamed *et al.*, 2019; Singh y Pandey, 2019).

1.6 Microalgas

Las microalgas son un grupo de organismos eucariotas (algas verdes) y procariotas (cianobacterias o algas verde-azules) que realizan la fotosíntesis oxigénica, contribuyendo con alrededor del 50% en la producción total de oxígeno en la Tierra. Su tamaño varía de 0.5 a 200 μm , con una amplia distribución en mares, cuerpos de agua dulce y agua salada, en rocas y en suelos (Hamed *et al.*, 2019).

1.6.1 Algas verdes

Las algas verdes forman colonias filamentosas con tallos unicelulares. Morfológicamente son similares a las plantas, presentando organelos

delimitados y pared celular compuesta de celulosa y polisacáridos no celulósicos; sus pigmentos colectores de luz son principalmente clorofilas “a” y “b”. Como pigmentos accesorios se encuentran las xantofilas, los β -carotenos y los γ -carotenos. Son capaces de acumular almidón como material de reserva (Queiroz *et al.*, 2020).

1.6.1.1 *Chlorella vulgaris*

Pertenece al Filum *Chlorophyta* al Orden *Chlorophyceae* y la Familia *Chlorellaceae*. Es una microalga unicelular, esférica con un diámetro de 2-10 μm , distribuida en cuerpos de agua dulce. Su reproducción es asexual por autoesporas. Los pigmentos más abundantes en *C. vulgaris* son la clorofila a y clorofila b, los cuales se encuentran en los cloroplastos dándole su color verde. También contiene pigmentos accesorios como β -caroteno, astaxantina, cantaxantina, luteína, feofitina a y b, y violoxantina (Safi *et al.*, 2014; Pérez *et al.*, 2017). Al ser el alga verde más estudiada, se han realizado investigaciones para mejorar su producción de lípidos para la obtención de biodiesel (Yun *et al.*, 2019), tratamiento de efluentes agroindustriales y obtención de biomasa (González *et al.*, 1997; Melo *et al.*, 2018). Recientemente se ha explorado su eficiencia en el tratamiento de contaminantes emergentes como iohexol (Akao *et al.*, 2020) e hidroquinona (Chen *et al.*, 2020), en la obtención de colorantes como violaxantina (Kim *et al.*, 2020) y en el aprovechamiento de efluentes azucareros para la producción de biomasa y pigmentos (Nivetha *et al.*, 2019).

Chlorella vulgaris presenta una versatilidad metabólica, siendo capaz de crecer en condiciones autotróficas, heterotróficas y mixotróficas. Puede acumular, bajo condiciones óptimas de crecimiento, 9-55%, 5-40% y 42-58% en peso seco de carbohidratos, lípidos y proteínas, respectivamente (Safi *et al.*, 2014).

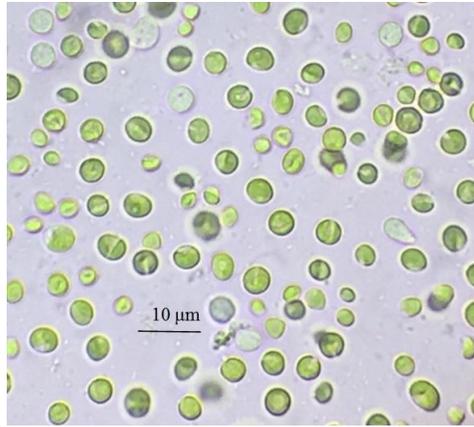


Figura 4. *Chlorella vulgaris* (Ramaraj *et al.*, 2016).

1.6.1.2 *Stigeoclonium nanum*

Pertenece al orden *Chaetophorales*, es un alga verde filamentosa ramificada, con una morfología cilíndrica de barril, generalmente más ancho que largo, con un diámetro de 7.3-11.5 μm y 6.2-12.1 μm de largo, excepto en las áreas de crecimiento donde son más anchas. Se encuentra en el ambiente en forma epífita o planctónica en aguas con movimiento y estancadas (Novelo, 2012). Su reproducción es asexual por zoosporas (Hašler *et al.*, 2017).

El campo de mayor aplicación de *S. nanum* es en los sistemas de acuicultura con recirculación gracias a su eficacia en la remoción de nitrato, nitrito y fósforo tanto en forma libre (Ramli *et al.*, 2018), como inmovilizada presentando en esta última una remoción más eficiente de amonio, comparado con su forma libre (Ramli *et al.*, 2017). Otra configuración donde *S. nanum* ha demostrado una productividad mayor de crecimiento y obtención de biomasa es en el reactor "flat panel", reportando una productividad de 113 $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ (Martinez-Roldán *et al.*, 2019).

Por otro lado, se ha reportado una acumulación del 16% de lípidos, en condiciones óptimas de cultivo (Velasco-Flores *et al.*, 2018). Además, *S. nanum* ha demostrado ser capaz de producir fitohormonas como citoquininas y giberelinas (Stirk *et al.*, 2013), ambas involucradas en procesos de crecimiento

y producción de pigmentos y lípidos en plantas superiores (Romanenko *et al.*, 2016).

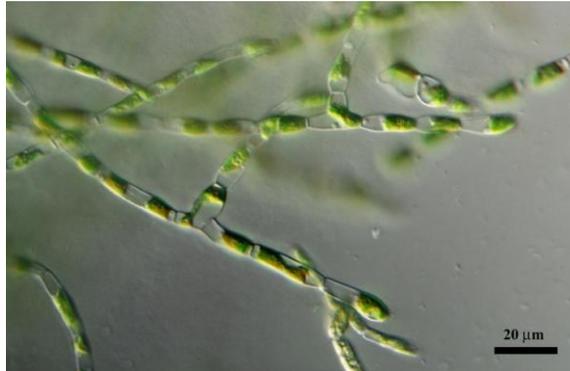


Figura 5. *Stigeoclonium nanum* (CCALA, 2013).

1.6.2. Cianobacterias

Las cianobacterias o algas verde azules son bacterias Gram (-) no móviles, fijadoras de nitrógeno y carbono, con la capacidad de realizar fotosíntesis oxigénica, separándolas de las bacterias rojas y verdes anoxifototrófas (Markou y Georgakakis, 2011). Su distribución ecológica es diversa, encontrándose en ambientes acuáticos y terrestres a temperaturas tropicales (plancton), templado y fríos. Su diversidad morfológica está caracterizada por la presencia de heterocistos, tricomas, hormogonios y aquinetos (Shalini *et al.*, 2009). Las moléculas colectoras de luz que les otorga su color verde-azul son la clorofila a, ficocianina, aloficocianina y fitoeritrina. La presencia de β -caroteno es universal en todas las cianobacterias mientras que la presencia de xantofilas (equinona, zeaxantina, oscilaxantina, mixoxantofila) varía de acuerdo con la especie. El principal material de reserva es α -1,4-glucano ligado al almidón (almidón cianoficiano) (Queiroz *et al.*, 2020).

1.6.2.1 *Calothrix* sp.

Pertenece al orden *Nostocales* y la familia *Calothricaceae*, es un alga verde-azul filamentosa septada con una morfología cilíndrica o en forma de barril que se reproducen por hormogonio. Pueden estar solas o agrupadas y se

distribuyen en regiones templadas, tropicales y subtropicales y en cuerpos de agua dulce, mares, agua estancada y ríos. Presentan tricomas cónicos con heterocistos. El tricoma maduro presenta un heterocisto terminal, zona donde ocurre la división. Los géneros más representativos dentro de esta familia son *Calothrix*, *Rivularia* y *Gloeotrichia* (Berrendero *et al.*, 2008; Shalini *et al.*, 2009; Guiry y Guiry, 2020).

Se ha reportado la presencia de *Calothrix* sp. en suelos formando parte de la microbiota y gracias a su capacidad para fijar nitrógeno y para fertilizar el suelo, su aplicación se orienta a la producción de biofertilizantes (Manjunath *et al.*, 2016), de promotores de crecimiento de plantas por su producción ácido indolacético en suelo (Priya *et al.*, 2015) y fitohormonas como ácido salicílico y citoquininas (Toribio *et al.*, 2020). Por otro lado, las cianobacterias del género *Calothrix* sp. han demostrado producir compuestos antimicrobianos y antifúngicos (Radhakrishnan *et al.*, 2009; Malathi *et al.*, 2015; Nehul, 2021). De igual manera se ha encontrado que acumula lípidos poliinsaturados, lo cual la convierte en candidata para la obtención de biocombustibles (Gayathri *et al.*, 2018). Al poseer heterocistos, *Calothrix* sp. posee la enzima nitrogenasa de la cual bajo condiciones fotoautótrofas puede obtenerse biohidrógeno (Leino *et al.*, 2011; Kosourov *et al.*, 2017). También se ha reportado la producción de pigmentos y carotenoides (Olvera-Ramírez *et al.*, 2000; Kosourov *et al.*, 2016)



Figura 6. *Calothrix* sp. (ATLAS, 2013).

1.7 Fotobiorreactores

Los fotobiorreactores son sistemas en los cuales las microalgas se cultivan con la finalidad de obtener altas densidades celulares para la obtención de productos con alto valor agregado. La selección del sistema está en función del microorganismo utilizado y el producto que se espera obtener. Existen dos configuraciones generales de fotobiorreactores: los abiertos y los cerrados (Martínez-Roldán y Cañizares-Villanueva, 2015).

1.7.1 Fotobiorreactores abiertos

Los sistemas abiertos de fotobiorreactores son una de las primeras configuraciones utilizadas en la producción de biomasa. Se caracterizan por encontrarse en contacto con el ambiente, lo cual los hace propensos a contaminación con otras especies, a tener poco control de las variables operacionales, además de la selectividad de las microalgas que pueden crecer en este tipo de sistemas. Estos sistemas se dividen en naturales y en artificiales. Los primeros se encuentran en cuerpos de agua con características específicas, sin embargo, la producción de biomasa es limitada, debido a que las condiciones de cultivo están en función de las condiciones ambientales. En cambio, los sistemas artificiales, son sistemas construidos en espacios a la intemperie (Martínez-Roldán y Cañizares-Villanueva, 2015).

1.7.2 Fotobiorreactores cerrados

Los sistemas cerrados, resultan ideales para el cultivo selectivo de microalgas con densidades celulares menores, además de que se pueden controlar variables como temperatura, pH y concentración de CO₂ y proveer las condiciones apropiadas para mejorar la transferencia de masa del CO₂, el mezclado de los nutrientes y el control de la intensidad de la luz. Estos sistemas, de manera similar a los sistemas abiertos, presentan diferentes configuraciones (Fig. 8), como las de tipo panel, tanque o tubular. La selección del tipo de configuración está en función de los requerimientos del

microorganismo a cultivar, las condiciones de cultivo y del producto de interés que se desea producir (Jitendra *et al.*, 2019).

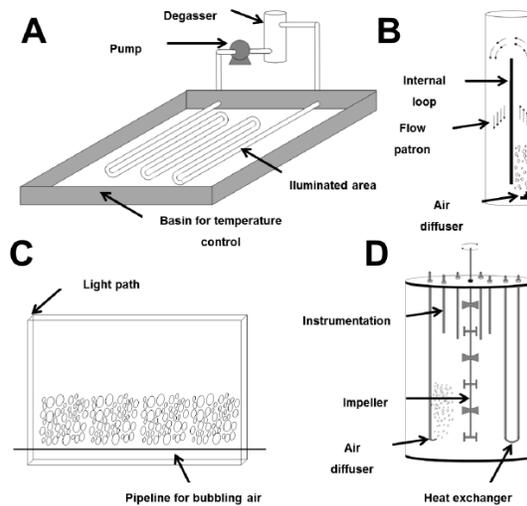


Figura 7. Sistemas cerrados. A) tubular horizontal, B) Columna, C) Cara plana "flat panel", D) Tanque agitado (Martínez-Roldán y Cañizares-Villanueva, 2015).

Los fotobiorreactores "flat panel" son un tipo de configuración muy utilizada por sus altos niveles de producción de biomasa y bajos valores de esfuerzo de corte, previniendo la lisis celular de especies sensibles como las cianobacterias. El modo de operación de los fotobiorreactores "flat panel" es similar a los tubulares, con la diferencia de que el aprovechamiento de la luz en los "flat panel" es mejor. Para evitar efectos de auto sombreado dentro del reactor por alta concentración celular, la trayectoria de la luz no debe exceder los 10 cm. Los materiales de construcción de estos fotobiorreactores pueden ser láminas de polietileno, cristal, policarbonato o acrílico, etc. (Contreras-Flores *et al.*, 2003).

2. JUSTIFICACIÓN

Las aguas residuales de la industria láctea que se vierten al ambiente sin tratamiento previo constituyen un problema ambiental, debido a su composición y el contenido de algunos nutrientes como fósforo y nitrógeno. El empleo de microalgas para el tratamiento de estos residuos presenta ventajas frente a los tratamientos biológicos utilizados de manera tradicional (principalmente la digestión aerobia y anaerobia), como son la generación de lodos no tóxicos y la simbiosis con microorganismos heterótrofos aerobios, lo cual reduce un 50% los costos de operación por aireación.

La biomasa microalgal producida puede ser utilizada para la obtención de productos de alto valor agregado como pigmentos, combustibles, suplementos alimenticios, antioxidantes, etc.

3. HIPÓTESIS

La asimilación de los componentes del lactosuero por parte de las microalgas permitirá disminuir la concentración de DQO, nitrógeno y fósforo presentes en el efluente y cambiará la composición bioquímica de la biomasa.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Obtención de biomasa de microalgas empleando lactosuero diluido como medio de cultivo para su valorización y como tratamiento del efluente lácteo.

4.2 Objetivos Específicos

1. Obtener parámetros cinéticos de las microalgas y la cianobacteria creciendo en un fotobiorreactor “flat panel” empleando un medio mineral y lactosuero como medio de cultivo.
2. Comparar los parámetros cinéticos de las microalgas y la cianobacteria creciendo en un fotobiorreactor “flat panel” con medio mineral y adicionando lactosuero.
3. Evaluar la obtención de subproductos de alto valor, mediante la caracterización de las fracciones proteica, lipídica y de carotenoides de la biomasa.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

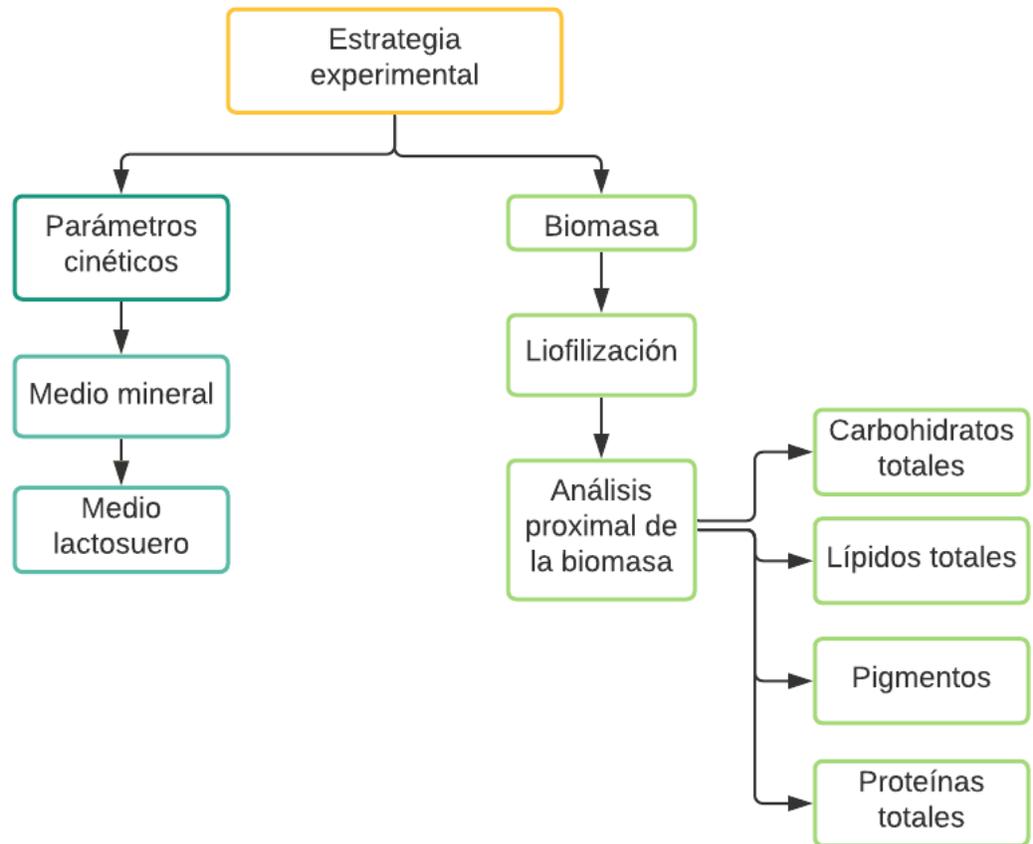


Figura 8. Esquema general de metodología.

5.1. Microorganismos

Se utilizaron tres microalgas, el alga verde *Chlorella vulgaris* y la cianobacteria *Calothrix* sp. (Colección del Laboratorio de Microalgas del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV Zacatenco), y el alga verde *Stigeoclonium nanum*, donada por el Dr. Alfredo de Jesús Martínez Roldán (Instituto Tecnológico de Durango). Esta cepa fue aislada del clarificador de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) Sur de la Ciudad de Durango, Dgo. México.

5.2 Medios de cultivo

Se utilizó un medio mineral definido como control para la determinación de los parámetros cinéticos de las tres cepas de estudio. Para el cultivo de *Stigeoclonium nanum* y *Calothrix* sp. se utilizó medio mineral BG-11 (Stanier *et al.*, 1971), mientras que para *Chlorella vulgaris* se empleó medio BBM (Bold, 1949).

De igual manera se utilizó un medio complejo, lactosuero, para la determinación de los parámetros cinéticos, el cual fue obtenido de la empresa Holanda S.A, de C.V., Durango. El efluente fue caracterizado en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Análisis Instrumental, UPIDET Durango. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2. El lactosuero es de carácter ácido (pH=5.4). El efluente fue colectado en botellas de plástico de polietileno de 10 L y se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta su uso. El lactosuero fue filtrado utilizando manta de algodón y posteriormente se ajustó el pH a 7 ± 0.2 con NaOH.

Tabla 2. Caracterización del efluente de la empresa Holanda S.A. de C.V.

Parámetro	Medición
pH	5.07
Fosforo de ortofosfatos (mg L ⁻¹)	60.86
Nitrógeno de nitratos (mg L ⁻¹)	2.65
Nitrógeno amoniacal (mg L ⁻¹)	6.60
DQO (g O ₂ L ⁻¹)	23.40

5.3. Condiciones de operación del reactor

El fotobiorreactor tipo “flat panel”, presenta una geometría de prisma, con un volumen total de 18 L y un volumen de operación de 15 L. Sus dimensiones son 60 cm de ancho por 60 cm de largo, con un espesor de 5 cm. El suministro de luz fue continuo a 250 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, con una aireación de 0.5 vvm, suministrada mediante un tubo de acero inoxidable ubicado en el fondo del fotobiorreactor

con un diámetro externo de 6mm y perforaciones de 1mm cada 2 cm. La temperatura utilizada fue ambiente (25 ± 3 °C).

Las microalgas se cultivaron por separado en el fotobiorreactor “flat panel”. Las cinéticas se realizaron por duplicado.

Las cinéticas en medio mineral (BG-11 y BBM) se realizaron escalando el inóculo, partiendo de un matraz semilla, cultivado con burbujeo moderado a luz led blanca, de 250 mL (50 mL de inóculo, 150 mL de medio). Posteriormente se tomó una alícuota de 100 mL de inóculo y se le adicionaron 400 mL de medio. Finalmente se agregaron 250 mL de inóculo a 750 mL de medio mineral, obteniendo 1 L de inóculo, al cual se le determinaron clorofilas totales para poder escalarlo al fotobiorreactor. El fotobiorreactor fue inoculado con una concentración de clorofilas iniciales entre 1 y 1.5 mg L⁻¹. Las cinéticas tuvieron una duración de 7 días.

El escalamiento de los inóculos para el caso de las cinéticas en lactosuero siguió el procedimiento descrito anteriormente en medio mineral, con una reducción del 33% de nitrógeno, adicionando 0.5 g de NaNO₃⁻ al medio mineral en los matraces de 500 mL y botellas de 1L, con la finalidad de adaptar gradualmente las cepas a la concentración de nitrato en el lactosuero. Para el caso de las cinéticas en el reactor se utilizó una proporción de 60% de inóculo (en medio mineral) y 40% de lactosuero. Se preparó un inóculo de 9 L, ajustando la densidad celular a una concentración de entre 1 y 1.5 mg L⁻¹ después de 3 días de crecimiento; posteriormente se adiciono el lactosuero previamente filtrado y con el pH ajustado a 7 ± 0.02 . Las cinéticas duraron 5 días.

5.4 Métodos analíticos

Se tomaron alícuotas de 50 mL del fotobiorreactor para llevar a cabo todas las determinaciones analíticas. De acuerdo con la cepa que se fuese a trabajar, se aplicó el procedimiento de separación de células. Para *S. nanum* se filtraron alícuotas de 5 mL utilizando papel filtro Whatman No. 5, empleando una bomba

de vacío Geprüfte Sicherheit AS30; en el caso de *Calothrix* sp. y *C. vulgaris* alícuotas de 5 mL colocadas en tubos Falcon, fueron centrifugadas a 3600 rpm durante 10 min.

En el medio mineral, el sobrenadante fue recuperado para la determinación de nitrógeno de nitrato (N-NO_3^-) y fósforo inorgánico (P-PO_4).

En el caso del lactosuero se determinaron al inicio y final, la DQO y el pH. La cuantificación de nitrógeno (N-NH_3 y N-NO_3^-) y fósforo inorgánico (P-PO_4) se determinó a partir del sobrenadante, obtenido como se describió previamente.

La cuantificación de nitrógeno y fósforo se realizó diariamente en ambos medios. Todas las pruebas se hicieron por triplicado.

5.4.1 Demanda Química de Oxígeno (DQO)

Se determinó por la técnica de Dicromato de Potasio, de acuerdo con la NMX-AA-030/1-SCFI-2012. (Medición de La Demanda Química de Oxígeno En Aguas Naturales, Residuales y Residuales Tratadas, 2012)

5.4.2 Cuantificación de Nitratos

La cuantificación de nitratos se llevó a cabo de acuerdo con el método de resorcinol descrito por Zhang y Fischer (2006) ([Anexo 3](#)). Se realizó una dilución de la muestra de 1:50 (o 0.5:25 mL). Las absorbancias de las muestras y el blanco fueron medidas en el espectrofotómetro GENESYS 10SUV-VIS a 505 nm. El blanco fue preparado de la misma manera que la muestra, tomando 1.25 mL de agua destilada.

5.4.3 Cuantificación de Nitrógeno Amoniacal

La cuantificación de amonio se realizó de acuerdo con el método del Fenato (APHA *et al.*, 2005) (véase [Anexo 5](#)). Las muestras y blanco fueron leídos en el espectrofotómetro GENESYS 10SUV-VIS a 640 nm.

5.4.4 Cuantificación de Fósforo Inorgánico

La cuantificación de fósforo inorgánico se realizó por el método modificado de Tausky y Shorr (González *et al.*, 2013). Este método utiliza el molibdato de amonio diluido al 16% en ácido sulfúrico 10 N y sulfato ferroso (véase [Anexo 4](#)). Las muestras y el blanco fueron leídos en el espectrofotómetro GENESYS 10SUV-VIS a 660 nm.

5.5. Parámetros determinados en la biomasa algal:

La cuantificación de crecimiento se realizó diariamente por peso seco y pigmentos fotosintéticos. La determinación de la composición bioquímica de la biomasa se realizó tanto en la biomasa obtenida en BG-11 y lactosuero, previamente liofilizada. Los análisis cromatográficos fueron realizados en la Central Analítica del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV Unidad Zacatenco. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

5.5.1 Determinación de pigmentos fotosintéticos

El perfil de pigmentos se realizó siguiendo la metodología de Wellburn (1994). La biomasa de *S. nanum* fue filtrada utilizando una bomba de vacío, tomando una alícuota de 5 mL. Mientras que las cepas *Calothrix* sp. y *C. vulgaris* fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 10 min, colocando 5 mL en tubos Falcon, se desechó el sobrenadante y al paquete celular y/o filtro se le adicionaron 5 mL de metanol, posteriormente se agito durante 30 segundos. Los tubos Falcon se llevaron a calentar en una parrilla de baño seco Felisa FE-604, durante 10 min a una temperatura de 100°C. Se enfriaron a chorro de agua y en el caso de *Calothrix* sp. y *C. vulgaris* se centrifugo nuevamente durante 8 min. Se realizaron las lecturas en el espectrofotómetro GENESYS 10SUV-VIS a 666, 653 y 470 nm para determinar clorofila a, b y carotenoides respectivamente. Los cálculos se realizaron de acuerdo con las fórmulas reportadas por Wellburn (1994) Véase [Anexo 6](#).

5.5.2 Peso seco (PS)

El peso seco fue cuantificado tomando alícuotas de 15 mL, las cuales posteriormente fueron filtradas al vacío en filtros de microfibra de vidrio de 47 mm de diámetro de poro (Whatman™) y papel filtro doble (Whatman™ No. 5) para el caso de *S. nanum*. Las muestras fueron secadas en un horno (Felisa FE-291D) a 105°C durante 1 h. Posteriormente fueron puestas en el desecador por 10 min para disminuir la humedad y posteriormente fueron pesadas. Las membranas y filtros fueron previamente puestas a peso constante a 80°C por 24 h. Pasado este tiempo se determinó el PS de la biomasa por medio de la siguiente ecuación (Perales-Vela, 2008).

$$P.S. = \frac{P_f - P_i}{V}$$

Donde P_f : peso final; P_i : peso inicial y V : volumen de alícuota filtrada.

5.5.3 Liofilización

Se centrifugaron 50 mL de medio con microalgas en tubos Falcon a 3600 rpm por 5 min. Se centrifugó repetidas veces hasta completar un volumen de 10 a 20 mL en cada tubo (3 tubos por cepa y medio de cultivo). El paquete celular fue refrigerado a -20°C previo a la liofilización. Después de liofilizada la biomasa, fue almacenada a temperatura ambiente hasta su análisis.

5.5.4 Carbohidratos totales

5.5.4.1 Cuantificación colorimétrica

La cuantificación de carbohidratos totales se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Dubois *et al.* (1951). Se pesaron 5 mg de biomasa liofilizada en tubos de ensayo y se adicionaron 2 mL de agua destilada. La metodología se siguió de acuerdo con lo descrito en el [Anexo 7](#). Se midió la absorbancia a 490 nm en el espectrofotómetro GENESYS 10SUV-VIS.

5.5.4.1 Perfil de carbohidratos

Se pesaron 20 mg de biomasa previamente liofilizada. Se colocó la biomasa en un vaso de precipitado y se agregaron 10 mL de metanol/diclorometano (1:1). Posteriormente se sonicó en el equipo Fisher Scientific FS6 durante 20 min. La muestra sonicada se filtró en un acrodisco de nylon con un tamaño de poro de 0.22 μm . Los solventes se dejaron evaporando durante 24 h. Pasado este tiempo se agregaron 10 mL de una mezcla de metanol/agua + ácido fórmico al 1%. Se dejó evaporando toda la noche. De la muestra evaporada se recuperó 1 mL con agua y se colocó en un vial de 1.5 mL. Se inyectaron 50 μL de muestra por triplicado.

Los azúcares fueron determinados por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) Varian Modelo 350 con un detector de refracción. La columna utilizada fue Rezex RMH-Monosaccharide H+, LC 300 x 7.8 mm, con un flujo de 0.5 mL/min, fase móvil H₂O desionizada y duración del programa de 25 min.

5.5.5 Proteínas totales

5.5.5.1 Cuantificación colorimétrica

La cuantificación de proteínas totales se realizó de acuerdo con la metodología de Lowry *et al.* (1951). Se pesaron 5 mg o 10 mg de biomasa liofilizada en tubos de ensayo y se adicionó 1 mL de agua destilada. La metodología se siguió de acuerdo con lo descrito en el [Anexo 8](#). Se midió la absorbancia a 750 nm en el espectrofotómetro GENESYS 10SUV-VIS.

5.5.6 Lípidos Totales

5.5.6.1 Extracción

Se pesaron de 50 mg a 100 mg de biomasa previamente liofilizada. La técnica empleada fue la de Bligh y Dyer (1959). A la biomasa liofilizada se le adicionaron 2 mL de metanol, 1 mL de cloroformo y 0.8 mL de agua destilada, se agitó por 30 s en el vórtex después de cada adición. La mezcla se dejó

reposar durante 24 h en oscuridad a temperatura ambiente, para favorecer la extracción. Posteriormente se centrifugó a 3600 rpm por 5 min. El sobrenadante fue transferido a un tubo de ensayo previamente secado hasta peso contante y pesado. Al paquete celular se le adicionó 1 mL de metanol, 0.5 mL de cloroformo y 0.4 mL de agua destilada, agitándose en el vórtex durante 30 s después de cada adición. La mezcla se centrifugó nuevamente a 3500 rpm durante 5 min y el sobrenadante fue transferido al tubo que contenía la primera fracción lipídica. A los solventes conteniendo los lípidos se les adicionó 1.5 mL de cloroformo y 1.5 mL de agua destilada con el fin de tener una relación metanol: cloroformo: agua de 3:3:2.7 para favorecer la separación de la fracción lipídica (fase inferior) e hidro - alcohólica (fase superior).

