

PERFIL LIPÍDICO DE LAGERHEIMIA SP. AISLADA DE AGUAS RESIDUALES INDUSTRIALES. TAMAULIPAS, MÉXICO

LIPIDIC PROFILE OF LAGERHEINIA SP. ISOLATED OF INDUSTRIAL WASTEWATERS. TAMAULIPAS, MEXICO

**Marisol Martínez-Hernández¹, Sandra L. Suastes-Acosta¹, Cruz Lozano-Ramírez²,
Mónica C. Rodríguez-Palacio^{2*}**

(1) Instituto de Estudios Superiores de Tamaulipas- Red de Universidades Anáhuac, Centro de Investigación y Tecnología en Saneamiento Ambiental, Ave. Dr. Burton E. Grossman 501 Pte., Col Tampico-Altamira Sector 1, 89605 Altamira, Tam. - México

(2) Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa, UAMI. Av. San Rafael Atlixco 186, Vicentina, Iztapalapa, 09340 Ciudad de México, D.F. - México

*autor de correspondencia (e-mail: mony@xanum.uam.mx)

Recibido: 11/07/2017