El extracto lipídico fue centrifugado a 350 rpm por 5 min. Se retiró la fracción hidro – alcohólica empleando una pipeta Pasteur y la fracción lipídica se llevó a sequedad en la estufa a 60°C por 24 h hasta peso constante. El cálculo de lípidos se realizó de la siguiente manera:

$$\text{Contenido específico } \left(\frac{g_{\text{lípidos}}}{100g_{\text{Biomasa}}} \right) = \frac{\left(\frac{\text{Peso de tubo}}{\text{con lípidos}} \right) - \left(\frac{\text{Peso de tubo}}{\text{sin lípidos}} \right)}{\text{Biomasa pesada}} \times 100$$

5.5.6.2 Perfil de lípidos

Se pesaron de 50 mg a 100 mg de biomasa previamente liofilizada. Se adicionaron 20 mL de metano, 10 mL de agua destilada y 0.5 g de NaOH. La mezcla se colocó en una parrilla a una temperatura de 80-90°C durante 1 h. Posteriormente se lavó la muestra con 10 mL de hexano grado HPLC. Para la metilación, se adicionaron 30 mL de metano, 3 mL de HCl y se calentó a 80-90°C durante 1 h. Para recuperar los ácidos grasos metilados, se realizó una extracción líquido-líquido, donde la mezcla previamente calentada fue transferida a un embudo de separación de 60 mL y se le adicionaron 10 mL de hexano y 20 mL de agua destilada, se agitó el embudo para facilitar la separación de las fases. Posteriormente se recuperó la fase del solvente (hexano), la cual contiene los ésteres metílicos de ácidos grasos. La fase

recuperada se evaporó haciéndole pasar aire durante 1 hora. Pasado el tiempo se adicionaron 100 μ L de hexano.

El análisis cromatográfico del perfil de lípidos se realizó en el cromatógrafo de gases Perkin-Elmer Autosystem, con una columna ZB-WAX 30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m. La programación de temperaturas se realizó de la siguiente manera: inicio 100 °C (3 min), se incrementó la temperatura 5 °C por min hasta alcanzar 250 °C (5 min). La temperatura del inyector y el detector se mantuvieron a 230 °C y 250 °C, respectivamente. Se inyectaron 2 μ L del extracto que contenían los ácidos grasos en hexano. Se empleó nitrógeno como gas acarreador.

5.5.7 Carotenoides

Se pesaron 10 mg de biomasa previamente liofilizada. En un vaso de precipitado se adicionaron 10 mL de metano:acetonitrilo en relación 90:10 mL (fase). Posteriormente se sonicó en el sonicador Fisher Scientific FS6, dos ciclos de 10 min cada uno. Se filtró la mezcla sonicada en un acrodisco de nylon de 0.2 μ m. El filtrado se evaporó en la campana a temperatura ambiente, posteriormente se recuperó la muestra evaporada, que contenían los carotenoides, con 1 mL de fase. Se realizó una dilución 1:10 de la cual se tomó una alícuota de 50 μ L para inyectar al cromatógrafo HPLC por triplicado.

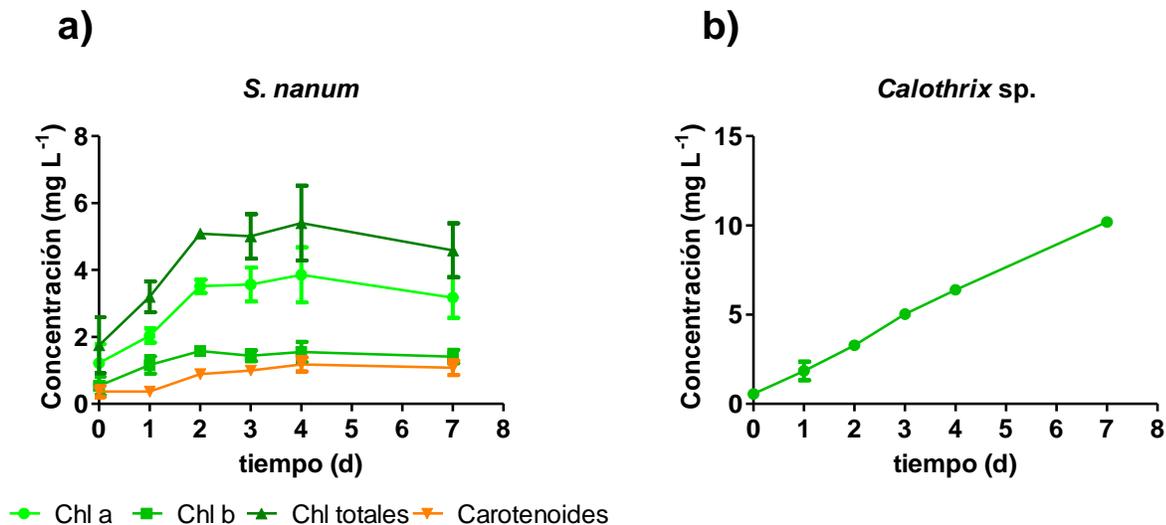
El análisis de carotenos se realizó en el cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) Varian 9002 con detector UV. La columna utilizada fue la 5u-C18-110A 150, x 4.6 mm, con un flujo de 1 mL/min, una longitud de onda de 460 nm y una duración de programa de 26 min. Los estándares utilizados fueron β -caroteno y astaxantina, pesando 0.5 mg de estándar, diluidas en 1 mL de fase (metano: acetonitrilo).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Crecimiento de las microalgas en medio mineral y lactosuero

7.1.1 Biomasa

En la Figura 9 se muestra el contenido de los pigmentos fotosintéticos de *Stigeoclonium nanum* y *Calothrix* sp. en medio mineral BG-11 y de *Chlorella vulgaris* en medio Bold; se puede observar que en el caso de *S. nanum* y *C. vulgaris* las clorofilas totales disminuyeron en el día 7 de la cinética. Lo anterior indica el inicio de la fase estacionaria, mientras que *Calothrix* sp. mantiene un crecimiento lineal a lo largo de la cinética. Las clorofilas al ser los pigmentos captadores de luz, dan información del crecimiento de la célula y de su actividad fotosintética (Pérez *et al.*, 2017). Este comportamiento es considerado normal, ya que las microalgas se encuentran bajo condiciones óptimas de crecimiento.



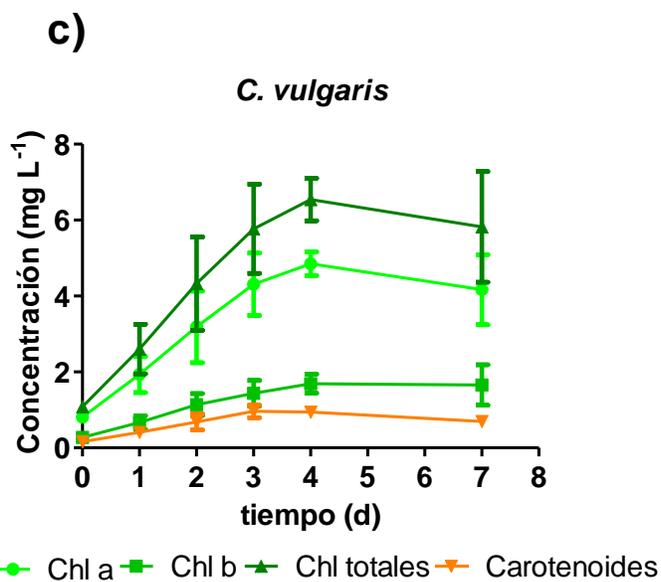
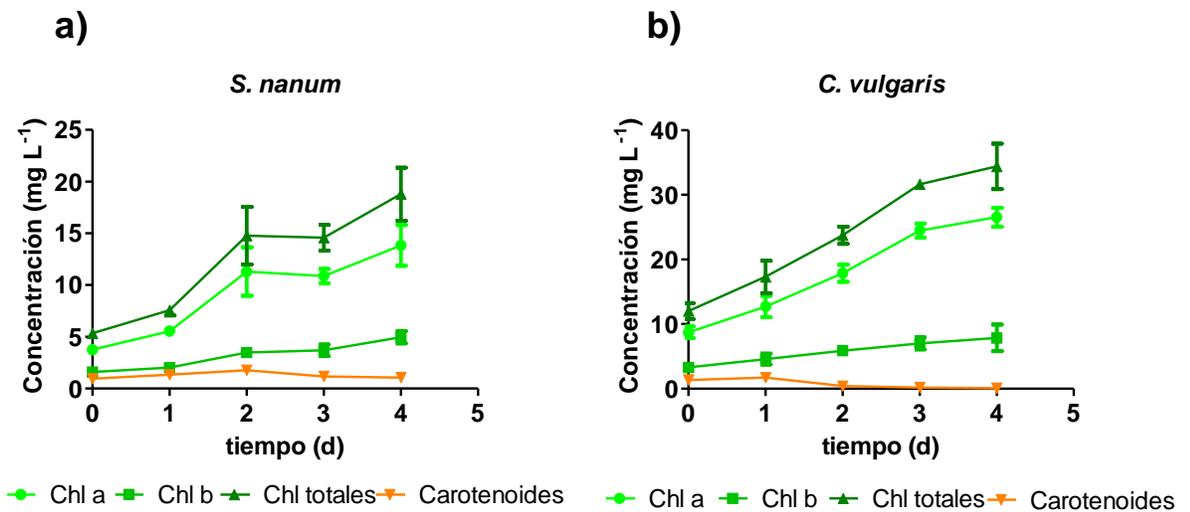


Figura 9. Pigmentos fotosintéticos en medio mineral a) y b) BG-11 y c) BBM. $\bar{x} \pm \text{SEM}^1$ n=2.

Las concentraciones de clorofila total en las cepas cultivadas en lactosuero fueron mayores, alcanzando valores de $34.40 \pm 3.52 \text{ mg L}^{-1}$ en *C. vulgaris*, $18 \pm 2.56 \text{ mg L}^{-1}$ en *S. nanum* (Fig. 10a y 10c) y $11 \pm 2.10 \text{ mg L}^{-1}$ en *Calothrix* sp. (Fig. 10b) al final de la cinética. Lo anterior concuerda con lo reportado por Brar *et al.* (2019), quienes obtuvieron concentraciones elevadas de clorofila total cuando las cepas *Chlorella pyrenoidosa*, *Anabaena ambigua* y *Scenedesmus abundans* fueron cultivadas en agua residual láctea diluida en una porción 3:1, alcanzando valores de $97.83 \pm 6.72 \text{ mg L}^{-1}$, $85.65 \pm 4.24 \text{ mg L}^{-1}$ y $70.09 \pm 0.88 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, después de 12 y 7 días. De igual manera, de Almeida-Pires *et al.* (2021) observaron un aumento en las clorofilas totales de *Chlorella vulgaris* cultivada en lactosuero previamente coagulado, comparado con la concentración de clorofilas en medio BBM. de Almeida-Pires *et al.* (2021) mencionan que este aumento en la concentración de clorofilas totales pudo deberse a los nutrientes presentes en el lactosuero. Estos últimos resultados concuerdan con lo obtenido en el presente trabajo, donde la concentración de clorofila fue mayor en lactosuero, comparado con el medio mineral.

¹ SEM: standar error of the mean (error estándar de la media)

Se ha reportado que el aparato fotosintético de *Chlorella* sp. puede presentar una disrupción por la presencia de carbono orgánico, causando inhibición en la fijación de CO₂ y modificando la ruta de biosíntesis de clorofilas, sin embargo, en el presente trabajo no se observó esa disrupción en la biosíntesis cuando fue cultivada en lactosuero. Esto puede deberse a la simbiosis existente entre la microalga y las bacterias presentes en el efluente lácteo, las cuales disminuyeron la concentración del carbono orgánico presente, generando CO₂ por efecto de la respiración aumentando la disponibilidad de carbono inorgánico en el medio.



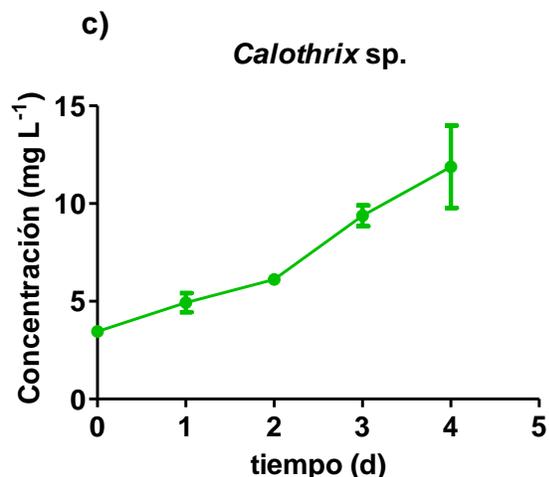


Figura 10. Pigmentos fotosintéticos en lactosuero. $\bar{x} \pm SEM^2$ $n=2$.

En la Figura 11 se presenta el peso seco en ambos medios. El crecimiento en lactosuero se realizó de manera indirecta, debido a que el lactosuero contenía sales y grasas, lo cual dificultaba la cuantificación gravimétrica de la biomasa de las cepas en este medio de cultivo. La cuantificación se hizo relacionando el contenido de clorofilas en lactosuero y el peso seco obtenido en medio mineral de cada cepa. Los cálculos realizados pueden verse en el [Anexo 10](#).

Las cepas *Calothrix* sp. (Fig. 11c) y *C. vulgaris* (Fig. 11b) presentaron concentraciones de biomasa similares en ambos medios, alcanzando valores de 0.23 ± 0.007 g L⁻¹ y 0.24 ± 0.07 g L⁻¹ en medio mineral en el día 7 y valores de 0.24 ± 0.05 g L⁻¹ y 0.24 ± 0.03 g L⁻¹ en lactosuero en el día 5, respectivamente. Los valores obtenidos en lactosuero del presente trabajo para *C. vulgaris* fueron bajos comparado con los valores reportados por Lu *et al.* (2016) quienes obtuvieron concentraciones de 0.95 ± 0.13 g L⁻¹ en lactosuero, diluido 5 veces con BG-11, en el día 5 de la cinética. Pereira *et al.* (2019) reportaron una concentración de biomasa en *Spirulina platensis* de 2.18 g L⁻¹ cultivada con 10% de lactosuero en medio Zaurrouk. Lo anterior sugiere que el factor de dilución del lactosuero juega un papel importante en el crecimiento de la microalga, ya que, a mayor dilución, la concentración de algunos nutrientes

² SEM: standar error of the mean (error estándar de la media)

puede disminuir convirtiéndolos en un factor limitante y un cuello de botella para el crecimiento de las microalgas (Lu *et al.*, 2016).

Existen estudios que sugieren la adición de sales minerales para crear un efecto sinérgico con los nutrientes presentes en el lactosuero y así aumentar el crecimiento de las microalgas (Gramegna *et al.*, 2020), de igual manera, se ha sugerido mezclar agua residual doméstica con agua residual láctea para aumentar las concentraciones de nutrientes limitantes, eliminando el cuello de botella (Lu *et al.*, 2016).

Por otro lado, *Stigeoclonium nanum* (Fig. 11a) fue la cepa que tuvo una mayor concentración celular tanto en medio mineral como en lactosuero, presentando valores de $0.51 \pm 0.11 \text{ g L}^{-1}$ al día 5 con lactosuero y $0.62 \pm 0.20 \text{ g L}^{-1}$ al día 7 de la cinética en BG-11.

Gramegna *et al.* (2020), reportaron el crecimiento de *Chlorella reinhardtii* y *Auxenochlorella protothecoides* en lactosuero diluido al 13%, obtenido de la producción de queso mozzarella y queso panela. Las algas verdes alcanzaron concentraciones de 0.6 g L^{-1} y 0.5 g L^{-1} , respectivamente, después de 10 días de crecimiento. Los resultados anteriores concuerdan con los obtenidos en el caso de *S. nanum*, la cual alcanzó concentraciones similares a las reportadas en ambas especies de algas verdes. Además, se ha reportado que la simbiosis microalga-bacteria aumenta la producción de biomasa cuando la concentración del lactosuero aumenta teniendo una relación lineal.

La aplicación de microalgas aisladas del agua residual láctea puede reducir el tiempo de adaptación, acelerando la fase exponencial, comparado con las microalgas comerciales, además de que este mutualismo ayuda de forma positiva cuando las concentraciones de materia orgánica e inorgánica en el medio son altas (Tsolcha *et al.*, 2016). *S. nanum* fue la única microalga del presente estudio, que fue aislada de un efluente de agua residual doméstica, lo cual pudo contribuir a su rápida adaptación al lactosuero.

La disminución en la concentración de biomasa se ve reflejado en los valores de las constantes cinéticas presentadas en la Tabla 3, donde *C. vulgaris* y *Calothrix* sp. presentaron tasas de crecimiento menores en el lactosuero comparado con el medio mineral. Estos datos concuerdan con lo reportado por Brar *et al.* (2019), quienes obtuvieron una μ de 0.379 d^{-1} en el caso de *Anabaena ambigua* y 0.311 d^{-1} para *Scenedesmus abundans* en lactosuero diluido 3:1. De igual manera Melo *et al.* (2018) obtuvieron una tasa de crecimiento de 0.29 d^{-1} para *C. vulgaris* cultivada con medio mineral enriquecido con lactosuero. Adicionalmente los mismos autores sugieren que a pesar de que el lactosuero presenta una composición adecuada para el crecimiento de las microalgas, no es suficiente para promover una alta concentración celular a comparación de otros efluentes con altas concentraciones de proteínas y azúcares.

Como se mencionó anteriormente, la tasa de crecimiento de *Calothrix* sp. disminuyó cuando fue cultivada en el lactosuero. Olvera-Ramírez *et al.* (2000) realizaron un estudio del crecimiento de *Calothrix* sp. a diferentes concentraciones de nitrógeno (NaNO_3) obteniendo una tasa de crecimiento específico de 0.96 d^{-1} a una concentración de 1.5 g L^{-1} de nitrato, mientras que a una reducción de 0.75 g L^{-1} en el nitrógeno, la μ disminuyó a 0.72 d^{-1} . La concentración de nitrógeno en el lactosuero fue menor comparada con la concentración en BG-11, observándose una disminución en las constantes cinéticas entre ambos medios (0.40 d^{-1} en BG-11 y 0.31 d^{-1} en lactosuero). Lo anterior concuerda con Olvera-Ramírez *et al.* (2000) donde la disminución en la concentración de nitrato provoca una disminución en la tasa de crecimiento. Sin embargo, en el mismo estudio, se realizó un monitoreo del crecimiento de la microalga sin fuente de nitrógeno, el cual no varió frente a los medios con nitrógeno, comprobando su capacidad de fijar nitrógeno del ambiente y no interferir con su crecimiento, algo que no se observó en el presente trabajo, posiblemente debido a la presencia de otros nutrientes o las bacterias aerobias que interferían con la actividad de la enzima nitrogenasa.

Por su parte, *S. nanum* mantuvo una tasa de crecimiento igual en ambos medios. Esto puede deberse a la naturaleza nativa de la cepa, la cual fue aislada de agua residual, teniendo una buena adaptación en el lactosuero. Esto concuerda con Choi *et al.* (2018) quienes aislaron una nueva especie de *Chlorella* sp, de un agua residual láctea y observaron una tasa de crecimiento superior (0.243 d^{-1}) y una concentración de biomasa mayor (0.82 g L^{-1}) comparada con *Chlorella vulgaris*.

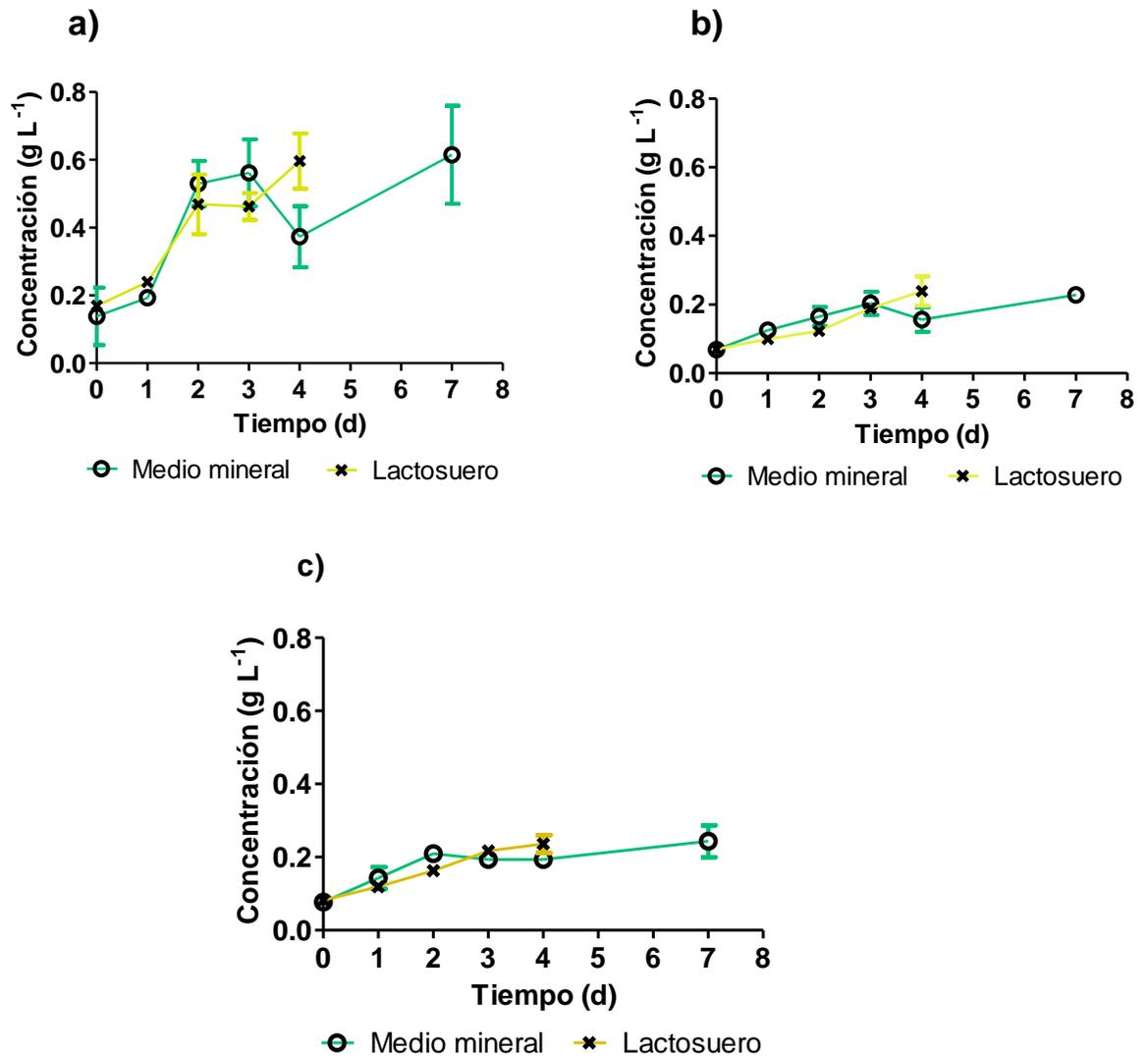


Figura 11. Peso seco en las microalgas a) *Stigeoclonium nanum*, b) *Calothrix* sp. y c) *Chlorella vulgaris*. $\bar{x} \pm \text{SEM}^3$ n=2.

³ SEM: standar error of the mean (error estándar de la media)

Tabla 3. Parámetros cinéticos obtenidos en medio mineral y lactosuero.

Parámetro	Medio Mineral			Lactosuero		
	<i>C. vulgaris</i>	<i>S. nanum</i>	<i>Calothrix</i> x sp.	<i>C. vulgaris.</i>	<i>S. nanum</i>	<i>Calothrix</i> x sp.
μ (d ⁻¹)	0.53	0.52	0.40	0.33	0.52	0.31
V _{cons} P- PO ₄ (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	2.02	1.30	2.42	19.19	6.62	7.85
V _{cons} N- NO ₃ (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	2.80	12.13	43.72	2.65	18.99	14.31
V _{cons} N- NH ₃ (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	N. A.	N. A.	N. A.	1.05	0.79	2.32

7.1.2 Nitrógeno y Fósforo

El consumo de nitrógeno de nitrato en medio mineral se presenta en la Figura 12, en el cual *Calothrix* sp. (Fig. 12a) obtuvo un consumo acelerado en el día 2 de la cinética, manteniendo una disminución hasta el día 4 de la cinética, donde posteriormente aumentó. Por su parte, *S. nanum* presentó un decremento de nitrógeno hasta el día 3 (Fig. 12a), teniendo un consumo paulatino hasta el final de la cinética; un comportamiento similar de consumo se presenta en *C. vulgaris* (Fig. 12b).

De acuerdo con las constantes cinéticas (cálculos véase en [Anexo 11](#)) de consumo mostradas en la Tabla 3, *Calothrix* sp. fue la microalga que presentó una velocidad de consumo de N-NO₃ más rápida (43.72 mg L⁻¹ d⁻¹), seguido de *S. nanum* (12.13 mg L⁻¹ d⁻¹). La velocidad de consumo de nitrato en *S. nanum* fue mayor comparado con la reportada por Martínez-Roldán *et al.* (2019) de 5.33 mg L⁻¹ d⁻¹ después de 12 días de cultivo en medio mineral. Finalmente *C. vulgaris* presentó la velocidad de consumo más baja (2.80 mg L⁻¹ d⁻¹).

Las microalgas son capaces de utilizar diferentes formas de nitrógeno tales como amonio, nitrato, nitrito, urea, etc., siendo el nitrógeno en forma de amonio (N-NH_3) una de las formas más fáciles de asimilar, ya que no es necesario realizar modificaciones enzimáticas para su transporte dentro de la célula. Caso contrario al nitrato (NO_3), la segunda forma de nitrógeno asimilada por las microalgas, el cual es reducido por la nitrato reductasa a nitrito, posteriormente es transportado al cloroplasto, donde es reducido por acción de la nitrito reductasa a amonio, siendo finalmente incorporado al ciclo de síntesis de glutamato (Franco-Martínez *et al.*, 2017; Pandey *et al.*, 2019).

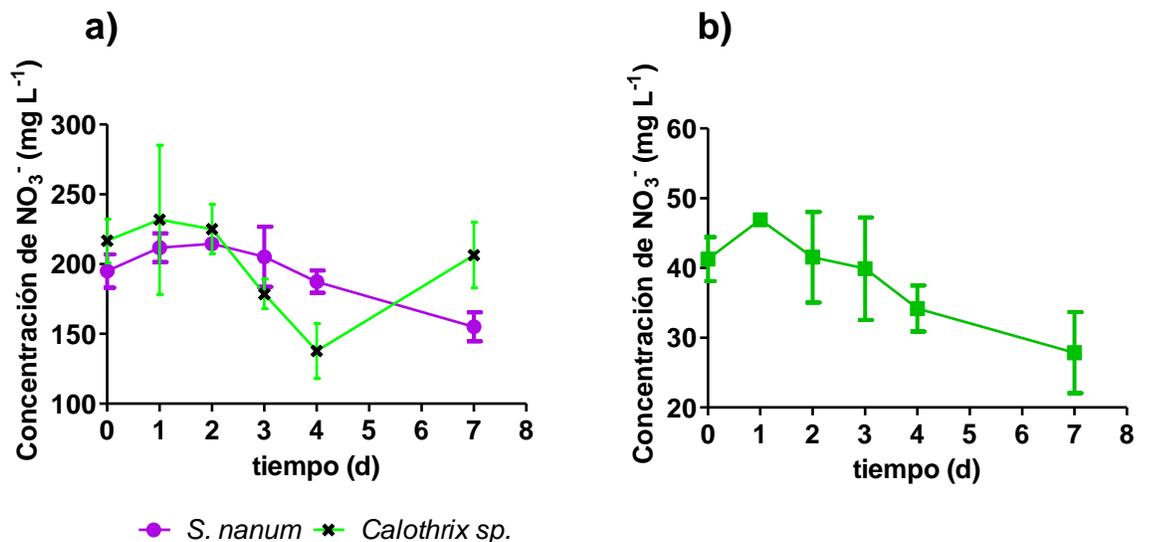


Figura 12. Cuantificación de nitrógeno de nitrato en a) *Stigeoclonium nanum* y *Calothrix sp.* en medio mineral BG-11 y en b) *Chlorella vulgaris* en medio BBM. $\bar{x} \pm \text{SEM}^4 n=2$.

La tasa de consumo de nitrógeno en las microalgas es alta, debido a que es un constituyente importante de la biomasa, representando en ciertas condiciones el 10% en peso seco. Esto se encuentra en función de la disponibilidad del sustrato, la especie y las condiciones de cultivo (Franco-Martínez *et al.*, 2017). En la Figura 13 se observa el consumo de nitrato en lactosuero de las tres

⁴ SEM: standar error of the mean (error estándar de la media)

cepas, siendo *Stigeoclonium nanum* la microalga que lo hizo más rápidamente dentro de las primeras 48 horas, obteniendo un consumo de $18.99 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Tabla 3), seguida de *Calothrix* sp. ($14.31 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) y finalmente *C. vulgaris* ($2.65 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) siendo esta última cepa la que tuvo la tasa de consumo más baja. De acuerdo con la disponibilidad de sustrato, la concentración de nitrato en el lactosuero de las cepas *S. nanum* y *Calothrix* sp. (Fig. 13a) fueron más altas, comparado con la concentración en el lactosuero de la cepa *Chlorella* sp. (Fig. 13b), explicando el consumo acelerado en el alga verde *S. nanum* y en la cianobacteria *Calothrix* sp.

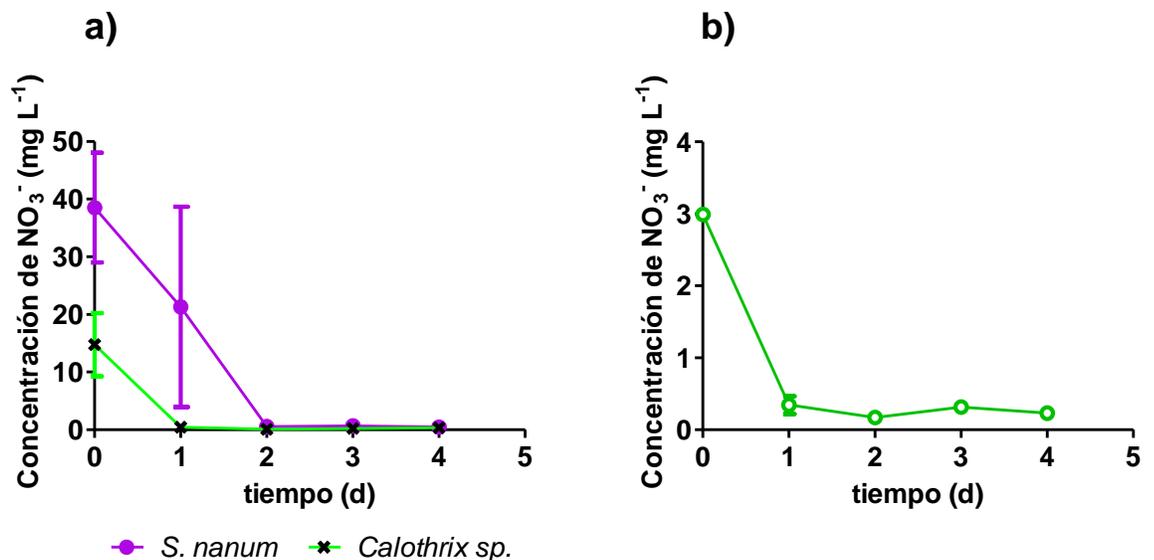


Figura 13. Cuantificación de nitrógeno de nitrato en a) *Stigeoclonium nanum* y *Calothrix* sp. y b) *Chlorella vulgaris* en lactosuero. $\bar{x} \pm \text{SEM}^5$ n=2.

La concentración de fosfato fue mayor en lactosuero comparado con el medio BG-11, mientras que en medio BBM, la concentración fue similar a la del lactosuero. *Chlorella vulgaris* tuvo un consumo diferente en ambos medios, presentando una disminución en la concentración a partir del tiempo 3 en medio BBM (Fig. 14b), mientras que en lactosuero (Fig. 15b) la pendiente de consumo

⁵ SEM: standar error of the mean (error estándar de la media)

fue constante hasta el tiempo 3 de la cinética. De acuerdo con las cinéticas de consumo (Tabla 3), *C. vulgaris* fue la cepa que consumió más rápidamente el fosfato ($19.19 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) en lactosuero comparado con su consumo en medio mineral ($2.02 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Mientras que *Calothrix* sp. presentó un comportamiento similar en ambos medios (Fig. 14 y 15a), consumiendo el fosfato dentro de las primeras 24 horas de la cinética (Fig. 14 y 15a) y presentando velocidades de consumo de $2.42 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ en medio mineral y $7.85 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ en lactosuero. Finalmente *S. nanum* fue la cepa que consumió más lentamente el fosfato tanto en medio mineral ($1.30 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) como en lactosuero ($6.62 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$).

Se ha reportado que las microalgas son capaces de consumir altas cantidades de fósforo. Un estudio realizado por Franco-Martínez *et al.* (2017) menciona un consumo alto del fósforo en un experimento de tolerancia a altas concentraciones de amonio en *Chlorella vulgaris*. Sin embargo, a pesar de formar parte de la estructura de la biomasa, no encontró una relación con el consumo de fósforo y el crecimiento de la microalga. De igual manera, Salati *et al.* (2017), quien bajo condiciones mixotróficas cultivó *Chlorella vulgaris* utilizando BG-11 enriquecido con lactosuero, como fuente de carbono (2.2 g C L^{-1}); observó que la presencia de una concentración alta de fósforo en el lactosuero condujo a un alto consumo de este nutriente, presentando una producción más alta de biomasa. En el presente trabajo, el alto consumo de fosfato por parte de *C. vulgaris* no mostró un aumento en la biomasa, lo cual concuerda con Franco-Martínez *et al.* (2017), y de igual manera sugiere que el alga verde no cambió a un metabolismo mixotrófico durante la cinética. Por su parte, *S. nanum* y *Calothrix* sp. presentaron un consumo alto de nitrato, y bajo de fósforo, siendo *S. nanum* la cepa que presentó una mayor concentración de biomasa en lactosuero, lo cual puede sugerir que la remoción de nitrato fue por bioacumulación, donde la microalga asimiló y aumentó la concentración de nitrato en la biomasa, promoviendo el crecimiento y remoción de este nutriente del lactosuero (de Almeida-Pires *et al.*, 2021).

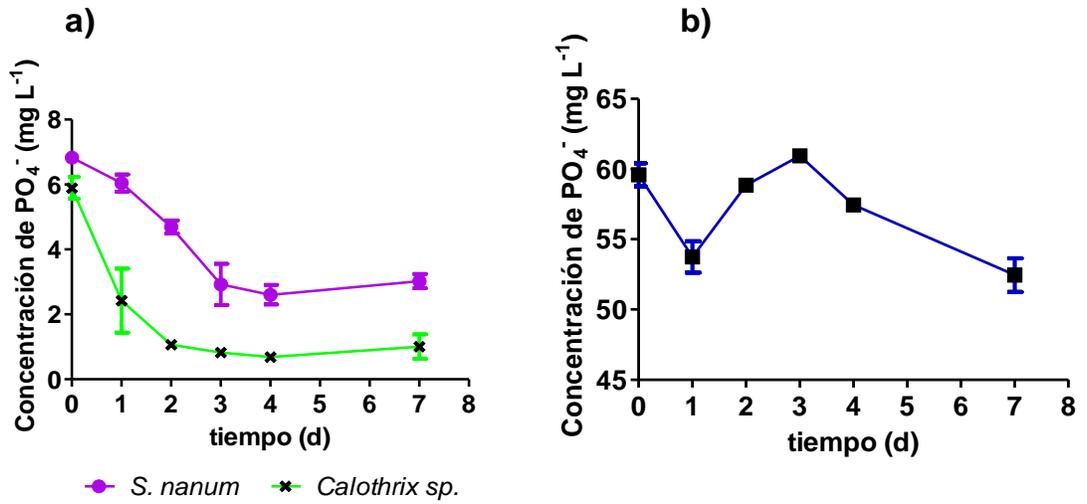


Figura 14. Cuantificación de fósforo de fosfatos en a) *Stigeoclonium nanum* y *Calothrix sp.* en medio mineral BG-11 y en b) *Chlorella vulgaris* en medio BBM. $\bar{x} \pm SEM^6$ $n=2$.

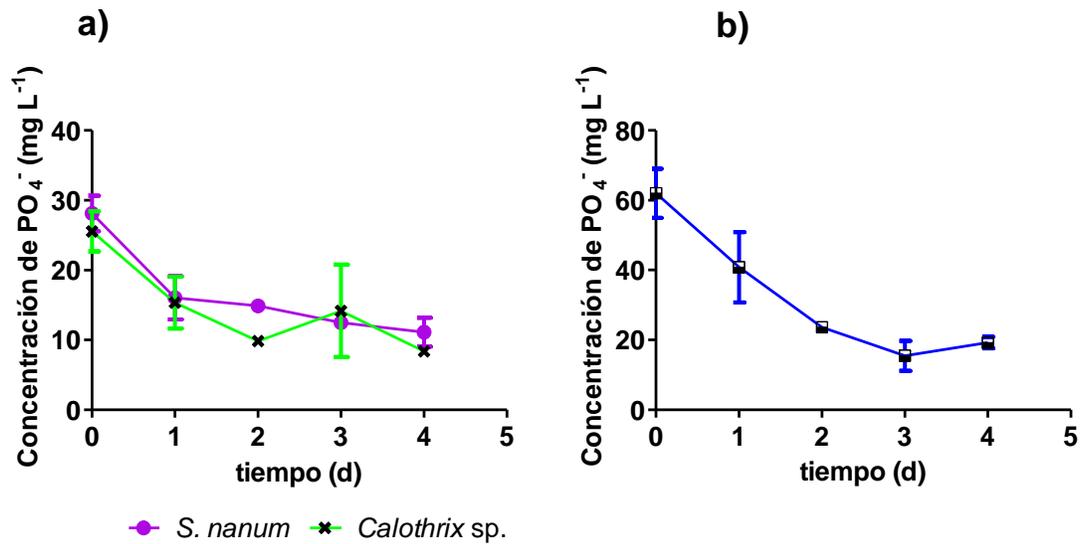


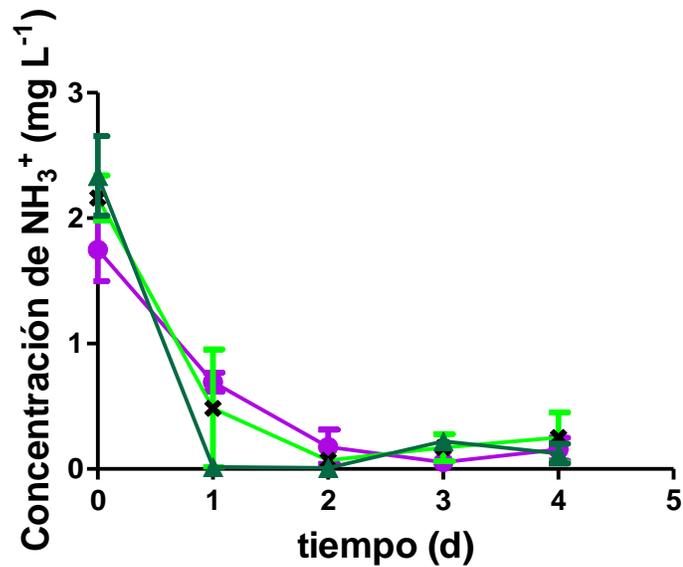
Figura 15. Cuantificación de fósforo de fosfatos en a) *Stigeoclonium nanum*, *Calothrix sp.* y b) *Chlorella vulgaris* en lactosuero. $\bar{x} \pm SEM^7$ $n=2$.

⁶ SEM: standar error of the mean (error estándar de la media)

⁷ SEM: standar error of the mean (error estándar de la media)

El nitrógeno amoniacal solo se encontró presente en el lactosuero y como se ha mencionado anteriormente, las microalgas son capaces de asimilar diferentes formas del nitrógeno, entre ellas se encuentra el amonio NH_3 (Hernández-Pérez y Labbé, 2014). La concentración de nitrógeno amoniacal en el lactosuero fue baja, lo cual explica el rápido consumo de este nutriente, siendo *Calothrix* sp. la cepa, que dentro de las primeras 24 h, presentó un consumo acelerado (Fig. 16). Por su parte, *S. nanum* y *C. vulgaris* tuvieron una pendiente de consumo menos pronunciada, presentado constantes de velocidad más bajas, en comparación con *Calothrix* sp. (Tabla 3).

Lu *et al.* (2016), reporta un consumo acelerado del nitrógeno amoniacal al segundo día utilizando *Chlorella vulgaris* para el tratamiento de un efluente lácteo. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos, ya que al agregarse el lactosuero en medio mineral (inóculo), existe una dilución del amonio presente en el lactosuero, lo cual puede limitar e incluso disminuir el crecimiento de las microalgas (Lu *et al.*, 2016). Esto concuerda con la concentración de biomasa de *C. vulgaris* y *Calothrix* sp. a lo largo de la cinética con lactosuero (Fig. 11c). Sin embargo, a pesar de que el nitrógeno amoniacal puede ser un limitante en el crecimiento, las concentraciones celulares obtenidas fueron mayores a los 5 días de la cinética en lactosuero en el presente trabajo comparado con los reportados por Lu *et al.* (2016) quienes enriquecieron el lactosuero con agua residual proveniente de una planta de procesamiento de carne con una alta concentración de nitrógeno amoniacal.



● *S. nanum* * *C. vulgaris* ▲ *Calothrix* sp.

Figura 16. Cuantificación de nitrógeno amoniacal en lactosuero. $\bar{x} \pm SEM^8$ $n=2$

7.2 Tratamiento del efluente

Parte de los objetivos de este trabajo, fue evaluar la capacidad de las microalgas de tratar el lactosuero. Para ello, se realizó la determinación de nitrato, nitrógeno amoniacal y fosforo, a lo largo de la cinética y la cuantificación de DQO y pH al inicio y al final de la cinética.

Debido a que las microalgas no son capaces de asimilar la lactosa como tal, existen estudios donde el uso de la simbiosis entre bacterias y microalgas puede resultar benéfica, siendo las bacterias las encargadas de disminuir la carga orgánica en el efluente y las microalgas el nitrógeno y el fósforo presente (Tsolcha *et al.*, 2016; Gramegna *et al.*, 2020; Marazzi *et al.*, 2020). De acuerdo con el porcentaje de remoción de DQO (Tabla 4) *Stigeoclonium nanum* fue la cepa que presentó una mayor reducción de DQO en el efluente, alcanzando una concentración final de 0.38 ± 0.03 g L⁻¹, seguido de *Chlorella vulgaris* con un porcentaje de remoción del 94% y finalmente *Calothrix* sp. con un 93% de

⁸ SEM: standar error of the mean (error estándar de la media)

remoción. La DQO es utilizada para medir la cantidad de compuestos orgánicos oxidables en el agua a través de la cantidad de oxígeno que necesita consumir para su oxidación.

Por su parte, la reducción de fósforo *C. vulgaris* fue la que presentó el mayor porcentaje de remoción (68%), seguido de *Calothrix* sp. con un 67% y finalmente *S. nanum* con 60%. Mientras que los porcentajes de remoción de nitrato fueron de 98%, 97% y 92% para *S. nanum*, *C. vulgaris* y *Calothrix* sp., respectivamente, y de nitrógeno amoniacal 94%, 91% y 88% para *Calothrix* sp., *S. nanum* y *C. vulgaris*, respectivamente.

Los porcentajes de remoción presentados son parecidos con los reportados por Tsolcha *et al.* (2016) obteniendo un 92% de remoción de DQO, 97% de TN y 99.7 de PO₄ de cepas pertenecientes al género *Choricystis* cultivadas en lactosuero proveniente del procesamiento de queso cottage, diluido con agua potable (35:65); y con Marazzi *et al.* (2020) quienes obtuvieron porcentajes de remoción de DQO del 88%, fósforo (73%), amoniacal (99%) y nitrato (93%) en un sistema consorcio bacteria-microalga (*Scenedesmus acuminatus*) cultivado en lactosuero sin esterilizar. Por su parte, Gramegna *et al.* (2020) obtuvo remociones de 65% de DQO, 77% de PO₄ y 43% de TN utilizando *Auxenochlorella protothecoides* cultivada en lactosuero sometido a un proceso de calentamiento a 85°C por 20 min para reducir la carga microbiana en el efluente, las cuales fueron menores a las obtenidas en el presente trabajo. El trabajo de los autores anteriores demostró que la reducción en la carga microbiana disminuye los porcentajes de remoción de los nutrientes presentes en el lactosuero, demostrando que la presencia de las bacterias nativas en el efluente, aunque sea en mínima concentración, promueven una mejor remoción de los nutrientes orgánicos en el efluente.

De igual forma Tsolcha *et al.* (2016) y Marazzi *et al.* (2020) mencionan que la presencia de bacterias en el efluente aumenta la remoción de nutrientes, comparado con las microalgas cultivadas en condiciones axénicas. Las microalgas cultivadas bajo condiciones no axénicas presentan un metabolismo

fotoheterotrófico aerobio, impartido tanto por las especies bacterianas presentes como por las microalgas cultivadas en el efluente.

A comparación del cultivo no axénico, las microalgas cultivadas bajo condiciones axénicas presentan un metabolismo mixotrófico, lo cual les permite asimilar la materia orgánica presente. Este metabolismo ha sido reportado principalmente *Chlorella vulgaris* (Girard *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2017; D'Imporzano *et al.*, 2018; Melo *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019). De igual manera podría suponerse un comportamiento mixotrófico parcial, debido a la presencia de las bacterias.

El pH es uno de los factores importantes en el cultivo de las microalgas, ya que éste puede afectar la distribución de las especies de CO₂ y la disponibilidad de carbono, cambiando la disponibilidad de los macronutrientes y micronutrientes, afectando el metabolismo de la microalga (Melo *et al.*, 2018). El pH inicial del lactosuero fue ajustado a 7 ± 0.2 para no afectar el crecimiento de las microalgas, al final de la cinética el pH fue de 8 en las tres cepas.

Tabla 4. Porcentajes de remoción y consumo de N, P y DQO en lactosuero. Valores de error representados ± DS n=2.

Parámetro	<i>Chlorella vulgaris</i>		<i>Stigeoclonium nanum</i>		<i>Calothrix</i> sp.	
	[inicial]	[final]	[inicial]	[final]	[inicial]	[final]
pH	7.06±0.0 6	8.72±0.4 7	7.17±0.01	8.49±0.2 4	7.09±0.1 1	8.99±0.0 9
DQO (g L ⁻¹)	23.40±0. 60	1.22±0.1 9	23.40±0.6 0	0.38±0.0 3	23.40±0. 60	1.45±1.2 6
PO ₄ (mg L ⁻¹)	62.00±9. 98	19.26±2. 33	28.11±3.5 7	11.13±2. 93	25.56±4. 05	8.37±0.7 4
NO ₃ (mg L ⁻¹)	2.99±0.0 2	0.23±0.0 4	38.54±13. 47	0.49±0.2 6	14.76±7. 74	0.33±0.1 8
NH ₃ (mg L ⁻¹)	2.16±0.2 5	0.25±0.2 8	1.75±0.35	0.16±0.1 3	2.34±0.4 5	0.12±0.1 1

% rem DQO	94.80	99.20	93.79
% rem PO ₄	68.94	60.42	67.26
% rem NO ₃	92.22	98.73	97.74
% rem NH ₃	88.35	91.01	94.72

7.3 Análisis bioquímico de la biomasa

La biomasa de las microalgas contiene compuestos orgánicos primarios esenciales como lo son los carbohidratos, proteínas y lípidos. La cantidad de dichos compuestos está en función de la especie de microalga y de las condiciones de crecimiento. Entre algunos de los compuestos primarios de interés se encuentran compuestos de valor agregado tales como aminoácidos esenciales, ácidos grasos poliinsaturados, ficobiliproteínas, carotenoides, vitaminas, esteroides y antioxidantes. La composición de biomasa y proporción de algunos compuestos puede ser manipulada con ingeniería genética o variando factores en el cultivo como nutrientes, temperatura, iluminación, etc. (Ravindran y Rajauria, 2021).

El análisis de la composición bioquímica de la biomasa microalgal ha cobrado relevancia debido a las aplicaciones que dichas fracciones tienen en las industrias alimentaria, nutricional, farmacológica (compuestos bioactivos) y en la producción de biocombustibles.

7.3.1 Carbohidratos

La producción de carbohidratos sucede durante la fijación de carbono y la fotosíntesis. El contenido dentro de las microalgas varía de acuerdo con cada especie. Se ha reportado que las microalgas pueden acumular carbohidratos, aproximadamente del 10-17% (Ramos *et al.*, 2016) hasta del 15 a 75% en peso seco (Ravindran y Rajauria, 2021).

El contenido de carbohidratos en las microalgas y cianobacteria fueron menores en el lactosuero (Fig. 17), contrario a lo esperado de acuerdo con el reportado

por Wang *et al.* (2019) y Pereira *et al.* (2019) quienes obtuvieron un contenido de carbohidratos mayores cuando se cultivaron las cianobacterias *Tibonema minus* ($26.56 \pm 0.85\%$) y *S. platensis* ($40.65 \pm 3.66\%$) en lactosuero de tofu y en lactosuero al 10% diluido con medio Zarrouk, respectivamente, comparado con su contenido en un medio definido (control). Por su parte, Melo *et al.* (2018) obtuvieron un 39.34% de carbohidratos en *Chlorella vulgaris* cultivada en lactosuero, de acuerdo con estas autoras, la concentración de azúcares presentes en el lactosuero, ayudan a incrementar su contenido. En los tres trabajos anteriores, el tipo de metabolismo alcanzado por las microalgas fue mixotrófico, a lo cual se atribuye el aumento de contenido de carbohidratos en la biomasa, debido a que la lactosa presente en el residuo fue asimilado e incorporado en la composición de biomasa. Por otro lado, en el presente estudio, el metabolismo no fue totalmente mixotrófico, lo cual explica el contenido bajo de carbohidratos cuando las microalgas fueron cultivadas en el lactosuero.

Por su parte, Kallarakkal *et al.* (2021) mencionan que al aplicar una dilución en el lactosuero de 50:50 (BG-11:lactosuero) el contenido de carbohidratos en la biomasa de *Osillatoria* sp. disminuyó, comparado a cuando se aplicó una dilución del 25% de lactosuero en el medio BG-11, donde el contenido de carbohidratos aumento. Este comportamiento concuerda con el observado en la Figura 17.

Una alta concentración de lactosuero puede inhibir el crecimiento de la microalga, reduciendo su productividad de biomasa y al mismo tiempo, dificultar su adaptación al lactosuero, causando que el metabolismo no logre cambiar frente al estímulo estresante (Kallarakkal *et al.* 2021). Lo anterior explica la baja concentración de carbohidratos en la biomasa de las microalgas y cianobacteria cuando fueron cultivadas en lactosuero.

De igual manera esta disminución en la cantidad de carbohidratos puede estar relacionado con el contenido de nitrato en el lactosuero, ya que las microalgas requieren reducirlo a nitrito y posteriormente convertirlo a amonio para facilitar

su asimilación, lo cual demanda un gasto energético, resultando en un bajo contenido de carbohidratos. Por otro lado, los parámetros operativos y la fase de crecimiento también influyen en la acumulación de macromoléculas. Se ha reportado que la localización de carbono en las algas verdes del género *Chlorella* sp. cultivadas en régimen por lotes, se dirige a la síntesis de proteínas durante la fase lag, mientras que, durante la fase estacionaria, es dirigida a carbohidratos (González-Fernández y Ballesteros, 2012).

Lo anteriormente mencionado concuerda con lo observado en el contenido de carbohidratos y proteínas en ambos medios. Las cepas cultivadas en medio mineral alcanzaron la fase estacionaria al 7mo día de cultivo, donde el contenido de carbohidratos totales fue mayor, mientras que las cepas cultivadas en lactosuero alcanzaron la fase exponencial al 5to día, acortando la duración de la cinética comparada con la duración en medio mineral, obteniendo un contenido menor de carbohidratos y un aumento en el contenido de proteínas.

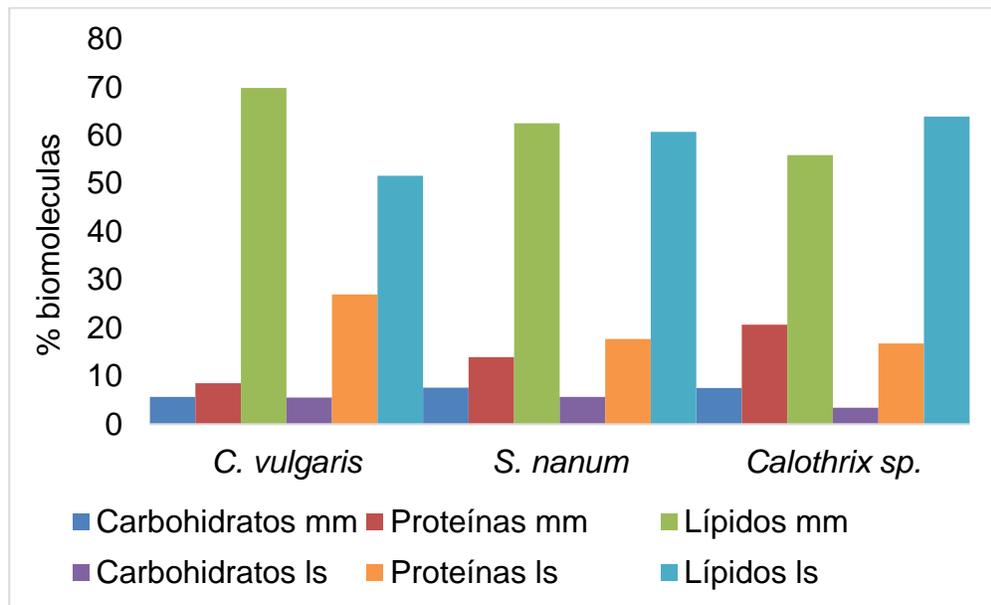


Figura 17. Composición bioquímica de la biomasa cultivada en medio mineral (mm) y en lactosuero (ls).

De acuerdo con el perfil de azúcares, el cual se muestra en la Figura 18, el ácido glucurónico fue el monosacárido más abundante en las tres cepas

cultivadas en ambos medios de cultivo. La glucosa fue el azúcar menos abundante y estuvo presente en ambas algas verdes cultivadas en medio mineral, mientras que en lactosuero solo se logró cuantificar en *S. nanum* y *Calothrix* sp. En el caso de la xilosa, solo se detectó en *C. vulgaris* (medio mineral) y en *Calothrix* sp. (lactosuero). Esto concuerda con lo reportado en *Tetraselmis* sp., obteniendo un contenido alto de ácido glucurónico (46.53%) y un contenido bajo de xilosa (4.54%), contrario a lo reportado en la literatura, donde la glucosa es el monosacárido que se encuentra en mayor proporción (Grubišić *et al.*, 2022); tanto la glucosa y la xilosa fueron los monosacáridos que se encontraron en una baja proporción en el perfil obtenido en las cepas estudiadas.

Los carbohidratos en las microalgas puede dividirse en tres grupos: para proveer soporte estructural (carbohidratos celulares), ser utilizados como fuente de energía para funciones metabólicas y de reserva (carbohidratos intracelulares/almacenamiento), y proveer protección frente a condiciones de estrés ambiental como cambios en temperatura, concentración de nitrógeno o irradiación lumínica, denominados exopolisacáridos (Kumar *et al.*, 2018; Ravindran y Rajauria, 2021; Grubišić *et al.*, 2022).

Al ser el ácido glucurónico uno de los monosacáridos más abundantes y pertenecer a los azúcares que componen los exopolisacáridos puede sugerirse que la producción de este monosacárido está relacionada con dos factores: el estrés producido por el cultivo en lactosuero y la fuente de nitrógeno. El tipo de fuente de nitrógeno tiene una influencia en la composición celular y en los exopolisacáridos excretados. Se reportó que *Botryococcus braunii* excretó más exopolisacáridos usando nitrato de sodio como fuente de nitrógeno, que cuando se cultivó con carbonato de amonio o urea (Lupi *et al.*, 1994; González-Fernández y Ballesteros, 2012). Dado que la fuente de nitrógeno en medio mineral fue nitrato de sodio, el aumento en la producción de ácido glucurónico puede ser atribuida a la concentración de nitrato en el medio de cultivo.

El ácido glucurónico es un polisacárido de interés biomédico y farmacéutico ya que forma parte de la estructura de polímeros importantes, como el ácido hialurónico, un glucosaminoglicano con aplicaciones en la medicina regenerativa y como compuesto activo de medicamentos antitrombóticos y antiartríticos.

La heparina sulfato es otro polisacárido de interés clínico en la coagulación de la sangre y del cual se busca una alternativa biotecnológica para su obtención, siendo el ácido glucurónico obtenido de las microalgas una opción interesante. Por otro lado, el alginato es un polímero constituido por ácido glucurónico, el cual es ampliamente utilizado en la industria alimenticia y como soporte para la inmovilización de células. Recientemente, su aplicación se ha extendido al ámbito farmacéutico, utilizándolo como vehículo en la entrega de medicamentos (Cimini *et al.*, 2012).

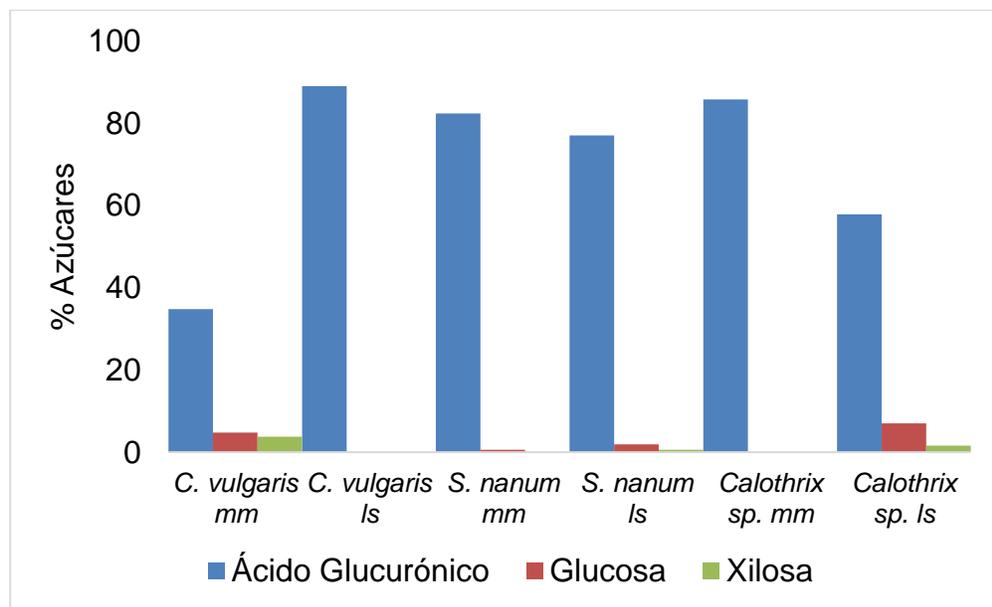


Figura 18. Perfil de azúcares de la biomasa cultivada en medio mineral (mm) y lactosuero (ls).

7.3.2 Proteínas

El contenido de proteína en la biomasa microalgal puede alcanzar hasta un 70% de peso seco. Este contenido total varía de acuerdo con el tipo de microalga estudiada y las condiciones de cultivo (Andreeva *et al.*, 2021).

En comparación con el contenido de carbohidratos, el porcentaje de proteínas presentó valores por arriba del 10% en ambos medios de cultivo (Fig. 17). Las microalgas *Chlorella vulgaris* ($26.93 \pm 0.041\%$) y *Stigeoclonium nanum* ($17.70 \pm 0.011\%$) fueron las cepas con un porcentaje de proteína mayor en lactosuero comparado con el medio mineral, mientras que *Calothrix* sp. tuvo un contenido menor en lactosuero ($16.76 \pm 0.322\%$) comparado con el medio mineral.

El contenido de proteínas en las algas verdes *C. vulgaris* y *S. nanum* concuerda con el reportado por Brar *et al.* (2019) en las algas verdes *Chlorella pyrenoidosa* (21.80%) y *Scenedesmus abundans* (34.06%) cultivadas en lactosuero diluido 3:1 y en *Chlorella vulgaris* (23.20%) cultivada en lactosuero ajustado a una concentración de 10 g L^{-1} de lactosa (Melo *et al.*, 2018). Mientras que el contenido de proteínas en *Calothrix* sp. obtenido fue similar al alcanzado en las cianobacterias *T. minus* (16.80%) y *Anabaena ambigua* (17.73%) cultivadas en lactosuero proveniente de la obtención de tofu al 100% y lactosuero diluido 3:1, respectivamente (Brar *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019). De acuerdo con De Almeida-Pires *et al.* (2021), una concentración alta de nitrógeno en lactosuero puede favorecer la síntesis de proteínas en la biomasa, sin embargo, la concentración de nitrato en el medio mineral es más alta comparada con lactosuero. A pesar de esto, el contenido de nitrógeno en lactosuero parece ser el adecuado para que la producción de proteínas sea favorable.

Otra razón puede estar relacionada con la fuente orgánica de los nutrientes en el lactosuero, ya que Murcia-Moreno y Parra-Moreno (2018) indican que el aporte orgánico de algunos nutrientes como en nitrógeno favorece la velocidad de asimilación, mineralización e incorporación en la fracción proteica de la microalga, proceso que puede ser un poco lento cuando la fuente de nutrientes es inorgánica.

7.3.3 Lípidos

El contenido de lípidos en la biomasa puede variar del 4% al 61% en peso seco (Ramos *et al.*, 2016), variando entre especies e incrementando o disminuyendo de acuerdo con las condiciones de cultivo y la naturaleza del medio de cultivo utilizado. Algunas microalgas cultivadas en residuos lácteos han reportado un contenido de lípidos que va del 12% al 21% (Gramegna *et al.*, 2020), mientras que las especies de *Chlorella* sp. cultivadas en agua residual han reportado un contenido aproximado de 9% a 35% (Choi *et al.*, 2018).

Los porcentajes de lípidos en las microalgas *S. nanum* y *C. vulgaris* fueron mayores en medio mineral comparado con su contenido en lactosuero, mientras que en la cianobacteria *Calothrix* sp. cultivada en lactosuero fue la cepa que presentó un contenido de lípidos mayor comparado con el medio mineral (Fig. 17). Este aumento en el contenido de lípidos en el lactosuero puede estar relacionado con la limitación de nitrógeno amoniacal, nutriente que fue consumido rápidamente por esta microalga, promoviendo la producción de lípidos. De igual manera, Nzayisenga *et al.* (2020) menciona que el incremento de lípidos le corresponde una disminución en el contenido de carbohidratos y proteínas. En la Figura 17 se puede observar que el contenido de carbohidratos y proteínas disminuye en el lactosuero aumentando el contenido de lípidos, lo cual concuerda con el descrito anteriormente.

La síntesis de carbohidratos es un fenómeno que sucede de manera paralela en las microalgas; la energía es almacenada primero como carbohidratos y el exceso de está, es convertido en lípidos (Brar *et al.*, 2019). Al ser un proceso paralelo, se ha sugerido la competencia por un precursor común, bloqueando la síntesis de almidón e incrementando la producción de lípidos. En el caso del presente trabajo, no sólo la síntesis de carbohidratos se vio afectada, también la producción de proteínas, un comportamiento que observaron Nzayisenga *et al.* (2020), donde el aumento de lípidos disminuyó el contenido de proteínas, sugiriendo que la síntesis de lípidos recae en la degradación de proteínas o en la inhibición en la síntesis de proteínas.

A pesar del bajo contenido de lípidos en las cepas cultivadas en lactosuero, estos fueron superiores al 50% en las microalgas y cianobacteria estudiadas en el presente trabajo, comparado con el reportado por Wang *et al.* (2019), quienes obtuvieron una acumulación de lípidos de 37.16% en la cianobacteria *T. minus* cultivado en tofu sin diluir, mientras que para las algas verdes han obtenido porcentajes del 10% hasta 34%, aproximadamente, en diferentes especies principalmente del género *Chlorella* sp., cultivadas en lactosuero con dilución 3:1 (Brar *et al.*, 2019), en lactosuero diluido 1:20 (Quian, 2018) y en agua residual sintética (Pandey *et al.*, 2019).

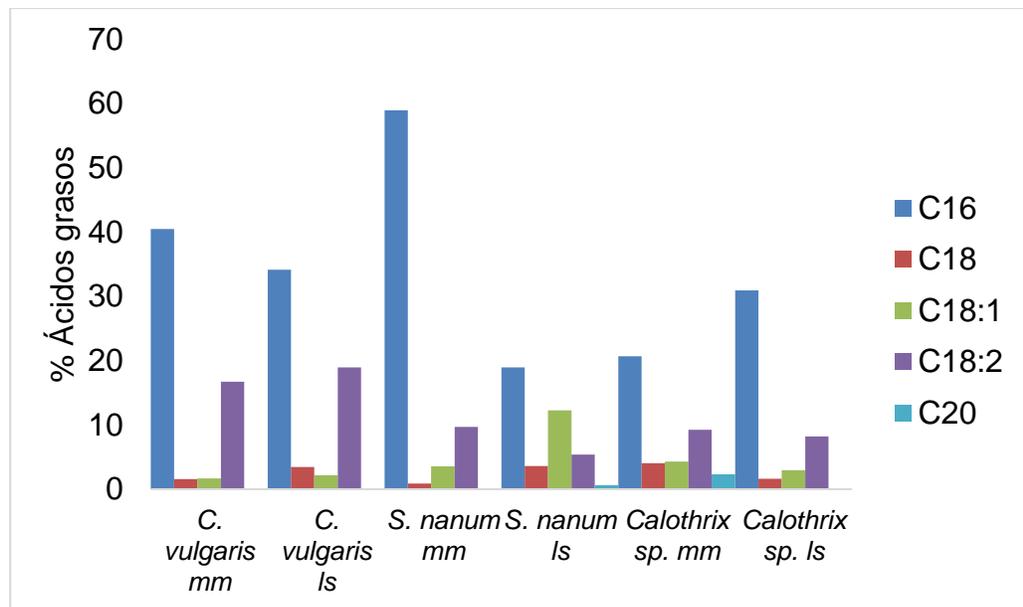


Figura 19. Perfil de ácidos grasos en la biomasa cultivada en medio mineral (mm) y lactosuero (ls).

El ácido graso principal en la biomasa de las tres cepas cultivadas en ambos medios de cultivo fue el ácido palmítico (C16), (Fig. 19). En medio mineral, *Stigeoclonium nanum* fue la cepa que presentó un porcentaje alto de ácido palmítico, alcanzando un 58.93%, comparado con *C. vulgaris* (40.47%) y *Calothrix* sp. (20.67%).

Por su parte, *Chlorella vulgaris* y *Calothrix* sp. cultivadas en lactosuero, acumularon un 34.13% y 30.93% de ácido palmítico, respectivamente, siendo

Calothrix sp. la que alcanzó un porcentaje alto, comparado con su contenido cuando fue cultivada en medio mineral. Ummalyima y Sukumaran (2014) observaron un comportamiento similar en *Chlorococcum* sp.-RAP-13, obteniendo en el perfil lipídico al ácido palmítico como el mayoritario, alcanzando un porcentaje de 44-55% cuando fue cultivado en lactosuero. Lo anterior concuerda con lo observado en el presente trabajo.

El ácido linoleico (C18:2) fue el segundo ácido graso abundante en la biomasa de las tres cepas cultivadas en ambos medios de cultivo. En medio mineral, *Chlorella vulgaris* fue la cepa que tuvo un contenido porcentual mayor (16.70%), comparado con *S. nanum* y *Calothrix* sp., sin embargo, el cultivo de *C. vulgaris* en lactosuero aumento el contenido de este ácido graso (18.93%), lo cual sugiere que el lactosuero puede estimular la acumulación de este ácido graso. Por otro lado, el contenido de C18:2 disminuyó en las cepas *S. nanum* y *Calothrix* sp. cuando fueron cultivadas en lactosuero.

El ácido oleico (C18:1) fue el ácido graso que alcanzó un porcentaje considerable en *S. nanum* cultivada en lactosuero, obteniendo un 12.27%, comparado con su cultivo en medio mineral y con las cepas *C. vulgaris* y *Calothrix* sp. cultivadas en medio mineral y lactosuero, presentando porcentajes del 1.70-4.30%.

El ácido esteárico (C18) fue el ácido graso que se encontró en menor proporción en las tres cepas cultivadas en ambos medios. El ácido araquídico (C20) solo fue detectado en *S. nanum* en lactosuero y en *Calothrix* sp. en medio mineral en una proporción muy pequeña, alcanzando porcentajes del 0.63 y 2.30%, respectivamente (Fig. 19). Lo anterior es contrario al obtenido por Ummalyima y Sukumaran (2014), donde el contenido de ácido linoleico (C18:2) y linolénico (C18:3) fueron bajos, mientras que el ácido oleico y esteárico fueron los segundos ácidos grasos abundantes en la microalga *Chlorococcum* sp.-RAP-13 cultivada en lactosuero.

El contenido de ácidos grasos saturados, mono y poliinsaturados fueron variables en las microalgas y la cianobacteria cultivadas en ambos medios. *S.*

nanum y *Chlorella vulgaris* presentaron contenidos altos de ácidos grasos saturados (AGS) cuando fueron cultivadas en medio mineral, alcanzando valores del 59.83% y 42.04%, respectivamente, comprado con su porcentaje de AGS cuando fueron cultivadas en lactosuero (37.56% y 23.2%). Por su parte, *Calothrix* sp. cultivada en lactosuero alcanzó un 32.56% de AGS, porcentaje mayor comprado con su cultivo en medio mineral (27%). El ácido graso monoinsaturado detectado fue el oleico, del cual como se ha mencionado anteriormente, *S. nanum* fue la cepa que presentó un porcentaje mayor cuando fue cultivada en lactosuero.

Por su parte, los ácidos grasos poliinsaturados presentaron un porcentaje de 18.9% en *Chlorella vulgaris* cultivada en lactosuero, siendo ligeramente mayor comprado con su porcentaje en medio mineral (16.70%). *S. nanum* y *Calothrix* sp. presentaron porcentajes bajos de ácidos grasos poliinsaturados, comparados con los porcentajes en medio mineral. Ummalyma y Sukumaran (2014) y Wang *et al.*, (2019), reportaron un contenido mayor de ácidos grasos saturados en las cepas *T. minus* y *Chlorococcum* sp.-RAP-13 cultivadas en lactosuero proveniente de la obtención de tofu y de agua residual de la industria láctea, respectivamente. En el caso del contenido de ácidos grasos poliinsaturados, *T. minus* tuvo un contenido mayor, mientras que los monoinsaturados presentó un contenido menor.

El perfil y contenido de ácidos grasos en las algas son un factor clave para ser consideradas en la producción de biodiesel. Los ácidos grasos deseables son: C14:0, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1 y C18:2, los cuales, dependiendo de su proporción, le dotaran propiedades deseables al biodiesel producido. Entre las proporciones, se ha reportado que los ácidos grasos monoinsaturados y un par de saturados y poliinsaturados es el perfil recomendable, ya que un alto contenido de ácidos saturados puede causar una pobre estabilidad a bajas temperaturas de operación, mientras que un alto contenido de ácidos poliinsaturados acorta la vida de anaquel y puede conducir a la oxidación del combustible (Ummalyma y Sukumaran, 2014; Tejeda-Benítez *et al.*, 2015).

El perfil obtenido se presenta en la Figura 19. De acuerdo con la bibliografía, la proporción de ácidos monoinsaturados debe ser mayoritaria, ya que se ha considerado ideal para mejorar las propiedades del biodiesel como estabilidad oxidativa, mantenimiento del número de cetano y mejora en las propiedades de flujo en frío (Arias-Peñaranda *et al.*, 2013).

El contenido mayoritario de ácidos grasos saturados, principalmente el ácido palmítico, descarta al aceite obtenido en el presente trabajo, para su aplicación en la obtención de biodiesel, sin embargo, puede aplicarse en otros ámbitos como la cosmética, facilitando la absorción de productos en la piel y ayudando en la resistencia a la oxidación (Maltsev y Maltseva, 2021). Recientemente, el ácido palmítico ha sido aplicado como un aumentador en la absorción y entrega del medicamento clorhidrato de vancomicina, cuya aplicación tópica es limitada debido al alto peso molecular e hidrofobicidad que presenta el medicamento (Datta *et al.*, 2021). La aplicación de este ácido graso como aumentador químico puede mejorar la adsorción de diferentes productos tópicos, ya sea de índole farmacológica o cosmética. De igual manera, se ha mencionado que una dieta alta en ácidos grasos de cadena corta y mediana aumenta el gasto energético y disminuye la grasa corporal en los humanos, pudiendo introducirse como suplemento alimenticio. Otra propiedad interesante que se le atribuye a los ácidos grasos de cadena mediana es su actividad antimicrobiana, la cual puede introducirse a la alimentación animal, siendo una alternativa a los antibióticos (Maltsev y Maltseva, 2021).

7.3.4 Carotenoides

Los carotenoides son un grupo amplio de isoprenoides lipofílicos sintetizados principalmente por organismos fotosintéticos y algunos microorganismos no fotosintéticos como bacterias y hongos. Las funciones de los carotenoides en la fotosíntesis son: absorber luz de las regiones del espectro visible en las que la clorofila no lo hace eficientemente y proteger el aparato fotosintético frente al daño foto-oxidativo. Los principales carotenoides encontrados en las microalgas

son: licopenos, zeaxantina, violaxantina, β -caroteno, astaxantina y luteína, siendo los últimos tres los más estudiados (Varela *et al.*, 2015; Bonett, 2018).

Los cromatogramas de carotenos en las tres cepas se muestran en el Anexo 14; del total de carotenoides la astaxantina y β -caroteno fueron los carotenos seleccionados para su cuantificación, debido a su interés comercial, logrando identificar solo la astaxantina en todos los casos (Fig. 20). Sin embargo, otros carotenoides fueron encontrados en proporciones importantes, los cuales no fueron identificados. De acuerdo con la bibliografía, basándose en los tiempos de retención en diferentes trabajos con algunas plantas y algas o estándares, los posibles carotenos presentes en las cepas se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Carotenoides identificados en *C. vulgaris*, *S. nanum* y *Calothrix* sp.

cepa	medio	Tr (min)	%	Caroteno identificado	Referencia	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Mineral	4.29	23.8	trans-neoxantina	Standard	(Gupta <i>et al.</i> , 2015)
		4.56	20	Fenicoxantina	<i>Traustochytrium</i> sp.	(Carmona <i>et al.</i> , 2003)
		14.71	5.3	Cis-neoxantina	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	(Inbaraj <i>et al.</i> , 2006)
	Lactosuero	3.2	6.9	Luteína	<i>Auxenochlorella</i> sp.	(Asker y Awad, 2019)
		4.28	28.1	trans-neoxantina	Standard	(Gupta <i>et al.</i> , 2015)
		4.55	16.9	Fenicoxantina	<i>Traustochytrium</i> sp.	(Carmona <i>et al.</i> , 2003)
		5.11	9	Auroxantina	<i>C. pyrenoidosa</i>	(Inbaraj <i>et al.</i> , 2006)
	<i>S. nanum</i>	Mineral	3.17	6.5	N.D.	/
4.24			22.8	Luteína	<i>Sporobolomyces</i>	(Razavi <i>et al.</i> ,

					<i>riberrimus</i> H110	2006)
		4.5	8.8	Fenicoxantina	<i>Traustochytrium</i> sp.	(Carmona <i>et al.</i> , 2003)
	Lactosuero	1.66	26.1	N.D.	/	/
		1.88	9.1	N.D.	/	/
2.17		6	N.D.	/	/	
4.29		20.8	Luteína	<i>Sporobolomyces riberrimus</i> H110	(Razavi <i>et al.</i> , 2006)	
<i>Calothrix</i> sp.	Mineral	1.57	5.1	N.D.	/	/
		4.54	4.7	Éster apocarotenoico	<i>Sporobolomyces riberrimus</i> H110	(Razavi <i>et al.</i> , 2006)
		5.85	14.7	Auroxantina	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	(Inbaraj <i>et al.</i> , 2006)
		6.35	11	9'-cis- anteraxantina	Standard	(Gupta <i>et al.</i> , 2015)
		9.12	18.1	Isómero de ζ- caroteno	Standard	(Gupta <i>et al.</i> , 2015)
		23.46	10.5	Trans-luteína	<i>Chlorella vulgaris</i>	(Aluç <i>et al.</i> , 2018)
	Lactosuero	1.54	12.6	N.D.	/	/
		5.88	15.8	Isómero de fitoeno/ cantaxantina	Standard/ <i>Traustochytrium</i> sp.	(Gupta <i>et al.</i> , 2015)/(Carmona <i>et al.</i> , 2003)
		9.07	13	5,6:5,8- diepoxicaxantina	<i>Dunaliella salina</i>	(Mayorga <i>et al.</i> , 2017)
		22.7	6.9	Cis-luteína	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	(Inbaraj <i>et al.</i> , 2006)

N.D.: No definido, Tr: tiempo de retención.

En medio mineral, *Stigeoclonium nanum* acumuló un mayor porcentaje de astaxantina (33.93%) comparado con *C. vulgaris* y *Calothrix* sp., mientras que en lactosuero *Calothrix* sp. fue la cepa con un porcentaje mayor de astaxantina, alcanzando un 22.52% (Fig. 20), comparado con *C. vulgaris* y *S. nanum*. La deficiencia de nitrógeno puede desencadenar una acumulación simultánea de carotenoides y lípidos, siendo ambos producidos en respuesta a un estímulo estresante, creando una capa oleosa la cual protege tanto al aparato fotosintético, así como la integridad de la membrana, de los radicales libres y la peroxidación de los lípidos. Al ser la astaxantina un carotenoide secundario que es producido bajo condiciones de estrés, está presente en cuerpos lipídicos citoplasmáticos fuera del cloroplasto (Shi *et al.*, 2020). El cultivo en lactosuero de *Calothrix* sp. acumuló un porcentaje mayor de lípidos en la biomasa, lo cual concuerda con la acumulación de astaxantina en el perfil obtenido, siendo una respuesta al estímulo estresante frente a la disminución de nitrógeno y el fotoperiodo continuo que fue utilizado en este trabajo.

De igual manera, se ha observado que una concentración suficiente de fósforo en el medio y una concentración baja de nitrógeno, regula la producción de lípidos y a su vez aumenta la producción de astaxantina (Miranda *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2020). Lo anterior concuerda con la acumulación de lípidos y astaxantina en *Calothrix* sp. en lactosuero, ya que la concentración de fósforo es mayor en lactosuero, comparado con el nitrógeno, siendo utilizado para la síntesis de energía y macromoléculas de protección.

Contrario a lo esperado, una alta concentración de nitrato en el medio mineral promovió la acumulación de astaxantina en la microalga *S. nanum*, lo cual concuerda con lo reportado por Binti Ibnu Rasid *et al.* (2014), quienes observaron un aumento en la producción de astaxantina en las algas verdes *Chlorella sorokiniana* y *Tetraselmis* sp. cuando la concentración de nitrato aumentó. De igual forma, Ribeiro *et al.* (2017) obtuvo un contenido mayor de astaxantina en *C. protothecoides*, bajo condiciones autotróficas (medio definido)

que cuando el lactosuero, proveniente de la obtención de queso ricota (requesón), fue adicionado al medio.

El β -caroteno no logró detectarse en las microalgas y la cianobacteria estudiadas. Una posible razón fue por la probable oxidación de éste, causando el aumento en la astaxantina, ya que este caroteno es derivado del β -caroteno. El fotoperiodo utilizado en el presente trabajo pudo contribuir a dicha degradación, debido a que la luz puede ser un estímulo estresante para la síntesis de carotenos en las microalgas. Scharff *et al.* (2017) reportaron que, al aumentar el fotoperiodo, éste afectaba negativamente la producción de β -caroteno en *C. vulgaris* y *S. obliquus*, sugiriendo que el cambio en los pigmentos es resultado de una foto-aclimatación en respuesta a cambios en la calidad e intensidad de luz irradiada en la microalga. Por otro lado, Raman y Mohamad (2012) encontraron que la producción de astaxantina fue favorable cuando el fotoperiodo era continuo concluyendo que la cantidad de luz es más importante que la intensidad de la luz en la producción de este carotenoide.

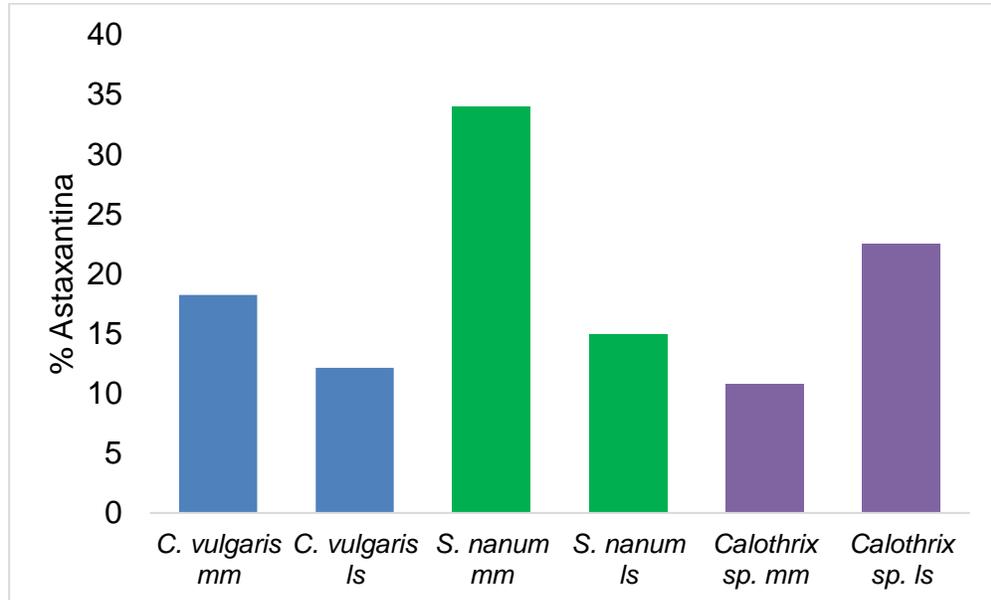


Figura 20. Comportamiento de astaxantina en medio mineral (mm) y lactosuero (ls).

8. CONCLUSIONES

El contenido de nutrientes, muy particularmente el de nitratos presentes en el lactosuero estimuló el crecimiento de *Stigeoclonium nanum*, lo que lo convierte en un sustrato potencial para la producción de biomasa de esta microalga, mientras que en *Chlorella vulgaris* y en la cianobacteria *Calothrix* sp., el crecimiento fue muy similar al obtenido en los medios minerales BG-11 y BBM.

El lactosuero modificó la composición bioquímica de la biomasa de las microalgas y la cianobacteria, estimulando el contenido de proteínas en *Chlorella vulgaris* y *Stigeoclonium nanum*, y de lípidos en *Calothrix* sp.

El perfil de lípidos en la biomasa de las microalgas cultivadas en lactosuero estuvo en su mayoría compuesto por ácidos grasos saturados, principalmente el ácido palmítico.

El perfil de azúcares en la biomasa de las microalgas y la cianobacteria, cultivadas en ambos medios, estuvo compuesto principalmente por ácido glucurónico.

La cianobacteria *Calothrix* sp. produjo astaxantina como pigmento principal cuando fue cultivada en lactosuero, sugiriendo que este puede ser utilizado como medio de cultivo para su producción.

9. REFERENCIAS

- 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>
- Ahmad, T., Aadil, R. M., Ahmed, H., Rahman, U. ur, Soares, B. C. V., Souza, S. L. Q., Pimentel, T. C., Scudino, H., Guimarães, J. T., Esmerino, E. A., Freitas, M. Q., Almada, R. B., Vendramel, S. M. R., Silva, M. C., & Cruz, A. G. (2019). Treatment and utilization of dairy industrial waste: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 88(April), 361–372. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.04.003>
- Akao, P. K., Mamane, H., Kaplan, A., Gozlan, I., Yehoshua, Y., Kinel-Tahan, Y., & Avisar, D. (2020). Iohexol removal and degradation-product formation via biodegradation by the microalga *Chlorella vulgaris*. *Algal Research*, 51(August), 102050. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102050>
- Aluç, Y., Başaran Kankılıç, G., & Tüzün, İ. (2018). Determination of carotenoids in two algae species from the saline water of Kapulukaya reservoir by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 41(2), 93–100. <https://doi.org/10.1080/10826076.2017.1418376>
- Andreeva, A., Budenkova, E., Babich, O., Sukhikh, S., Ulrikh, E., Ivanova, S., Prosekov, A., & Dolganyuk, V. (2021). Production, purification, and study of the amino acid composition of microalgae proteins. *Molecules*, 26(9), 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules26092767>
- APHA, AWWA, & WEF. (2005). 4500-NH₃ Nitrogen (Ammonia). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 4000, 108–117.
- Arias-Peñaranda, M. T., Cristiani-Urbina, E., Montes-Horcasitas, C., Esparza-García, F., Torzillo, G., & Cañizares-Villanueva, R. O. (2013). *Scenedesmus incrassatulus* CLHE-Si01: A potential source of renewable lipid for high quality biodiesel production. *Bioresource Technology*, 140, 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.080>
- ATLAS. (2013). *Ficha descriptiva Calothrix sp.* Universidad Nacional Autónoma de México. <http://sistemas.fciencias.unam.mx/~biomar/bioportal/Atlas/fichaatlas.php?id=836>
- Berrendero, E., Perona, E., & Mateo, P. (2008). Genetic and morphological characterization of *Rivularia* and *Calothrix* (Nostocales, Cyanobacteria) from running water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(2), 447–460. <https://doi.org/10.1099/ijls.0.65273-0>
- Binti Ibnu Rasid, E. N., Mohamad, S. E., Jamaluddin, H., & Salleh, M. M. (2014). Screening factors influencing the production of astaxanthin from freshwater and marine microalgae. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(4), 2160–

2174. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0644-x>

Bligh, E. G. ., & Dyer, W. J. (1959). Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8).

Bold, H. (1949). The morphology of *Chlamydomonas Chlamydogama*, sp. nov. *Bulletin of Torrey Botanical Club*, 76(2), 101–108. <http://www.jstor.org/stable/2482218>

Bonett, E. A. (2018). *Aislamiento de microalgas y su cultivo en suero de leche*. Universidade Federal de Lavras.

Brar, A., Kumar, M., & Pareek, N. (2019). Comparative appraisal of biomass production, remediation, and bioenergy generation potential of microalgae in dairy wastewater. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00678>

Callejas-Hernández, J., Prieto García, F., Reyes Cruz, V. E., Marmolejo Santillán, Y., & Méndez Marzo, M. A. (2012). Caracterización fisicoquímica de un lactosuero: potencialidad de recuperación de fósforo. *Acta Universitaria*, 22(1), 11–18. <https://doi.org/10.15174/au.2012.304>

CANILEC. (2021). *Estadísticas del Sector Lácteo*.

Chen, X., Wei, X., Wang, J., Yang, Y., Wang, Y., Li, Q., & Wang, S. (2020). Toxicity removal and biodegradability enhancement of sludge extract in hydroquinone-rich wastewater via cultivation of *Chlorella vulgaris*. *Journal of Cleaner Production*, 277, 124030. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124030>

Choi, Y. K., Jang, H. M., & Kan, E. (2018). Microalgal biomass and lipid production on dairy effluent using a novel microalga, *Chlorella* sp. isolated from dairy wastewater. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 23(3), 333–340. <https://doi.org/10.1007/s12257-018-0094-y>

Cimini, D., de Rosa, M., & Schiraldi, C. (2012). Production of glucuronic acid-based polysaccharides by microbial fermentation for biomedical applications. *Biotechnology Journal*, 7(2), 237–250. <https://doi.org/10.1002/biot.201100242>

Contreras-Flores, C., Peña-castro, J. M., Flores-Cotera, L. B., & Cañizares-villanueva, R. O. (2003). Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Aug*, 28(8), 450–456.

Culture Collection of Autotrophic Organisms (CCALA). (2013). *500 Stigeoclonium nanum (Dillwyn) Kuetzing*. <http://ccala.butbn.cas.cz/en/stigeoclonium-nanum-dillwyn-kuetzing>

D'Imporzano, G., Veronesi, D., Salati, S., & Adani, F. (2018). Carbon and nutrient recovery in the cultivation of *Chlorella vulgaris*: A life cycle assessment approach to comparing environmental performance. *Journal of Cleaner Production*, 194, 685–694. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.05.174>

Datta, D., Panchal, D. S., & Venuganti, V. V. K. (2021). Transdermal delivery of

vancomycin hydrochloride: Influence of chemical and physical permeation enhancers. *International Journal of Pharmaceutics*, 602(April), 120663. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120663>

de Almeida-Pires, T., Cardoso, V. L., & Batista, F. R. X. (2021). Feasibility of *Chlorella vulgaris* to waste products removal from cheese whey. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s13762-021-03423-x>

Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1951). A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature*, 168(4265), 167. <https://doi.org/10.1038/168167a0>

Franco-Martinez, M. de L., Rodríguez-Rosales, M. D. J., Moreno Medina, C. U., & Martínez-Roldán, A. de J. (2017). Tolerance and nutrients consumption of *Chlorella vulgaris* growing in mineral medium and real wastewater under laboratory conditions. *Open Agriculture*, 2(1), 394–400. <https://doi.org/10.1515/opag-2017-0042>

Gayathri, M., Shunmugam, S., Mugasundari, A. V., Rahman, P. K. S. M., & Muralitharan, G. (2018). Growth kinetic and fuel quality parameters as selective criterion for screening biodiesel producing cyanobacterial strains. *Bioresource Technology*, 247, 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.064>

Girard, J. M., Roy, M. L., Hafsa, M. Ben, Gagnon, J., Faucheux, N., Heitz, M., Tremblay, R., & Deschênes, J. S. (2014). Mixotrophic cultivation of green microalgae *Scenedesmus obliquus* on cheese whey permeate for biodiesel production. *Algal Research*, 5(1), 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.03.002>

González, M. (2012). Aspectos medio ambientales asociados a los procesos de la Industria láctea. *Mundo Pecuario*, 1(8), 16–32.

González-Fernández, C., & Ballesteros, M. (2012). Linking microalgae and cyanobacteria culture conditions and key-enzymes for carbohydrate accumulation. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1655–1661. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.07.003>

González, L. E., Cañizares, R. O., & Baena, S. (1997). Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresource Technology*, 60(3), 259–262. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)00029-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(97)00029-1)

González, M., Castells, M. L., Mellinger, C., Juliano, P., & Sepulveda, J. U. (2017). El suero de quesería. In M. L. Castells, P. Juliano, & G. B. Muset (Eds.), *Valorización del lactosuero* (1era ed., pp. 15–21). Instituto Nacional de Tecnología Industria.

González, S., Perales, H. V., & Salcedo, M. O. (2013). Biología Celular y Bioquímica. In *Neuroendocrinology* (1era ed., Vol. 89, Issue 52). Universidad Nacional Autónoma de México.

- Gramegna, G., Scortica, A., Scafati, V., Ferella, F., Gurrieri, L., Giovannoni, M., Bassi, R., Sparla, F., Mattei, B., & Benedetti, M. (2020). Exploring the potential of microalgae in the recycling of dairy wastes. *Bioresource Technology Reports*, 12(October), 100604. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100604>
- Grubišić, M., Šantek, B., Zorić, Z., Čošiće, Z., Vrana, I., Gašparović, B., Čož-Rakovac, R., & Ivanić Šantek, M. (2022). Bioprospecting of microalgae isolated from the Adriatic Sea: Characterization of biomass, pigment, lipid and fatty acid composition, and antioxidant and antimicrobial activity. *Molecules*, 27, 1248. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules27041248>
- Guiry, M. D., & Guiry, G. M. (2020). *AlgaeBase*. Públícacion Electrónica Mundial. Universidad Nacional de Irlanda. https://www.algaebase.org/search/genus/detail/?tc=accept&genus_id=43089
- Hamed, E., Sivukumar, E., & Abd El-Fatah, A. (2019). Dual role of microalgae in wastewater treatment and biodiesel production. In A. K. Gupta & F. Bux (Eds.), *Application of Microalgae in Wastewater Treatment* (pp. 91–100). Springer. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-13909-4_5
- Hašler, P., Ondřej, V., Švécarová, M., Sedlářová, M., Vaidová, B., & Poulíčková, A. (2017). Tritium influence on morphology, reactive oxygen species production and catalase gene expression in *Pseudoclonium basilense* and *Stigeoclonium nanum* (Chlorophyta). *Fottea*, 17(1), 127–135. <https://doi.org/10.5507/fot.2017.012>
- Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 157–173. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
- Inforural. (2021, November 23). *Expectativa en la producción de lácteos de México*. Inforural. <https://www.inforural.com.mx/expectativa-en-la-produccion-de-lacteos-de-mexico/#:~:text=Las operaciones de quesos industriales,el queso producido en México.&text=Para 2021%2C se estima un,a 563%2C000™ en 2022.>
- Jitendra, M., Ajam, S., Nethravathy, U. M., & Sandeep, M. (2019). Potential of Microalgae for Integrated Biomass Production Utilizing CO₂ and Food Industry Wastewater. In A. K. Gupta & F. Bux (Eds.), *Application of Microalgae in Wastewater Treatment* (pp. 43–49). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-13909-4.>
- Kallarakkal, K. P., Muthukumar, K., Alagarsamy, A., Pugazhendhi, A., & Naina Mohamed, S. (2021). Enhancement of biobutanol production using mixotrophic culture of *Oscillatoria* sp. in cheese whey water. *Fuel*, 284(April 2020), 119008. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119008>
- Kim, J., Kim, M., Lee, S., & Jin, E. S. (2020). Development of a *Chlorella vulgaris* mutant by chemical mutagenesis as a producer for natural violaxanthin. *Algal Research*, 46(September 2019), 101790.

<https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101790>

Kosourov, S., Murukesan, G., Jokela, J., & Allahverdiyeva, Y. (2016). Carotenoid biosynthesis in *Calothrix* sp. 336/3: Composition of carotenoids on full medium, during diazotrophic growth and after long-term H₂ photoproduction. *Plant and Cell Physiology*, 57(11), 2269–2282. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw143>

Kosourov, S., Murukesan, G., Seibert, M., & Allahverdiyeva, Y. (2017). Evaluation of light energy to H₂ energy conversion efficiency in thin films of cyanobacteria and green alga under photoautotrophic conditions. *Algal Research*, 28(April), 253–263. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.09.027>

Koutra, E., Mastropetros, S. G., Ali, S. S., Tsigkou, K., & Kornaros, M. (2021). Assessing the potential of *Chlorella vulgaris* for valorization of liquid digestates from agro-industrial and municipal organic wastes in a biorefinery approach. *Journal of Cleaner Production*, 280, 124352. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124352>

Kumar, D., Kaštánek, P., & Adhikary, S. P. (2018). Exopolysaccharides from cyanobacteria and microalgae and their commercial application. *Current Science*, 115(2), 234–241. <https://doi.org/10.18520/cs/v115/i2/234-241>

Kushwaha, J. P., Srivastava, V. C., & Mall, I. D. (2011). An overview of various technologies for the treatment of dairy wastewaters. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(5), 442–452. <https://doi.org/10.1080/10408391003663879>

Leino, H., Kosourov, S. N., Saari, L., Sivonen, K., Tsygankov, A. A., Aro, E., & Allahverdiyeva, Y. (2011). Extended H₂ photoproduction by N₂-fixing cyanobacteria immobilized in thin alginate films. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(1), 151–161. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.09.088>

Lowry, Randall, R. J., & Lewis, A. (1951). Méthode de Lowry. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.

Lu, Q., Zhou, W., Min, M., Ma, X., Ma, Y., Chen, P., Zheng, H., Doan, Y. T. T., Liu, H., Chen, C., Urriola, P. E., Shurson, G. C., & Ruan, R. (2016). Mitigating ammonia nitrogen deficiency in dairy wastewaters for algae cultivation. *Bioresource Technology*, 201, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.029>

Lupi, F. M., Fernandes, H. M. L., Tomé, M. M., Sá-Correia, I., & Novais, J. M. (1994). Influence of nitrogen source and photoperiod on exopolysaccharide synthesis by the microalga *Botryococcus braunii* UC 58. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(7), 546–550. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90116-3](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90116-3)

Maltsev, Y., & Maltseva, K. (2021). Fatty acids of microalgae: diversity and applications. In *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* (Vol. 20, Issue 2). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s11157-021-09571-3>

Manjunath, M., Kanchan, A., Ranjan, K., Venkatachalam, S., Prasanna, R., Ramakrishnan, B., Hossain, F., Nain, L., Shivay, Y. S., Rai, A. B., & Singh, B. (2016). Beneficial cyanobacteria and eubacteria synergistically enhance bioavailability of soil nutrients and yield of okra. *Heliyon*, 2(2). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2016.e00066>

Marazzi, F., Bellucci, M., Fantasia, T., Ficara, E., & Mezzanotte, V. (2020). Interactions between microalgae and bacteria in the treatment of wastewater from milk whey processing. *Water (Switzerland)*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/w12010297>

Markou, G., & Georgakakis, D. (2011). Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy*, 88(10), 3389–3401. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.042>

Martínez-Roldán, A. de J., & Ibarra-Berumen, J. (2019). Employment of wastewater to produce microalgal biomass as a biorefinery concept. *Microalgae Biotechnology for Development of Biofuel and Wastewater Treatment*, 487–504. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2264-8_19

Martínez-Roldán, A. J., & Cañizares-Villanueva, R. O. (2015). Photobioreactors: Improving the biomass productivity. *Microalgae and Other Phototrophic Bacteria: Culture, Processing, Recovery and New Products, March*, 145–169.

Martinez Roldán, A. de J., Gómez Lozano, B. P., Díaz Ramírez, M. A., & Ruíz García, M. Á. (2019). Diseño y construcción de un fotobiorreactor tipo flat panel para la producción de biomasa *Stigeoclonium nanum*. *Diseminación de La Investigación En La Educación Superior: Celaya 2019, November*, 2116–2117.

Mayorga, C., Murillo, E., & Manso, L. (2017). Luteína y B-caroteno como principales antioxidantes acumulados en la microalga *Dunaliella salina*. *Revista Prisma Tecnológico*, 8(1), 34–38. <http://revistas.utp.ac.pa/index.php/prisma/article/view/1530>

Melo, R. G. de, Andrade, A. F. de, Bezerra, R. P., Correia, D. S., Souza, V. C. de, Brasileiro-Vidal, A. C., Viana Marques, D. de A., & Porto, A. L. F. (2018). *Chlorella vulgaris* mixotrophic growth enhanced biomass productivity and reduced toxicity from agro-industrial by-products. *Chemosphere*, 204, 344–350. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.039>

Miranda, A. M., Ossa, E. A., Vargas, G. J., & Sáez, A. A. (2019). Effect of the Low Concentration of Nitrates and Phosphates on the Accumulation of Astaxantin in *Haematococcus pluvialis* UTEX 2505. *Informacion Tecnologica*, 30(1), 23–32. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642019000100023>

Murcia-Moreno, J. L., & Parra-Moreno, M. A. (2018). Produccion de proteínas a partir de la microalga *Chlorella vulgaris* enriquecido el medio de cultivo con fuentes de nitrógeno. Fundación Universidad de América.

Nehul, J. N. (2021). Antibacterial Activity of a Cyanobacterium *Calothrix javanica* de Wilde. *World J. Cur. Sci. Res.*, 1 (March), 7–10.

<https://www.researchgate.net/publication/353043924%0AAntibacterial>

Nivetha, B. J., Bhakyalakshmi, S. V., Dinesh Kumar, S., Santhanam, P., Vijayalakshmi, D., Divya, M., & Krishnaveni, N. (2019). Utilization of sugarcane industry effluent for high value biomass and photosynthetic pigments production of *Chlorella vulgaris* (PSBDU06). *Bioresource Technology Reports*, 7(May), 100260. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100260>

NMX-AA-030/1-SCFI-2012. Medición de la Demanda Química de Oxígeno en aguas naturales, residuales y residuales tratadas, 1 Catálogo de normas mexicanas 1 (2012). <http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166774/NMX-AA-030-1-SCFI-2012.pdf>

Novelo, E. (2012). *Chlorophyta*. In *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán* (1era ed., pp. 1–86). Universidad Nacional Autónoma de México.

Nzayisenga, J. C., Farge, X., Groll, S. L., & Sellstedt, A. (2020). Effects of light intensity on growth and lipid production in microalgae grown in wastewater. *Biotechnology for Biofuels*, 13(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1646-x>

Olvera-Ramírez, R., Coria-Cedillo, M., Cañizares-Villanueva, R. O., Martínez-Jerónimo, F., Ponce-Noyola, T., & Ríos-Leal, E. (2000). Growth evaluation and bioproducts characterization of *Calothrix* sp. *Bioresource Technology*, 72(2), 121–124. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00099-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00099-1)

Pandey, A., Srivastava, S., & Kumar, S. (2019). Isolation, screening and comprehensive characterization of candidate microalgae for biofuel feedstock production and dairy effluent treatment: A sustainable approach. *Bioresource Technology*, 293(August), 121998. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121998>

Parra Huertas, A. R. (2009). Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 62(1), 4967–4982. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.011>

Perales-Vela, H. V. (2008). Caracterización fotosintética y respiratoria de *Scenedesmus incrassatulus* durante la biorremoción de Cu⁺². Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Unidad Zacatenco.

Pereira, M. I. B., Chagas, B. M. E., Sassi, R., Medeiros, G. F., Aguiar, E. M., Borba, L. H. F., Silva, E. P. E., Neto, J. C. A., & Rangel, A. H. N. (2019). Mixotrophic cultivation of *Spirulina platensis* in dairy wastewater: Effects on the production of biomass, biochemical composition and antioxidant capacity. *PLoS ONE*, 14(10), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224294>

Pérez, A., Santamaria, E. K., Operario, D., Tarkang, E. E., Zotor, F. B., Cardoso, S. R. de S. N., Autor, S. E. U., De, I., Dos, A., Vendas, O. D. E., Empresas, D. A. S., Atividades, P. O., Artigo, N., Gest, G. N. R. M. D. E., Para, D. E. F.,

- Miranda, S. F. da R., Ferreira, F. A. A., Oliver, J., Dario, M., ... Volk, J. E. (2017). Estudio de la producción de biomasa de *Chlorella vulgaris* crecida heterotroficamente sobre vinazas de la caña de azúcar. *BMC Public Health*, 5(1), 1–8. <https://ejournal.poltektegal.ac.id/index.php/siklus/article/view/298%0Ahttp://repositorio.unan.edu.ni/2986/1/5624.pdf%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.jana.2015.10.005%0Ahttp://www.biomedcentral.com/1471-2458/12/58%0Ahttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&P>
- Poveda, E., Dirigir, L., & Elpidia Poveda, D. (2013). Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. Whey, generalities and potential use as source of calcium from high bioavailability. *Revista Chilena de Nutrición*, 40(4), 397–403. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rchnut/v40n4/art11.pdf>
- Prazeres, A. R., Carvalho, F., & Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, 110, 48–68. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018>
- Priya, H., Prasanna, R., Ramakrishnan, B., Bidyarani, N., Babu, S., Thapa, S., & Renuka, N. (2015). Influence of cyanobacterial inoculation on the culturable microbiome and growth of rice. *Microbiological Research*, 171, 78–89. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.12.011>
- Queiroz, M. I., Vieira, J. G., & Maroneze, M. M. (2020). Morphophysiological, structural, and metabolic aspects of microalgae. In *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products* (Issue 1998). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818536-0.00002-6>
- Quian, L. (2018). Strategies to cultivate microalgae on eutrophic wastewater for nutrients recycling and biomass production. In *Energies* (Vol. 6, Issue 1). <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1120700020921110%0A>
- Radhakrishnan, B., Prasanna, R., Jaiswal, P., Nayak, S., & Dureja, P. (2009). Modulation of biocidal activity of *Calothrix* sp. and *Anabaena* sp. by environmental factors. *Biologia*, 64(5), 881–889. <https://doi.org/10.2478/s11756-009-0169-5>
- Rama, G. R., Kuhn, D., Beux, S., Maciel, M. J., & Volken de Souza, C. F. (2019). Potential applications of dairy whey for the production of lactic acid bacteria cultures. *International Dairy Journal*, 98, 25–37. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.06.012>
- Raman, R. ., & Mohamad, S. (2012). Astaxanthin production by freshwater microalgae *Chlorella sorokiniana* and marine microalgae *Tetraselmis* sp. *Ak J Biol Sci.*, 24, 1182–1186. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2012.1182.1186>
- Ramaraj, R., Unpaprom, Y., & Dussadee, N. (2016). Cultivation of Green Microalga, *Chlorella vulgaris* for Biogas Purification. *International Journal of New Technology and Research*, 2(3), 263569.

Ramli, N. M., Giatsis, C., Yusoff, F. M., Verreth, J., & Verdegem, M. (2018). Resistance and resilience of small-scale recirculating aquaculture systems (RAS) with or without algae to pH perturbation. *PLoS ONE*, *13*(4), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195862>

Ramli, N. M., Verdegem, M. C. J., Yusoff, F. M., Zulkifely, M. K., & Verreth, J. A. J. (2017). Removal of ammonium and nitrate in recirculating aquaculture systems by the epiphyte *Stigeoclonium nanum* immobilized in alginate beads. *Aquaculture Environment Interactions*, *9*(August), 213–222. <https://doi.org/10.3354/aei00225>

Ramos, P. A. R., Miranda, Y. S., De Cárdenas, L. M. Z., Ones, O. P., Milan, A. H., De Miguel, P. E., & Lombardi, A. T. (2016). Obtención de biomasa de microalga *Chlorella vulgaris* en un banco de prueba de fotobiorreactores de columna de burbujeo. *Afinidad*, *73*(574), 125–129.

Ravindran, R., & Rajauria, G. (2021). Carbohydrates derived from microalgae in the food industry. In *Cultured Microalgae for the Food Industry*. INC. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821080-2.00007-1>

Ribeiro, J. E. S., Martini, M., Altomonte, I., Salari, F., Nardoni, S., Sorce, C., Silva, F. L. H. da, & Andreucci, A. (2017). Production of *Chlorella protothecoides* biomass, chlorophyll and carotenoids using the dairy industry by-product scotta as a substrate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *11*, 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.07.007>

Ritambhara, Z., S., V., & Prasad H.K., K. M. (2019). Treatment and Recycling of Wastewater from Dairy Industry. In S. R. Singh R. (Ed.), *Advances in Biological Treatment of Industrial Waste Water and their Recycling for a Sustainable Future. Applied Environmental Science and Engineering for a Sustainable Future*. (pp. 91–115). Springer, Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-1468-1>

Romanenko, K. O., Kosakovskaya, I. V., & Romanenko, P. O. (2016). Phytohormones of microalgae: Biological role and involvement in the regulation of physiological processes. Pt II. Cytokinins and gibberellins. *International Journal on Algae*, *18*(2), 179–201. <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v18.i2.70>

Rumiantes. (2019). *Situación de la industria láctea en México: producción y comercialización*. RumiNews. <https://rumiantes.com/situacion-industria-lactea-mexico-produccion-comercializacion/>.

SADER. (2019). *Panorama de la leche en México*. <http://infosiap.siap.gob.mx/>.

Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *35*, 265–278. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>

Salati, S., D'Imporzano, G., Menin, B., Veronesi, D., Scaglia, B., Abbruscato, P., Mariani, P., & Adani, F. (2017). Mixotrophic cultivation of *Chlorella* for local

protein production using agro-food by-products. *Bioresource Technology*, 230, 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.030>

Scharff, C., Domurath, N., Wensch-Dorendorf, M., & Schröder, F. G. (2017). Effect of different photoperiods on the biochemical profile of the green algae *C. vulgaris* and *S. obliquus*. *Acta Horticulturae*, 1170, 1149–1156. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1170.148>

Shalini, S., Dhar, D. W., & Gupta, R. K. (2009). Morphological and physicochemical characterisation of *Calothrix* strains. *Acta Botanica Hungarica*, 51(1–2), 195–216. <https://doi.org/10.1556/ABot.51.2009.1-2.19>

Shi, T. Q., Wang, L. R., Zhang, Z. X., Sun, X. M., & Huang, H. (2020). Stresses as First-Line Tools for Enhancing Lipid and Carotenoid Production in Microalgae. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(July), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00610>

SIAP-SAGARPA. (2019). *Boletín de Leche*. 72.

Singh, A. K., & Pandey, A. K. (2019). Potential Biotechnological Applications of Microalgae Grown in Wastewater: A Holistic Approach. In A. K. Gupta & F. Bux (Eds.), *Application of Microalgae in wastewater treatment* (pp. 237–238). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-13909-4>.

Slavov, A. K. (2017). General characteristics and treatment possibilities of dairy wastewater -a review. *Food Technology and Biotechnology*, 55(1), 14–28. <https://doi.org/10.17113/ft b.55.01.17.4520>

Stanier, R., Kunisawa, R., Mandel, M., & Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order *Chroococcales*). *Bacteriological Reviews*, 35, 171–205.

Stirk, W. A., Ordog, V., Novák, O., Rolčik, J., Strnad, M., Balint, P., & van Staden, J. (2013). Auxin and cytokinin relationships in twenty-four microalgae strains. *Journal of Phycology*, 49(3), 459–467. <https://doi.org/10.1111/jpy.12061-12-156>

Tejeda-Benítez, L., Henao-Argumedo, D., Alvear-Alayón, M., & Castillo-Saldarriaga, C. R. (2015). Characterization and lipid profile of oil from microalgae. Caracterização e perfil lipídico de azeites de microalgas. *Revista Facultad de Ingeniería (Fac. Ing.)*, Mayo-Agosto, 24(39), 43–54. <https://www.redalyc.org/pdf/4139/413940776005.pdf>

Toribio, A. J., Suárez-Estrella, F., Jurado, M. M., López, M. J., López-González, J. A., & Moreno, J. (2020). Prospection of cyanobacteria producing bioactive substances and their application as potential phytostimulating agents. *Biotechnology Reports*, 26. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00449>

Tsolcha, O. N., Tekerlekopoulou, A. G., Akrotos, C. S., Bellou, S., Aggelis, G., Katsiapi, M., Moustaka-Gouni, M., & Vayenas, D. V. (2016). Treatment of second cheese whey effluents using a *Choricystis*-based system with

- simultaneous lipid production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91(8), 2349–2359. <https://doi.org/10.1002/jctb.4829>
- Ummalyma, S. B., & Sukumaran, R. K. (2014). Cultivation of microalgae in dairy effluent for oil production and removal of organic pollution load. *Bioresource Technology*, 165(C), 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.028>
- Valencia, E., & Ramírez, L. (2009). La industria de la leche y la contaminación del agua. *Revista Elementos*, 73, 27–31. <http://www.elementos.buap.mx/num73/pdf/27.pdf>
- Varela, J. C., Pereira, H., Vila, M., & León, R. (2015). Production of carotenoids by microalgae: Achievements and challenges. *Photosynthesis Research*, 125(3), 423–436. <https://doi.org/10.1007/s1120-015-0149-2>
- Velasco-Flores, Y. L., Rodríguez-Rosales, M. D. J., De la Peña-Arellano, L. A., & Martínez-Roldán, A. de J. (2018). Caracterización del crecimiento y contenido de lípidos de *Stigeoclonium nanum*. *October*, 170.
- Wang, F., Gao, B., Su, M., Dai, C., Huang, L., & Zhang, C. (2019). Integrated biorefinery strategy for tofu wastewater biotransformation and biomass valorization with the filamentous microalga *Tribonema minus*. *Bioresource Technology*, 292(August), 121938. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121938>
- Wang, S. K., Wang, X., Miao, J., & Tian, Y. T. (2018). Tofu whey wastewater is a promising basal medium for microalgae culture. *Bioresource Technology*, 253(December 2017), 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.012>
- Wellburn, A. R. (1994). The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 307–313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
- Yun, C. J., Hwang, K. O., Han, S. S., & Ri, H. G. (2019). The effect of salinity stress on the biofuel production potential of freshwater microalgae *Chlorella vulgaris* YH703. *Biomass and Bioenergy*, 127(February), 105277. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105277>
- Zhang, J. Z., & Fischer, C. J. (2006). A simplified resorcinol method for direct spectrophotometric determination of nitrate in seawater. *Marine Chemistry*, 99(1–4), 220–226. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2005.09.008>
- Zotta, T., Solieri, L., Iacumin, L., Picozzi, C., & Gullo, M. (2020). Valorization of cheese whey using microbial fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(7), 2749–2764. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10408-2>

10. ANEXOS

10.1 Anexo 1. Medio mineral BG-11

Stocks	Por litro
1) NaNO ₃	1.5 g
	Por 500 mL
2) K ₂ HPO ₄	2.00 g
3) MgSO ₄ *7H ₂ O	3.75 g
4) CaCl*2H ₂ O	1.80 g
5) Ácido cítrico	0.30 g
6) Citrato férrico de amonio verde	0.30 g
7) EDTANa ₂	0.05 g
8) Na ₂ CO ₃	1.00 g
	Por litro
9) Solución de trazas metálicas:	Por litro
H ₃ BO ₃	2.86 g
MnCl ₂ *4H ₂ O	1.81 g
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0.22 g
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0.39 g
CuSO ₄ *5H ₂ O	0.08 g
Co (NO ₃) ₂ *6H ₂ O	0.05 g
Medio	Por litro
Solución Stock 2-8	10.0 mL c/u
Solución Stock 9	1.0 mL

Prepararse con 1 L de agua desionizada. Ajustar pH a 7.1 con NaOH 1M o HCL.

10.2 Anexo 2. Medio mineral Basal Bold

Stocks

Por 400 mL

1) NaNO ₃	10.0 g
2) MgSO ₄ *7H ₂ O	3.0 g
3) NaCl	1.0 g
4) K ₂ HPO ₄	3.0 g
5) KH ₂ PO ₄	7.0 g
6) CaCl*2H ₂ O	1.0 g

7) Solución de elementos traza (utilizar autoclave p/disolver)

Por litro

ZnSO ₄ *7H ₂ O	8.82 g
MnCl ₂ *4H ₂ O	1.44 g
MoO ₃	0.71 g
CuSO ₄ *5H ₂ O	1.57 g
Co (NO ₃) ₂ *6H ₂ O	0.49 g
8) H ₃ BO ₃	11.42 g
9) EDTA	50.0 g
KOH	31.0 g
10) FeSO ₄ *7H ₂ O	4.98 g
H ₂ SO ₄ (conc.)	1.0 mL

Medio

Por litro

Soluciones Stock 1-6	10.0 mL c/u
Soluciones Stock 7-10	1.0 mL c/u

Prepararse con 1 L de agua desionizada.

10.3 Anexo 3. Cuantificación de nitrógeno de nitrato (N-NO₃): Método del resorcinol.

Reactivos

1. Solución patrón de nitrógeno 1 mM (0.1016 g de nitrato de potasio aforado a 1 L con agua destilada). La sal debe ser secada por una hora a 105 °C.
2. Solución 2% de resorcinol (2 gr de resorcinol aforado a 100 mL con agua destilada. Este reactivo se prepara diariamente).
3. Solución de NaCl al 10% (Pesar 10 gr y aforar a 100 mL con agua destilada).
4. Ácido sulfúrico concentrado.

Método

1. Adicionar la muestra a un tubo con tapa hermética.
2. Agregar la solución de NaCl.
3. Agregar la alícuota de la solución de resorcinol.
4. Agitar vigorosamente.
5. Cuidadosamente agregar el ácido sulfúrico concentrado y cerrar el tubo.
6. Agitar vigorosamente y dejar reposar en la oscuridad por 30 min.
7. Agregar agua y agitar.
8. Una vez a temperatura ambiente, leer la absorbancia a 505 nm.

Curva patrón (0.0-1.0 mM)

Problema	
Reactivos	Volumen (mL)
Muestra	1.25
NaCl	0.50
Resorcinol	0.30
Ácido sulfúrico	1.25
Agua	3.00

10.4 Anexo 4. Cuantificación de fósforo inorgánico (Pi): Método modificado de Taussky y Shorr (González *et al.* 2000)

Reactivos

1. Sol. Molibdato de amonio al 16% en H₂SO₄ 10 N.
2. Reactivo de color: Preparar cada vez que se utilice. Mezclar 4 mL de molibdato de amonio al 16% en H₂SO₄ 10 N, 36 mL de agua desionizada y 2 g de FeSO₄·7H₂O.
3. Ácido tricloroacético (TCA) 0.5 N
4. Solución patrón de KH₂PO₄ 1mM

Procedimiento

1. A la muestra que contiene hasta 0.7 μmoles de Pi, agregar TCA 0.5 N hasta que el volumen sea de 2 mL y mezclar.
2. Agregar 1 mL de reactivo de color y mezclar.
3. Preparar blanco de reactivo con 2 mL de TCA 0.5N y 1 mL de reactivo de color.
4. Dejar reposar en obscuridad durante 10 min, leer la absorbancia a 660 nm. El color es estable 30 min a temperatura ambiente.

Problema	
Reactivos	Volumen (mL)
Muestra	1
TCA 0.5N	1
Reactivo de color	1

10.5 Anexo 5. Nitrógeno amoniacal. Método del Fenato. Standard Methods: (4500-Nitrogeno (Amonio)).

Solución para curva patrón

1. **Solución madre de N-NH₃ (1 g/L).** Pesar 3.819 g NH₄Cl previamente secado por 24 hrs y aforar a 1 L con agua destilada.
2. **Solución patrón de N-NH₃ (2 mg/L).** Dilución 1:400 de la solución madre (1 mL = 2 µg N-NH₃). Mantener en refrigeración. Es estable por 3 meses.

Reactivos:

1. **Solución de Fenol.** Pesar 11.1 g de Fenol y aforar a 100 mL con alcohol etílico al 96%. Es estable por 1 mes.
2. **Solución de nitroprusiato de sodio.** Pesar 0.5 g de nitroprusiato de sodio y aforar con agua destilada a 100 mL, mantener en botella ámbar. Es estable por 1 mes.
3. **Solución alcalina de citrato.** Pesar 20 g de citrato tri-sódico y aforar con agua destilada a con agua destilada.
4. **Solución de hipoclorito de sodio.** Preparar una solución al 5% de hipoclorito comercial (Cloralex) con agua destilada. Es estable por 2 meses.
5. **Solución oxidante.** Tomar 100 mL de la solución alcalina de citrato y mezclarla con 2.5 mL de solución de hipoclorito de sodio. Debe prepararse diario.

Problema (mL)	
Muestra	0.20
Agua	2.30
Fenol	0.10
Nitroprusiato	0.10
Oxidante	0.25

Incubar tubos a temperatura ambiente por 30 min

Tomar lectura de absorbancia a 640 nm.

10.6 Anexo 6. Pigmentos fotosintéticos

1. Centrifugar un volumen conocido de cultivo. En el caso de cultivos densos 5 mL son suficientes. En caso de cultivos que no sedimenten bien, se puede filtrar la muestra y trabajar con el filtro y la biomasa retenida pasando directamente al paso 4.
2. Centrifugar por 7 min a 3600 rpm.
3. Descartar el sobrenadante cuidando no perder biomasa.
4. Adicionar un volumen conocido de metanol, normalmente se emplean los mismos mililitros que se centrifugaron.
5. Colocar en baño maría o termo-bloque por 10 min a 100°C. Algunas cepas requieren ruptura celular por medios físicos para favorecer la atracción (perlas de vidrio, sonicador, etc.).
6. Enfriar en el chorro de agua.
7. Centrifugar la muestra por 7 min a 3600 rpm.
8. Retirar cuidadosamente el sobrenadante colocándolo en una probeta.
9. Adicionar metanol hasta alcanzar un volumen fijo o que el color verde de la muestra no sea muy oscuro. Cultivos muy densos pueden requerir que se añada a 10 mL.
10. Vaciar el contenido de la probeta en una celda para espectrofotómetro y leer absorbancia a 666, 653 y 470 nm usando metanol para aclarar.
11. Calcular la concentración de Clorofilas a y b y carotenoides con las siguientes ecuaciones:

$$\text{Clorofila } a = (15.65 * A_{666}) - (7.34 * A_{653})$$

$$\text{Clorofila } b = (27.05 * A_{653}) - (11.21 * A_{666})$$

$$\text{Clorofila total} = (\text{Clorofila } a) + (\text{Clorofila } b)$$

$$\text{Carotenoides} = \frac{(1000 * A_{470}) - (2.86 * \text{Clorofila } a) - (129.2 * \text{Clorofila } b)}{221}$$

10.7 Anexo 7. Cuantificación de Carbohidratos Totales: Método modificado de Dubois

1. Solución patrón de Dextrosa 150 mg L⁻¹ (Pesar 150 mg y aforar a 1 L con agua destilada).
2. Solución de fenol al 5% (Pesar 5 gramos y aforar a 100 mL). Es estable por 6 meses.
3. Ácido sulfúrico concentrado (98% o 18.4 M).

Método

1. A 1 mL de una muestra con concentración de hasta 250 mg L⁻¹ adicionar 1 mL de agua destilada
2. Adicionar 1 mL de solución de fenol, cerrar y agitar.
3. Adicionar 5 mL de ácido sulfúrico con mucho cuidado y en campana ya que el tubo eleva su temperatura.
4. Cerrar el tubo y agitar invirtiéndolo varias veces.
5. A los 30 min, leer absorbancia a 490 nm.

Problema	
Reactivos (mL)	Volumen
Muestra	1.0
Agua destilada	1.0
Fenol 5%	1.0
H ₂ SO ₄	5.0

10.8 Anexo 8. Determinación de Proteínas Totales por Lowry

1. Solución 1 M de NaOH (4 gr en 100 mL de agua)
2. Reactivo A. Solución 2% de Na₂CO₃ en NaOH 0.1 M (20 gr de Na₂CO₃ + 4 gr de NaOH aforado a 1 L con agua destilada)
3. Reactivo B1. Solución 2% de Tartrato de Sodio Potasio (2 gr de tartrato aforado a 100 mL con agua destilada)
4. Reactivo B2. Solución 1% de CuSO₄*5H₂O (1 gr de sulfato de aforado a 100 mL con agua destilada)
5. Patrón de Albumina de Suero Bovino o Huevo 2 g L⁻¹ (200 mg aforados a 100 mL con agua destilada)
6. Reactivo de Folin-Ciocalteu, dilución 1 a 4 del reactivo comercial (10 mL de reactivo aforados a 40 mL con agua destilada)
7. Reactivo C. Reactivos A, B1 y B2 en proporción 100:1:1 (100 mL de A + 1 mL de B1 + 1 mL de B2)

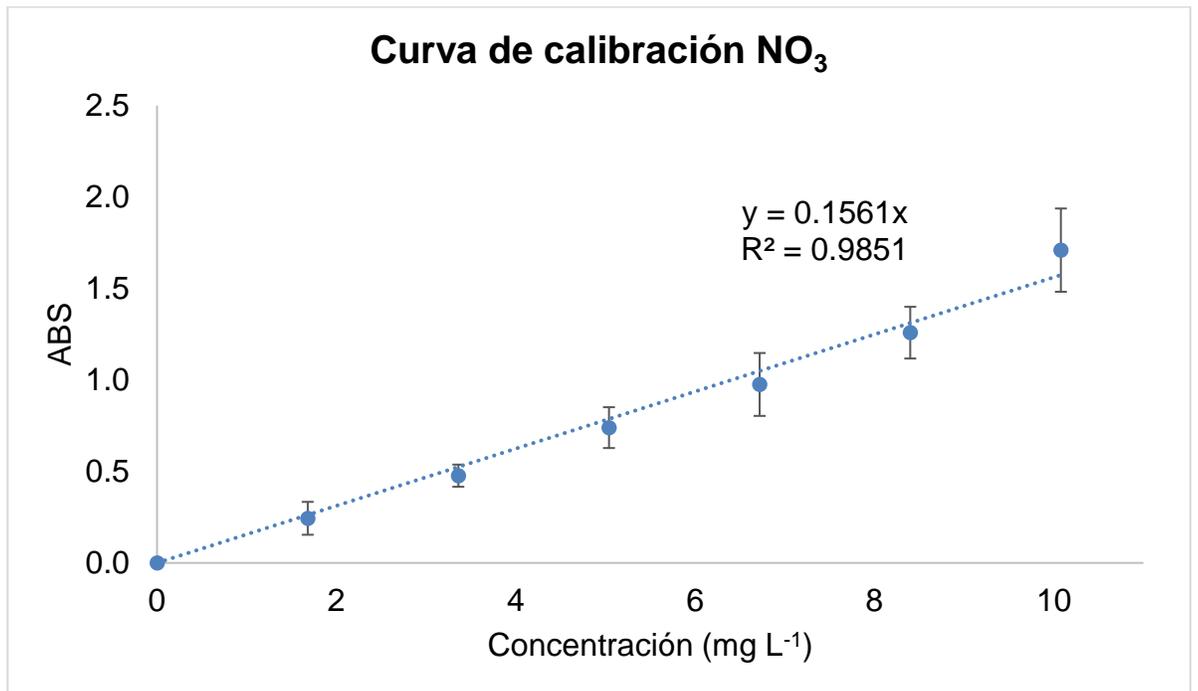
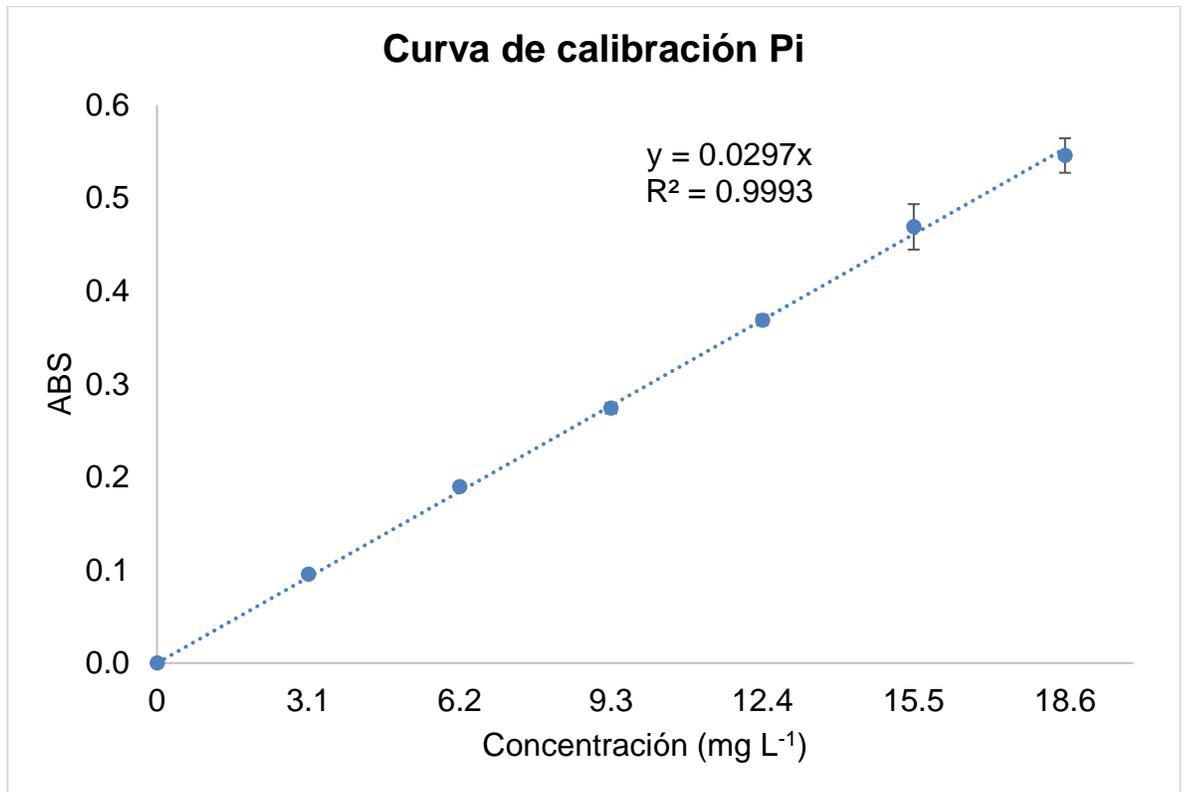
Procedimiento

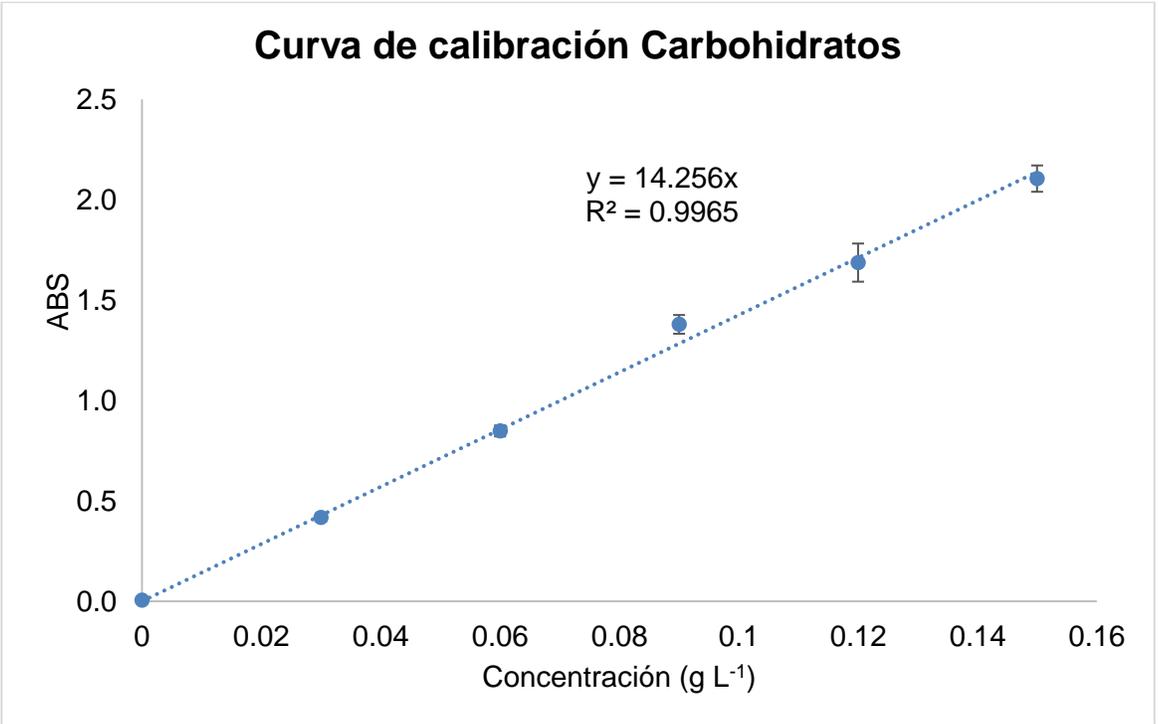
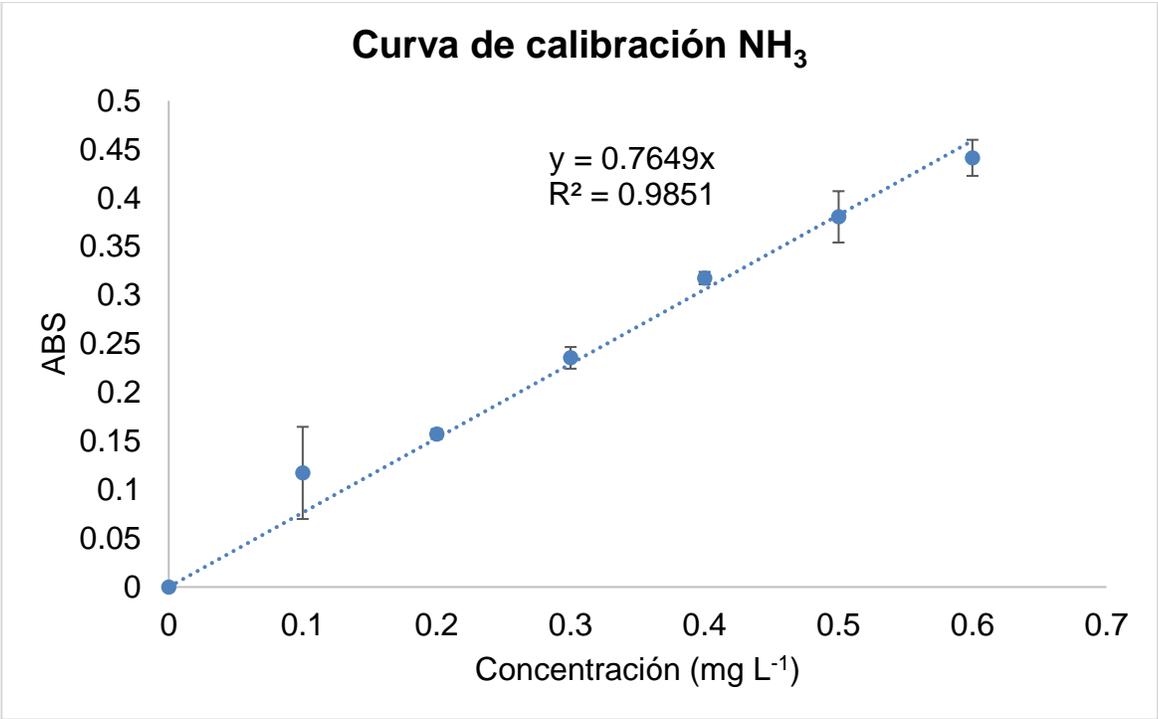
1. Digerir la muestra con NaOH 1 M en baño María por 5 min y dejar enfriar.
2. Agregar el Reactivo C y dejar reposar por 10 min.
3. Agregar el Folin-Ciocalteu y dejar reposar por 30 min a la oscuridad.
4. Leer absorbancia a 750 nm.

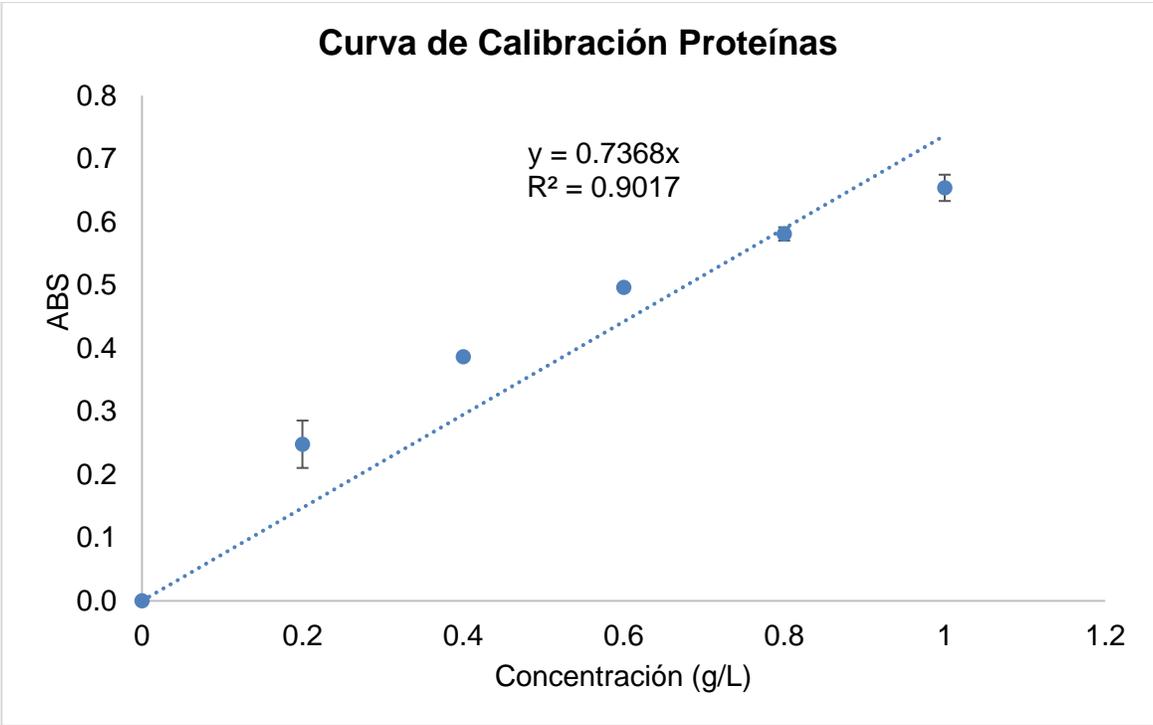
Reactivo	Problema
Muestra	1 mL
NaOH 1M	1 mL
Reactivo C	5 mL
Folin-Ciocalteu	1 mL

Muestras con hasta 1 mg L⁻¹ de proteína

10.9 Anexo 9. Curvas de calibración de fosfatos, nitratos, amoniaco, carbohidratos y proteínas.







10.10 Anexo 10. Cálculo de Clorofilas específicas

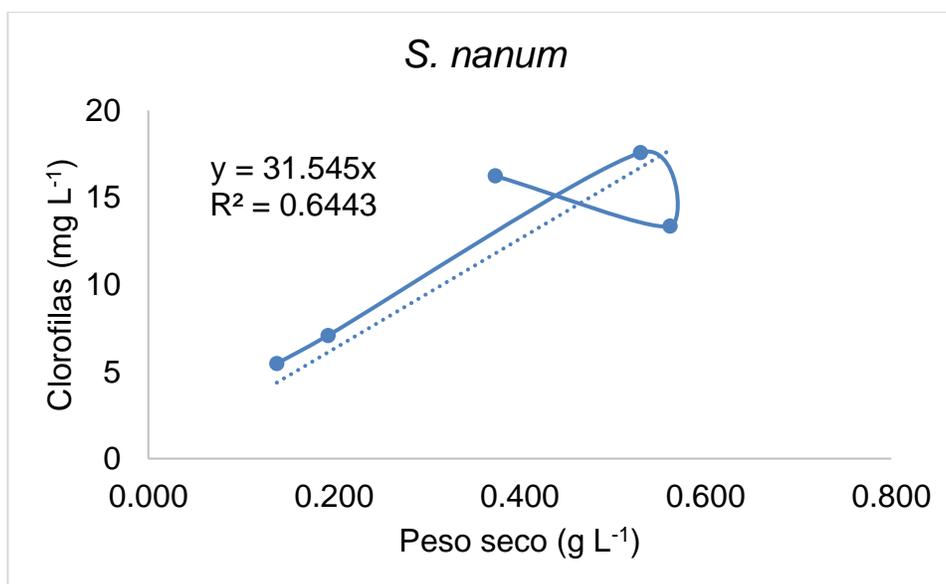
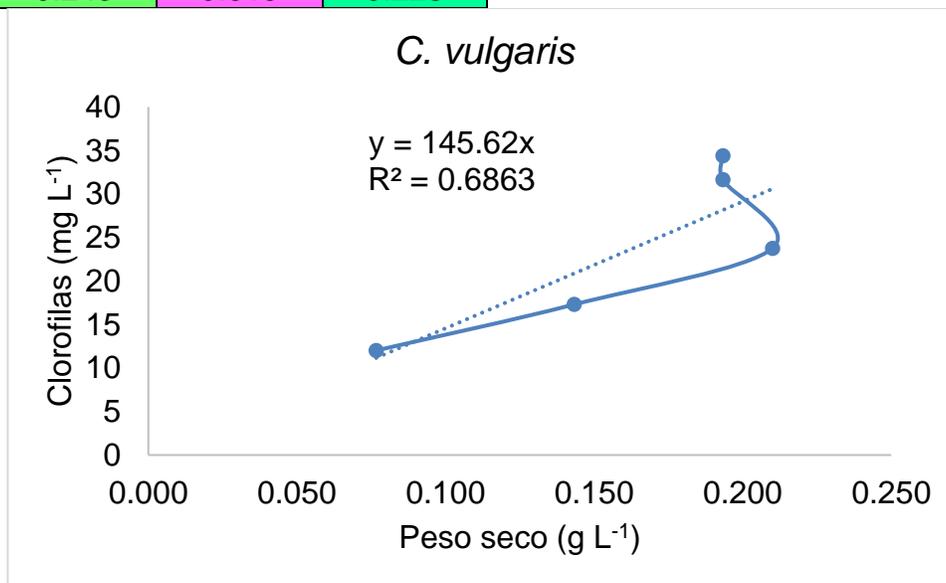
Peso seco en medio mineral

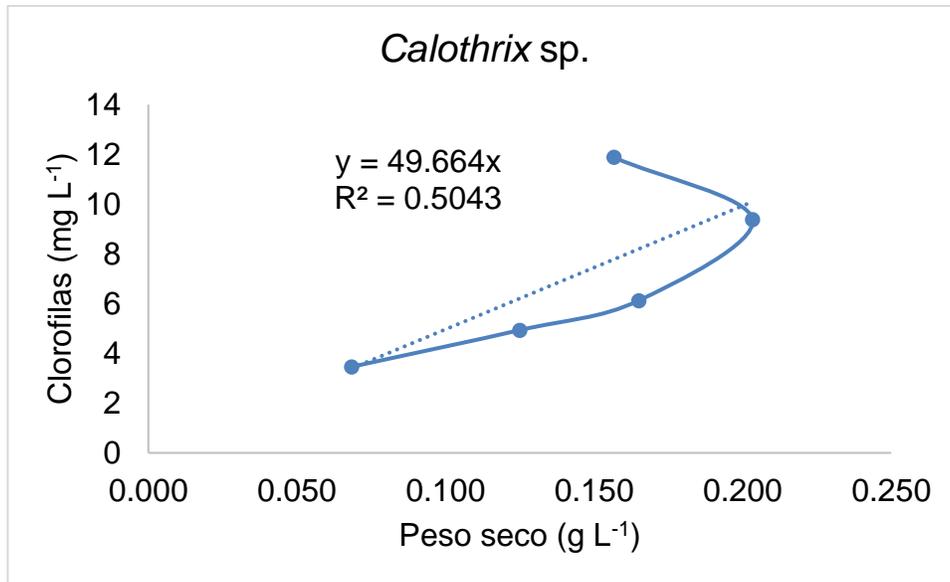
BG-11

C. vulgaris	S. nanum	Calothrix sp.
0.077	0.138	0.068
0.143	0.193	0.125
0.210	0.530	0.165
0.193	0.562	0.203
0.193	0.373	0.157
0.243	0.615	0.228

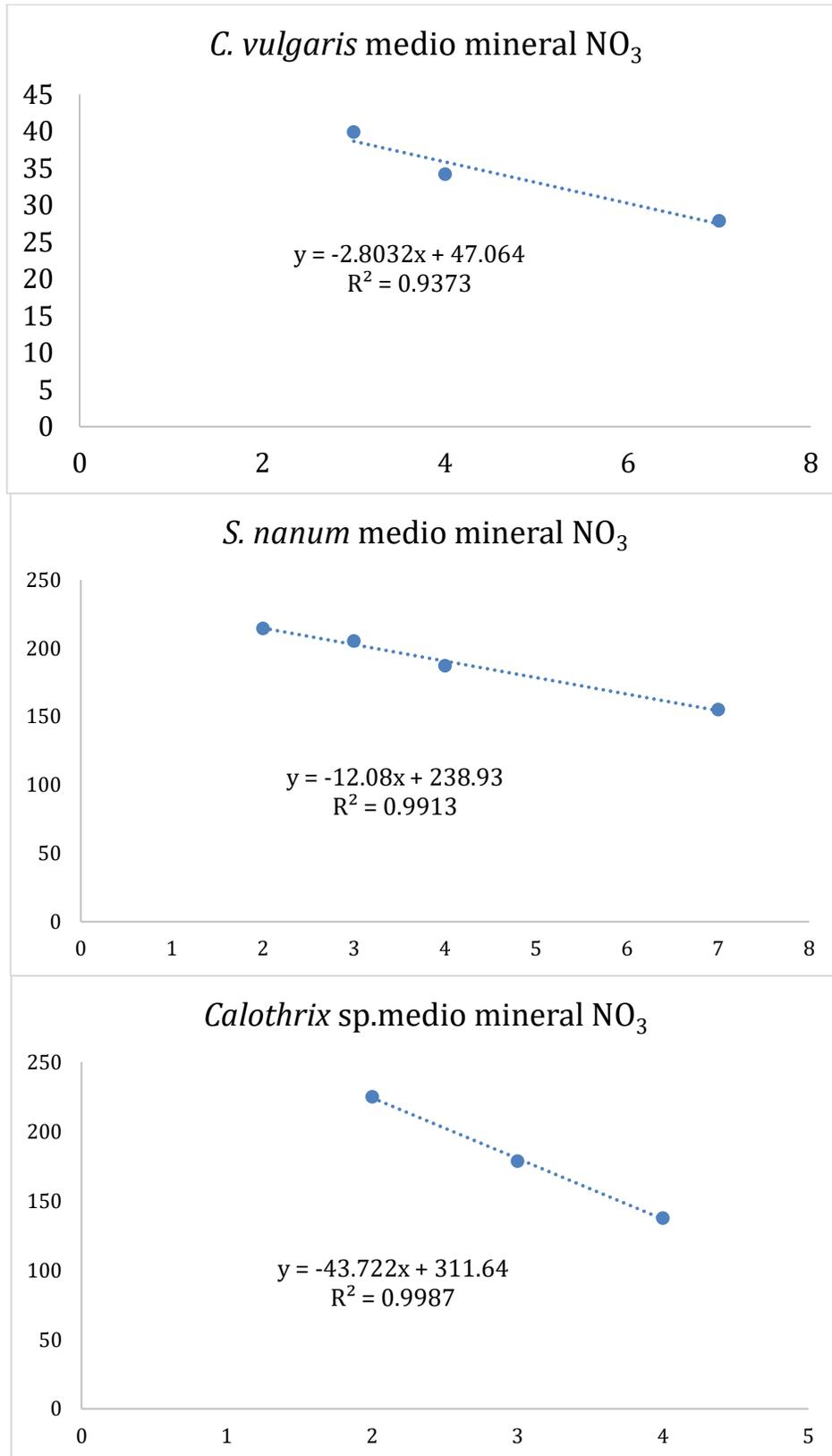
Clorofilas lactosuero

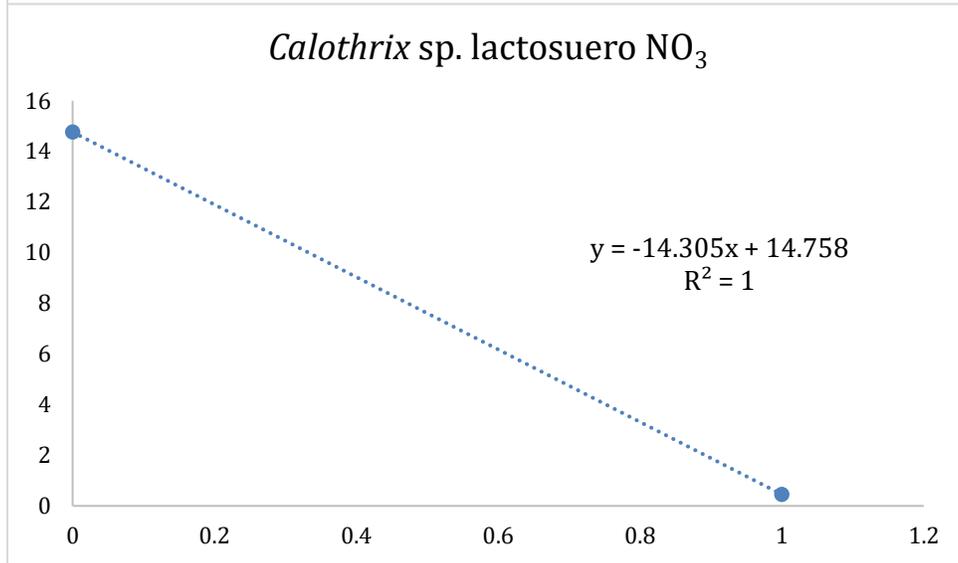
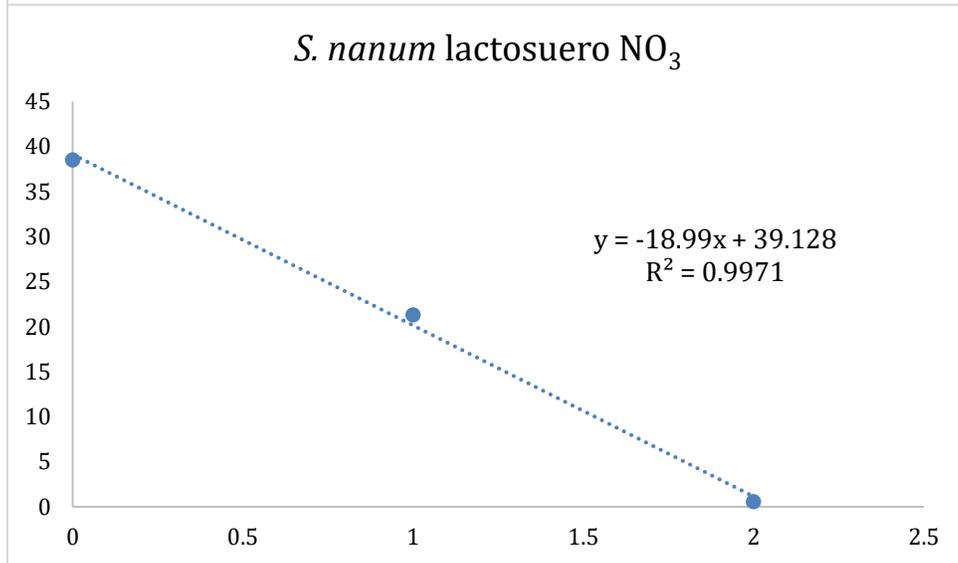
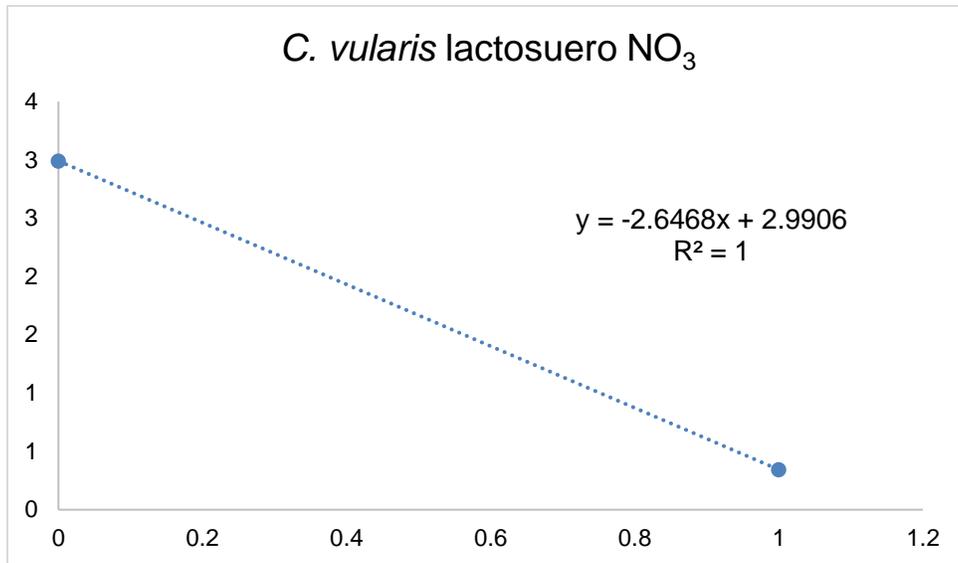
C. vulgaris	S. nanum	Calothrix sp.
12.014	5.463	3.460
17.307	7.071	4.935
23.745	17.572	6.122
31.637	13.344	9.378
34.400	16.236	11.884

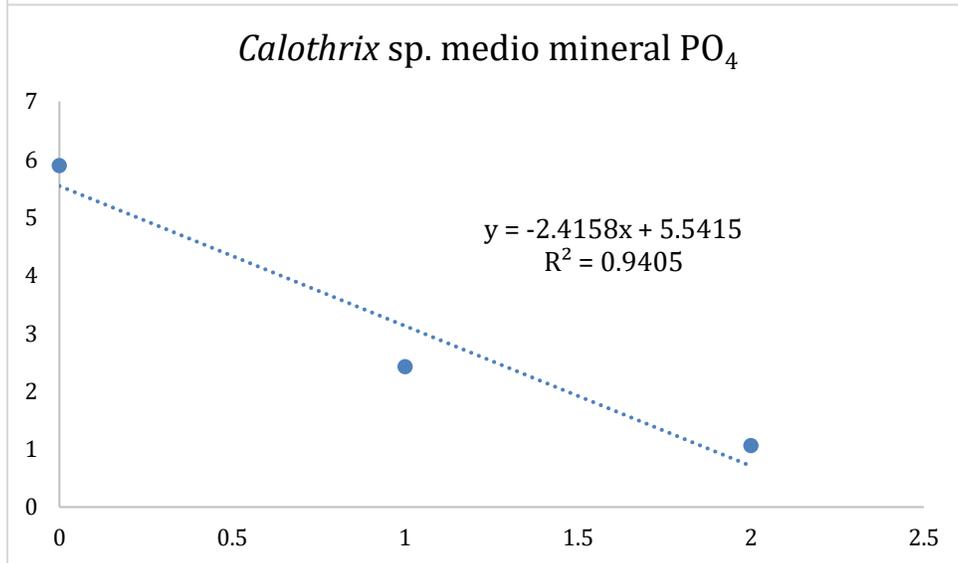
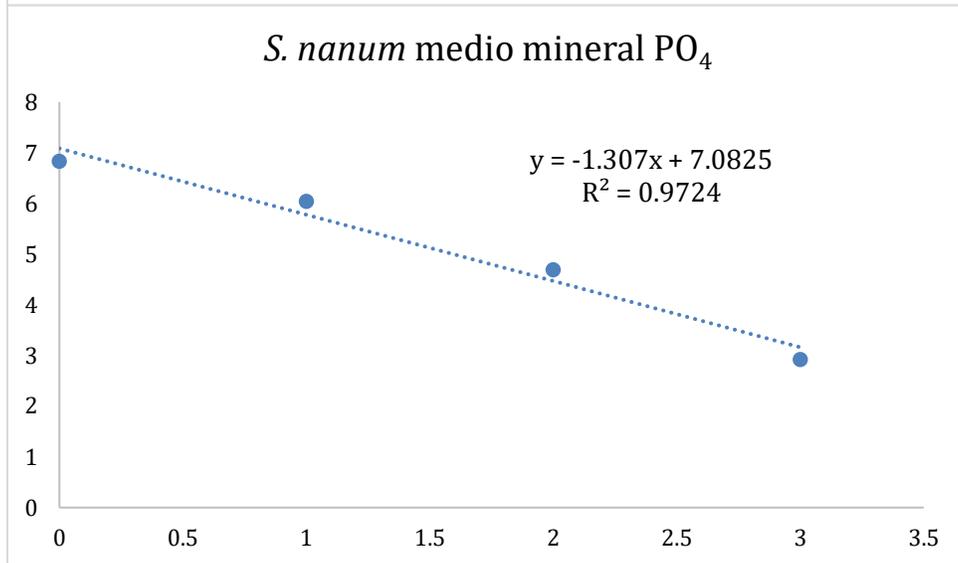
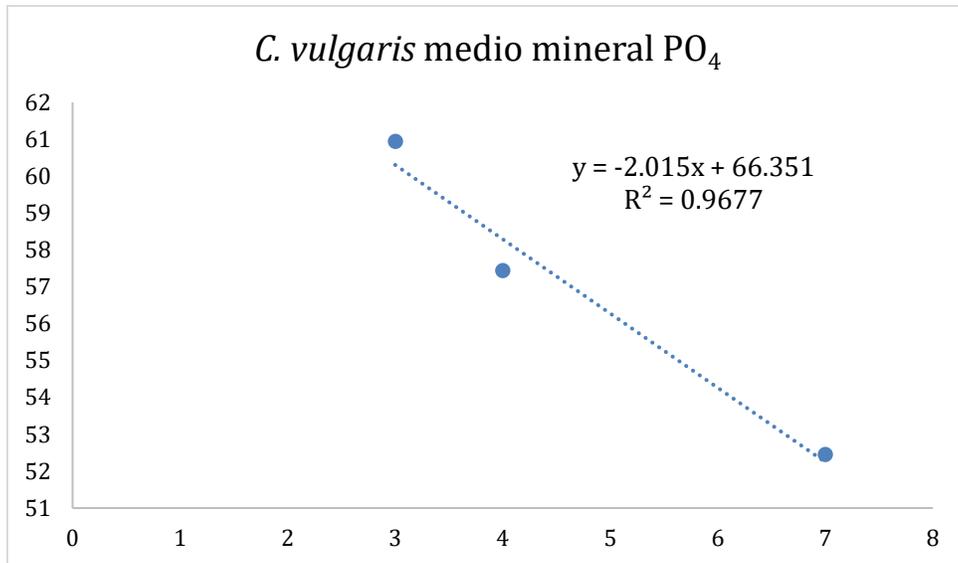


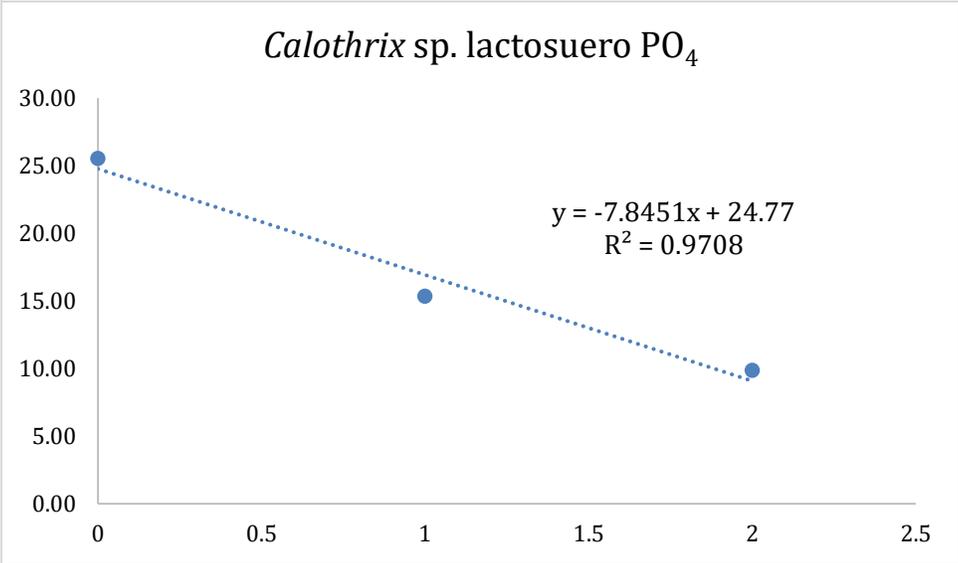
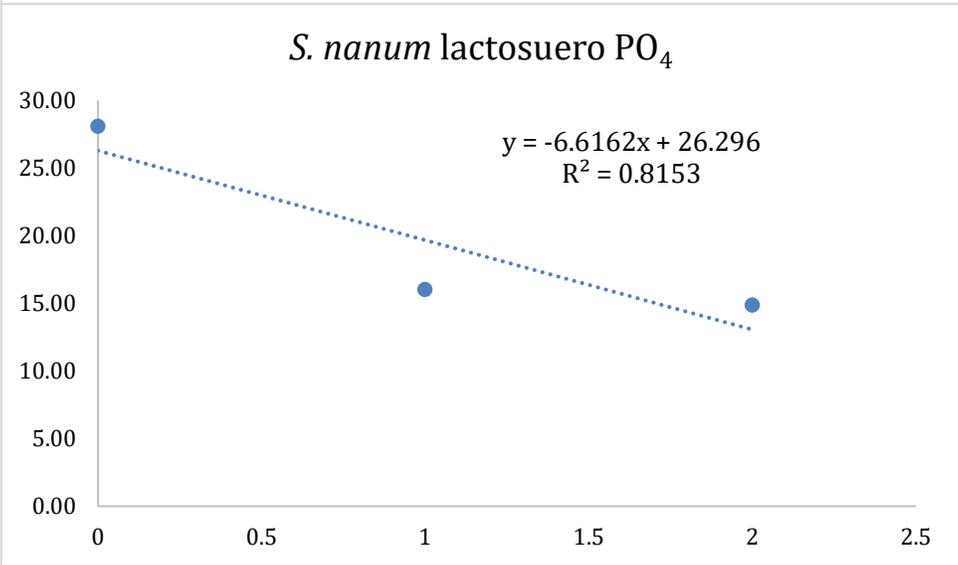
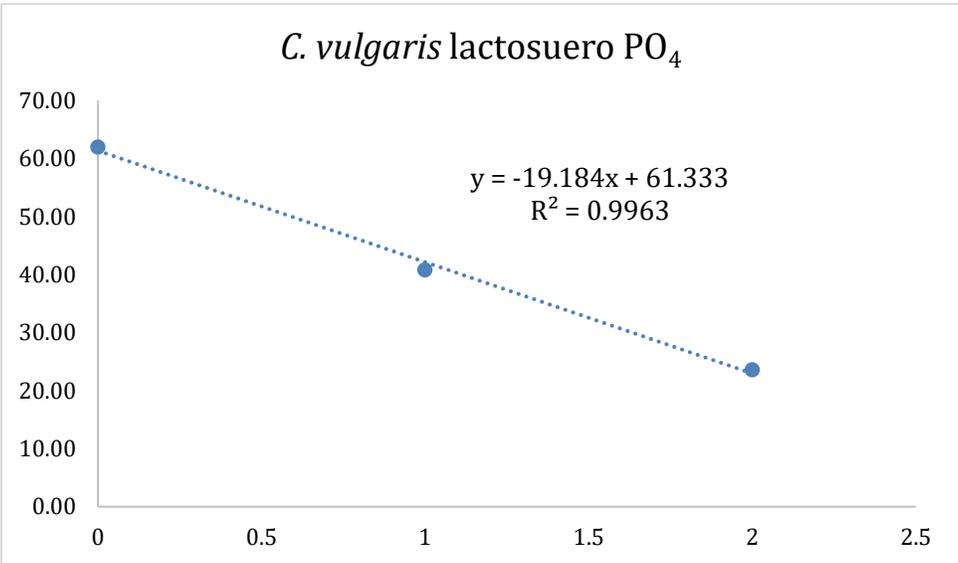


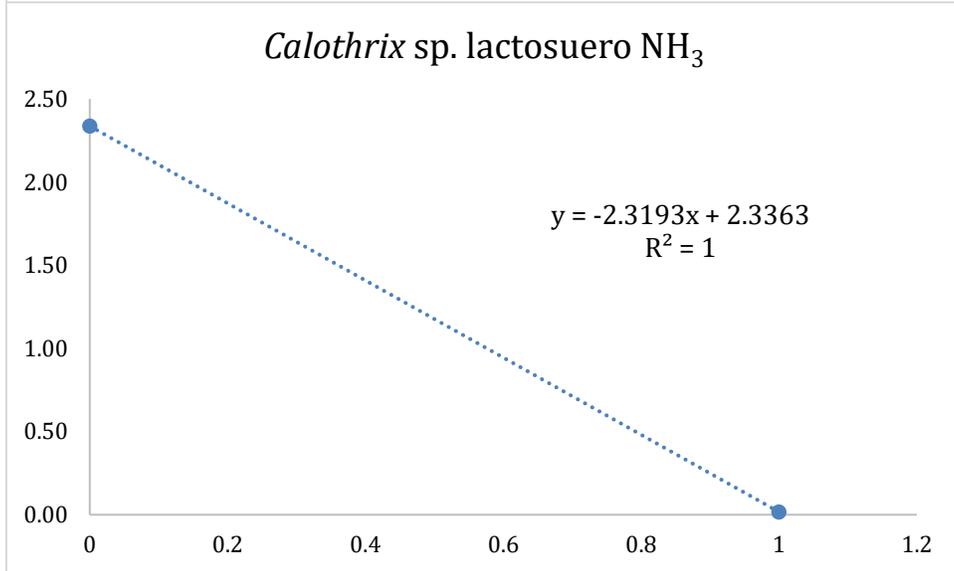
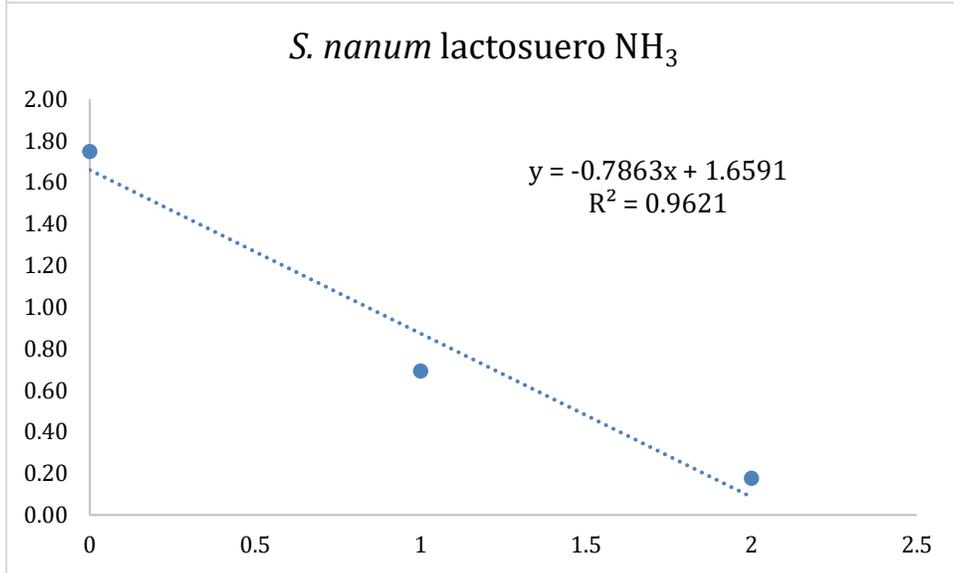
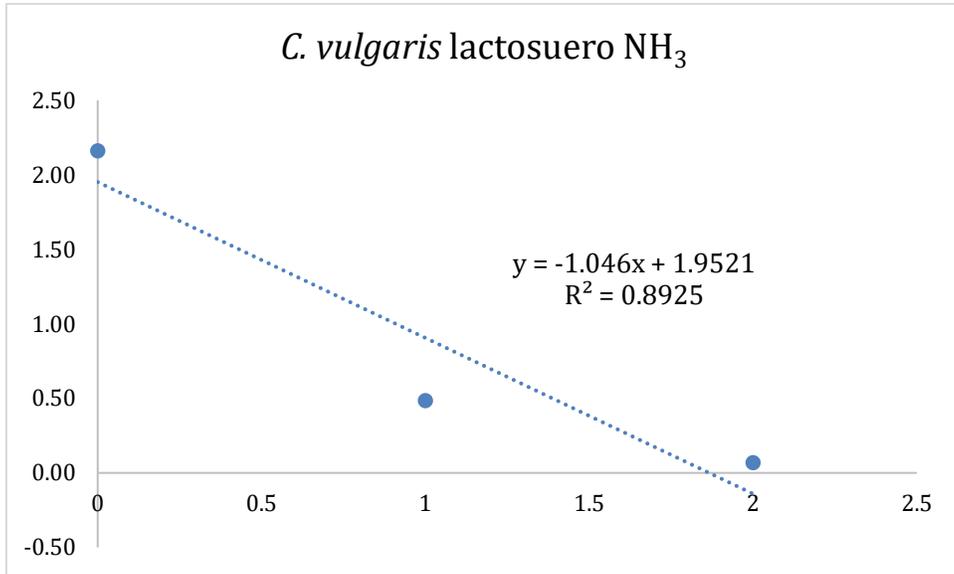
10.11 Anexo 11. Cálculo de velocidades de consumo NO₃, PO₄ y NH₃



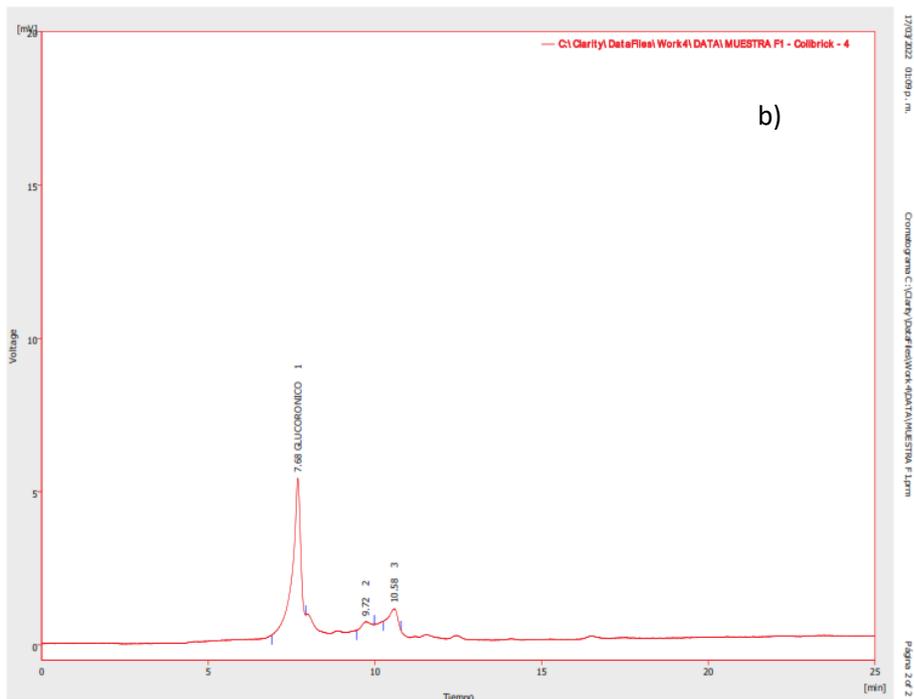
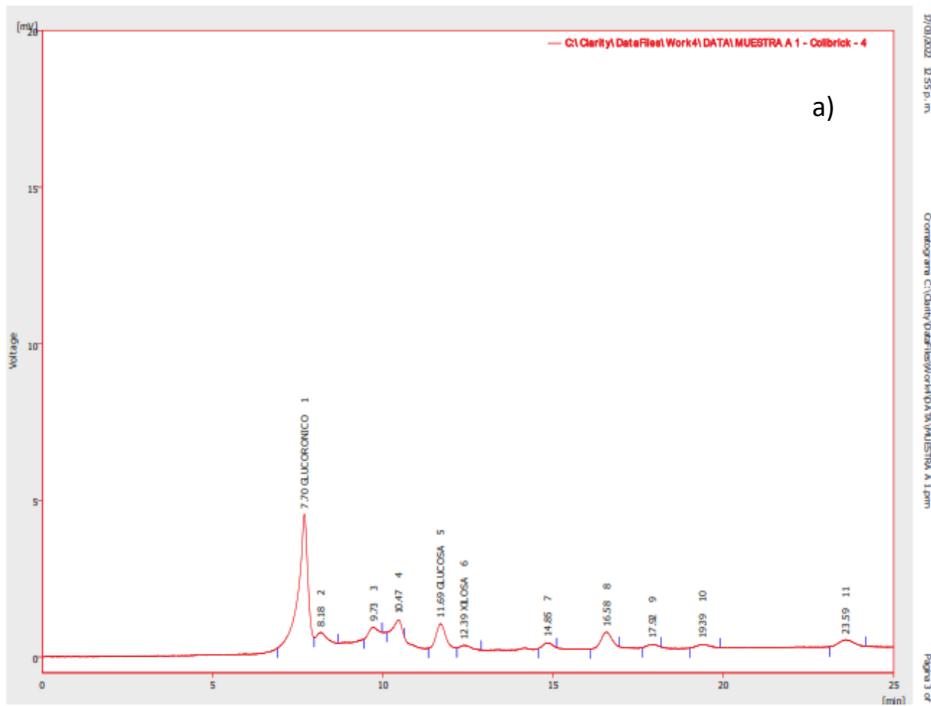




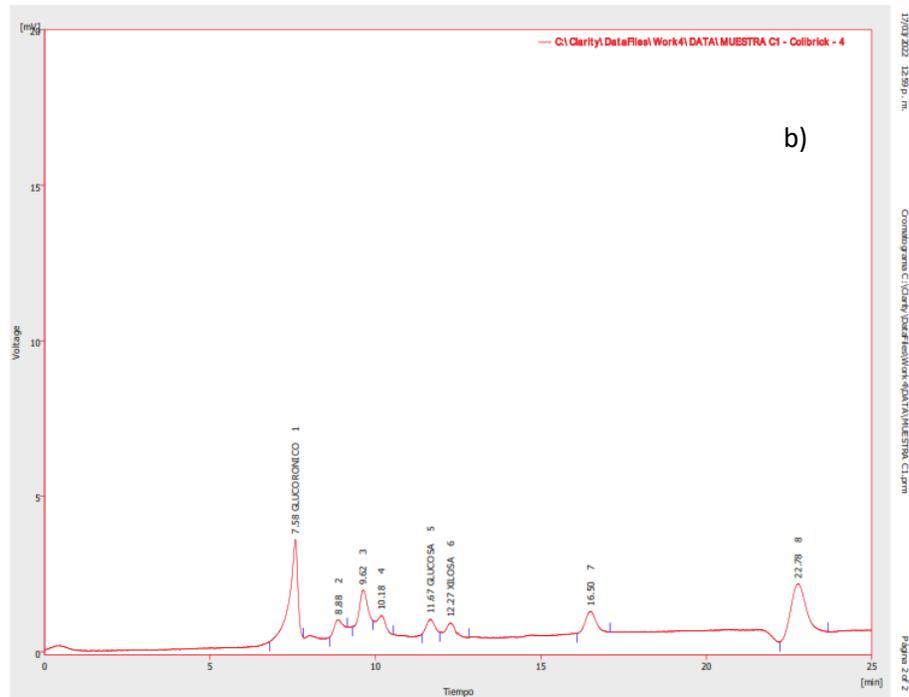
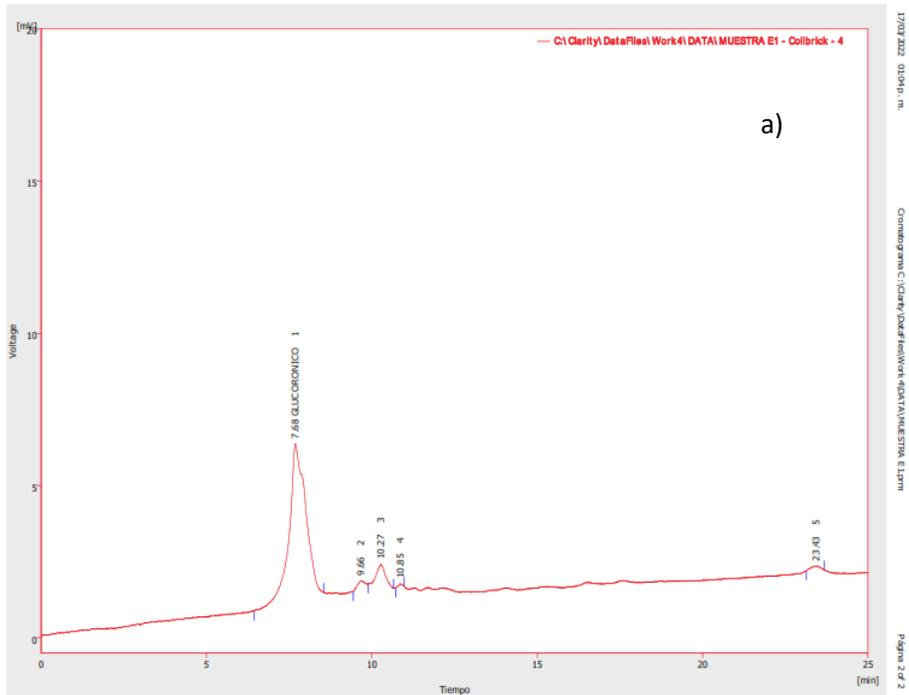




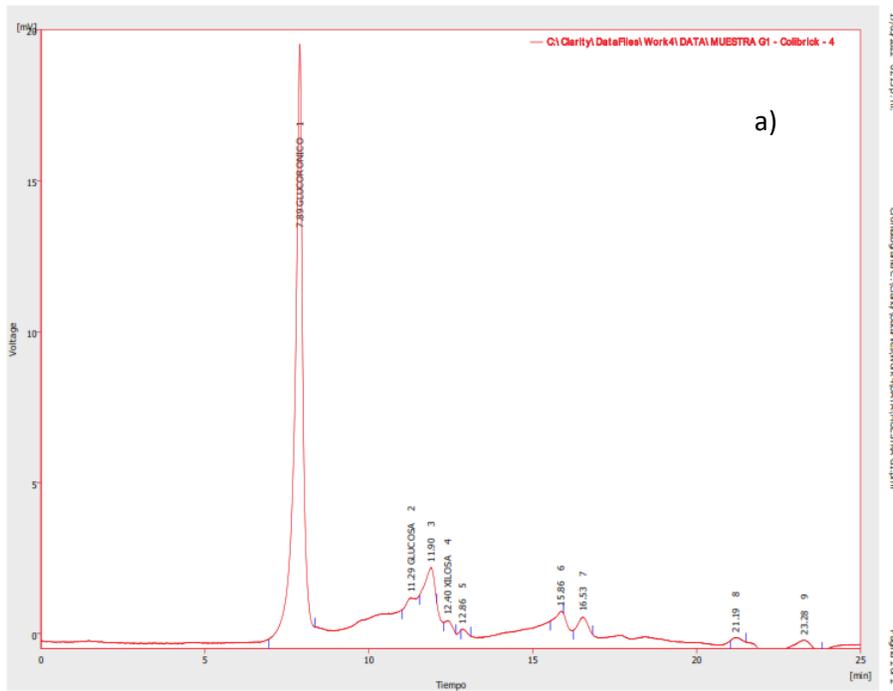
10.12 Anexo 12. Cromatogramas de carbohidratos



Cromatograma de monosacáridos de *Calothrix* sp. en a) lactosuero y b) medio mineral.



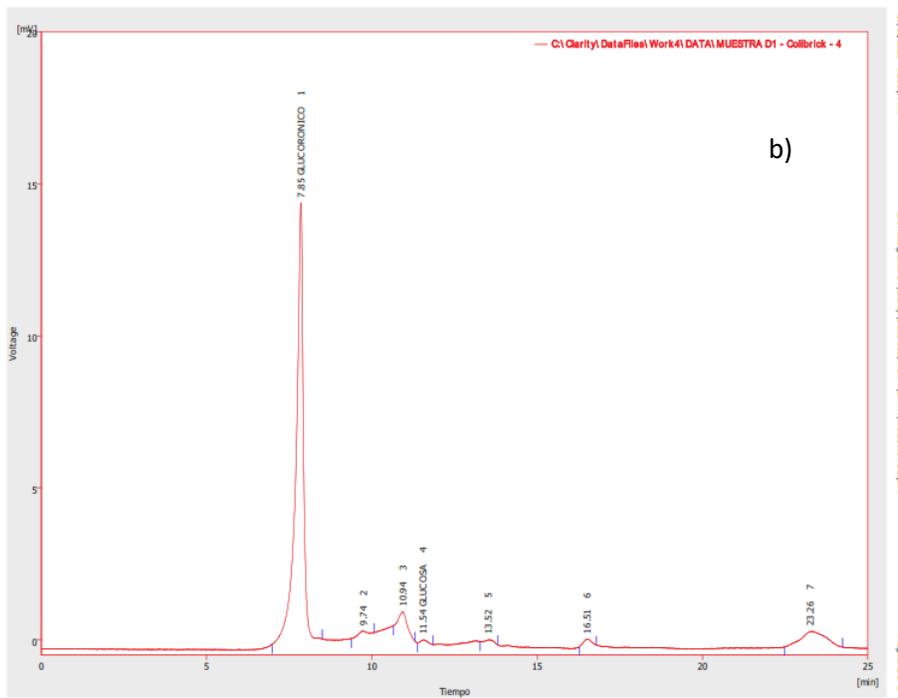
Cromatograma de monosacáridos de *Chlorella vulgaris* en a) lactosuero y b) medio mineral.



17/03/2022 08:13 p.m.

Cromatograma C:\Clarity\DataFiles\Work\41\DATA\MUESTRA G1.m

Página 2 de 2



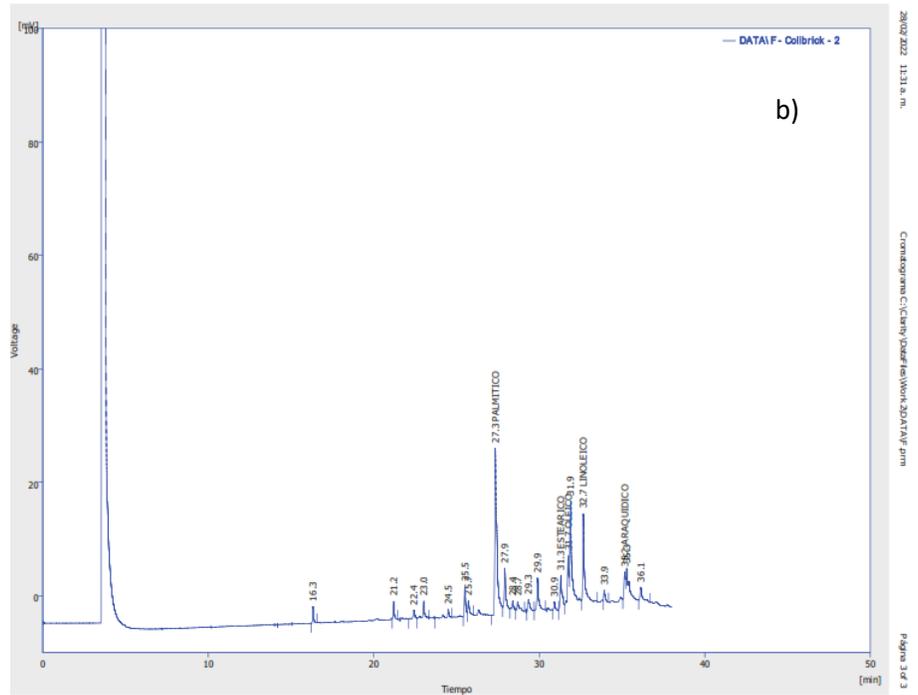
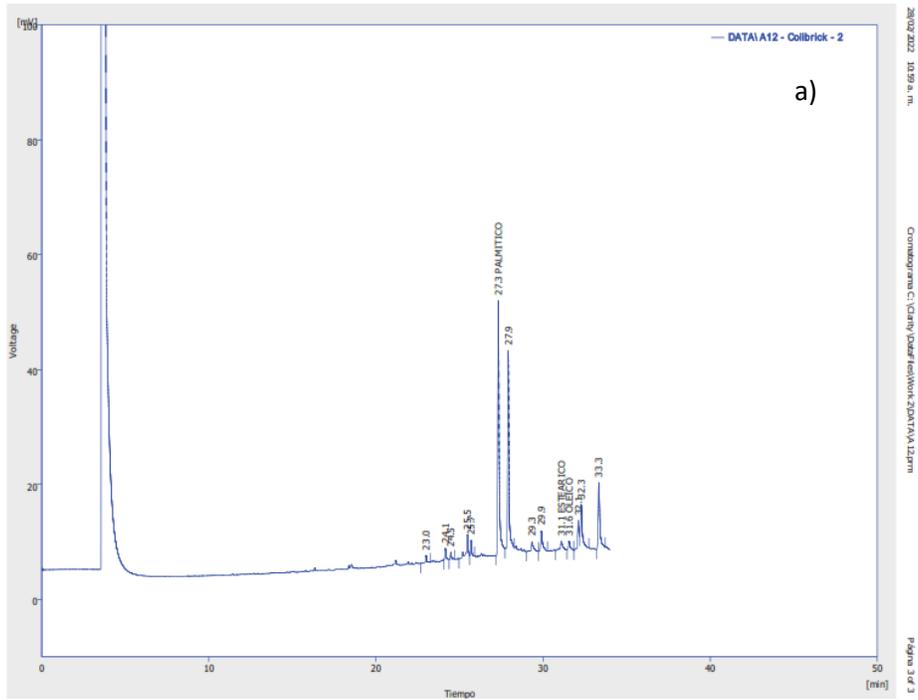
17/03/2022 03:03 p.m.

Cromatograma C:\Clarity\DataFiles\Work\41\DATA\MUESTRA D1.m

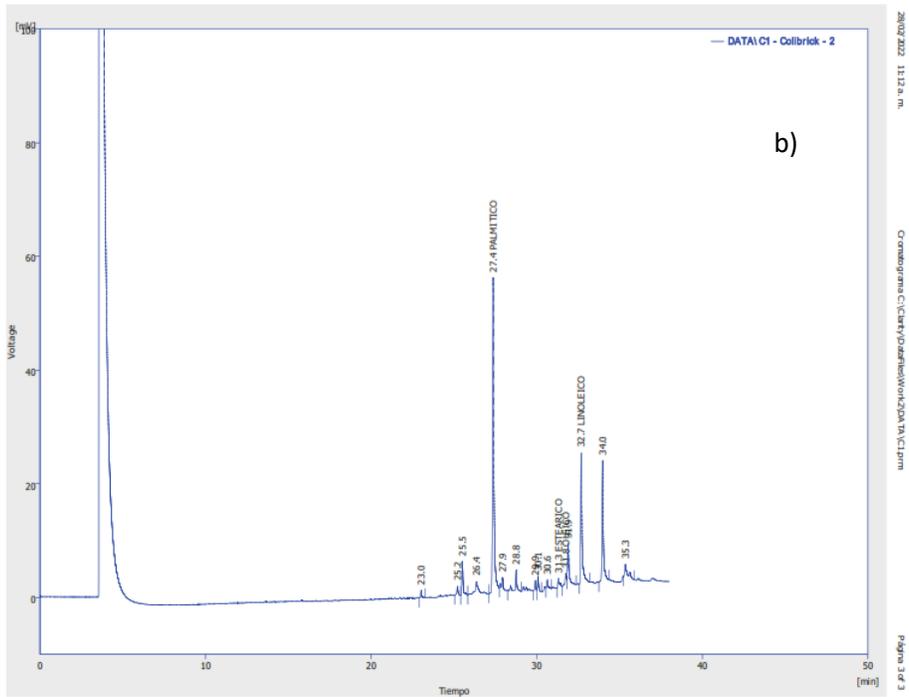
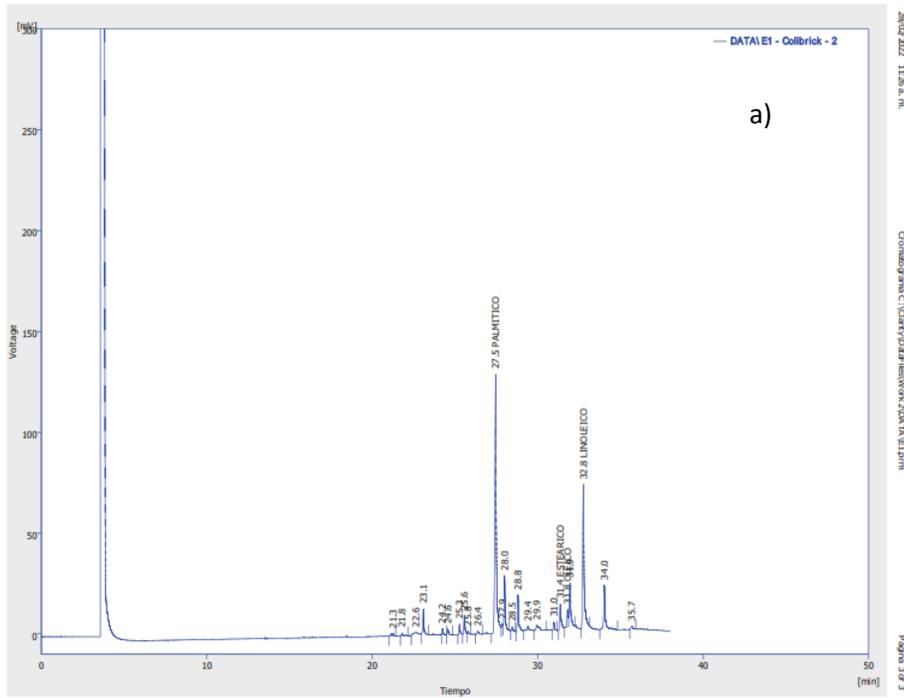
Página 2 de 2

Cromatograma de monosacáridos de *Stigeoclonium nanum* en a) lactosuero y b) medio mineral.

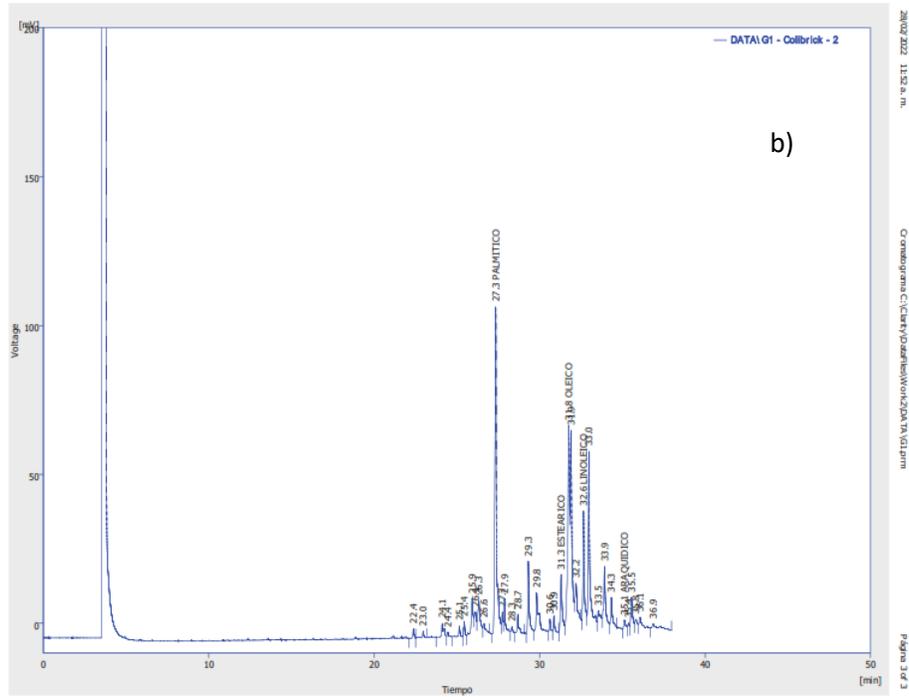
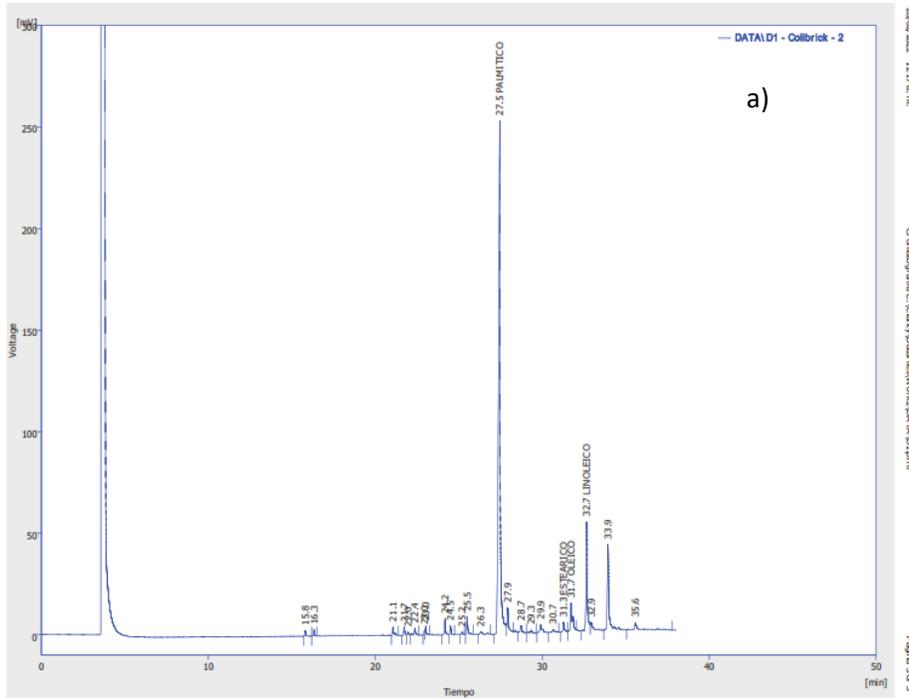
10.13 Anexo 13. Cromatogramas de lípidos



Cromatograma de monosacáridos de *Calothrix* sp. en a) lactoseruo y b) medio mineral.

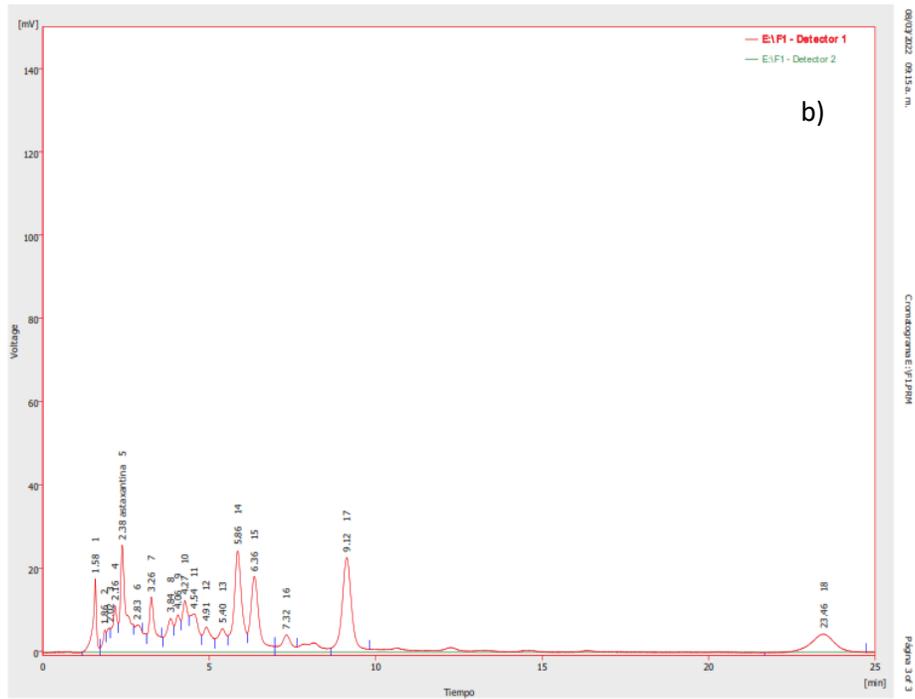
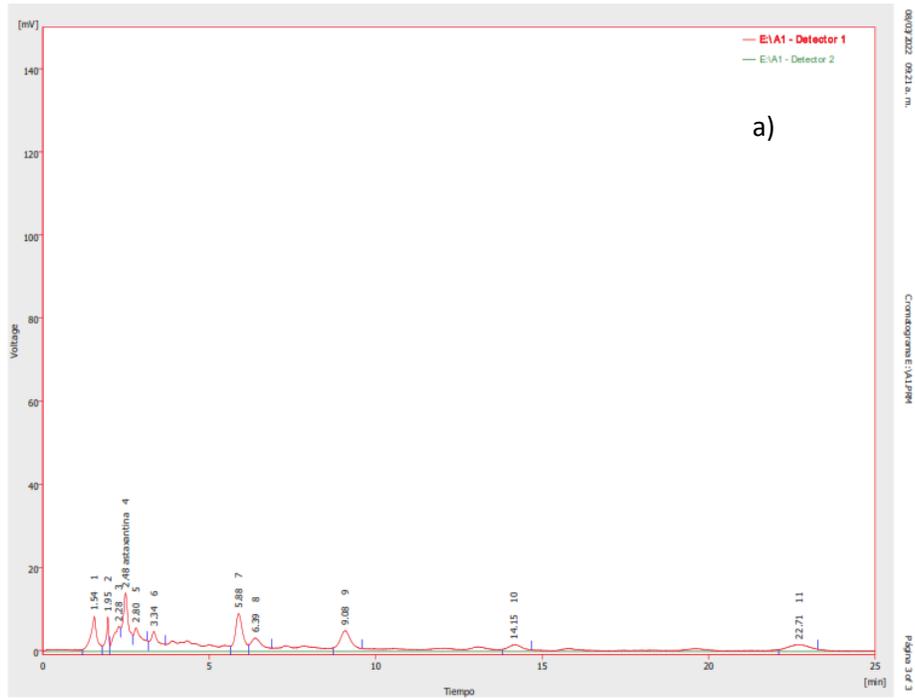


Cromatograma de monosacáridos de *Chlorella vulgaris* en a) lactosuero y b) medio mineral.

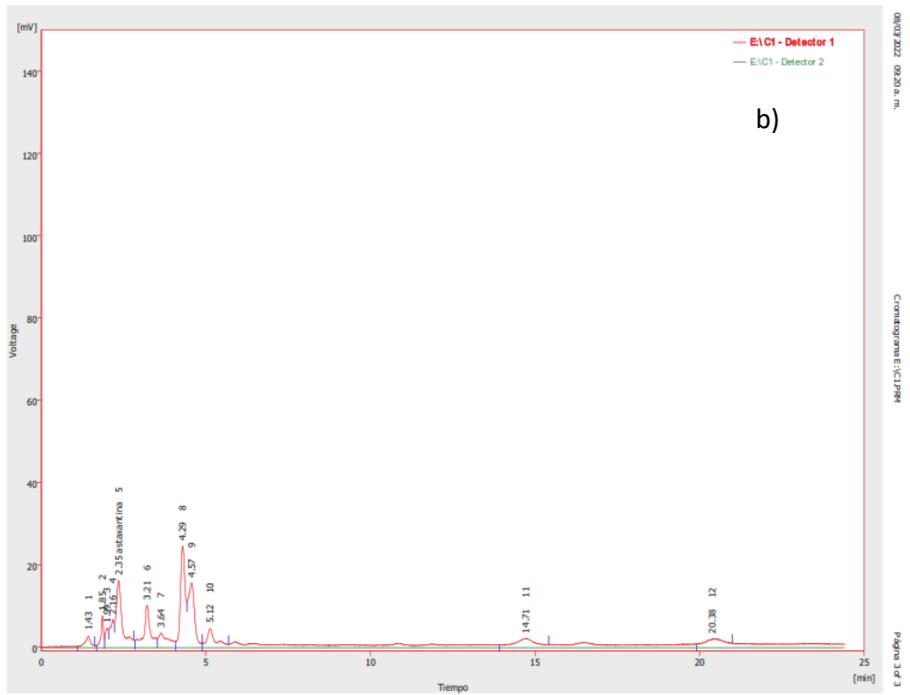
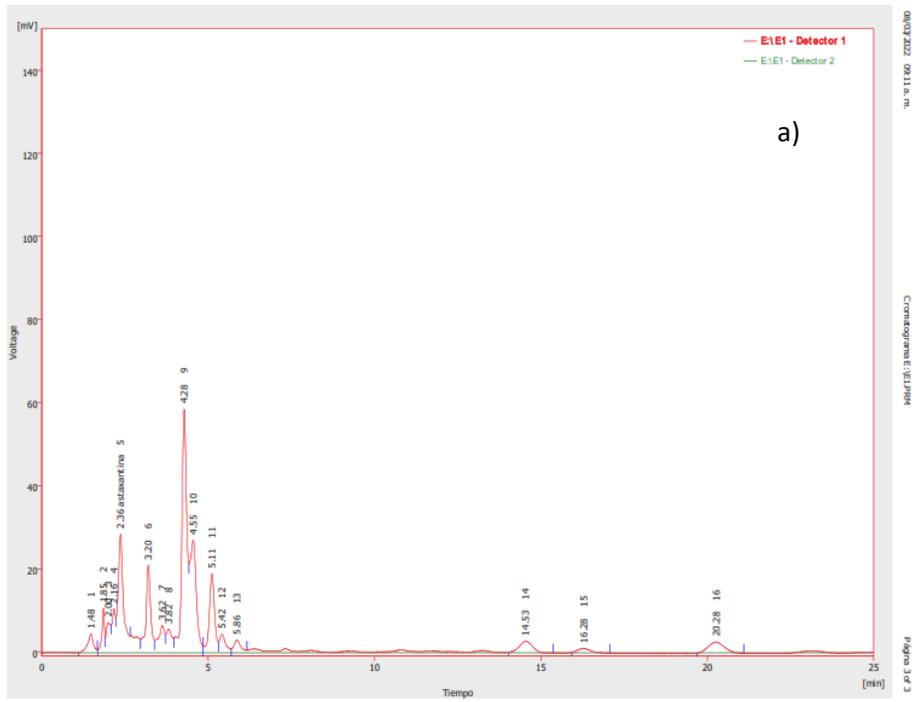


Cromatograma de monosacáridos de *Stigeoclonium nanum* en a) lactosuero y b) medio mineral.

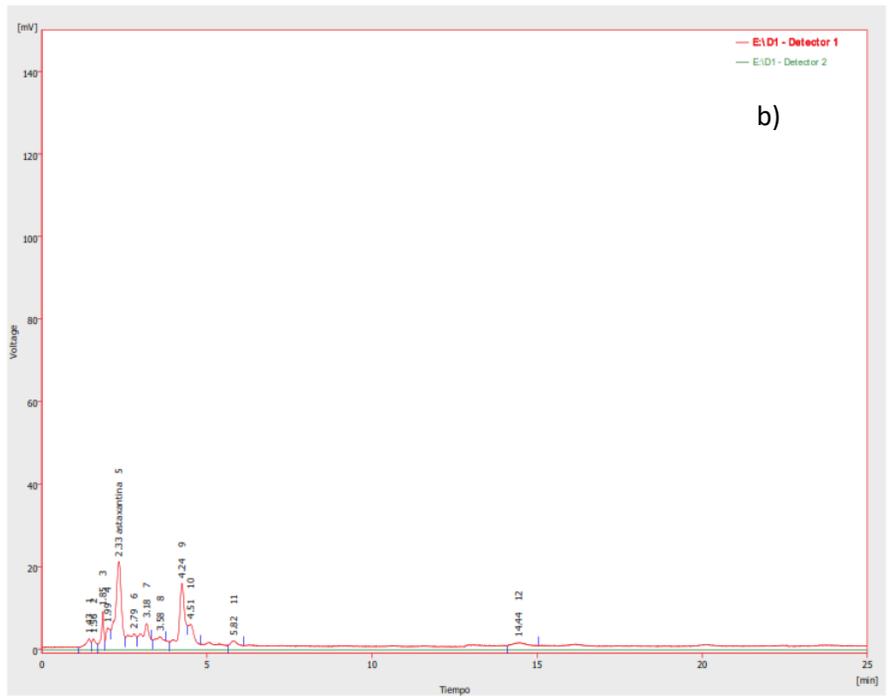
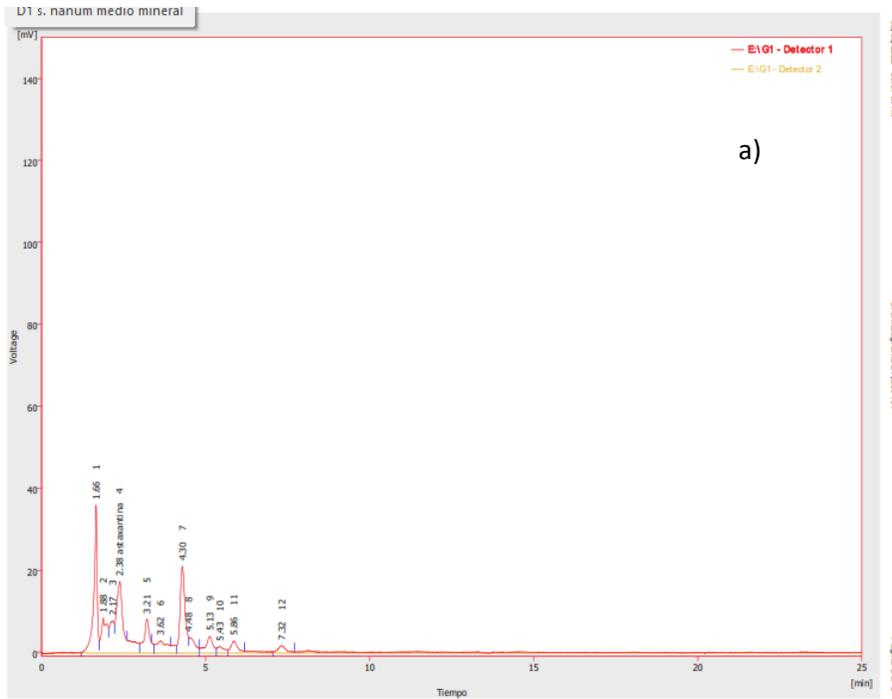
10.14 Anexo 14. Cromatogramas de carotenos



Cromatograma de monosacáridos de *Calothrix* sp. en a) lactosuero y b) medio mineral.



Cromatograma de monosacáridos de *Chlorella vulgaris* en a) lactosuero y b) medio mineral.



Cromatograma de monosacáridos de *Stigeoclonium nanum* en a) lactosuero y b) medio mineral.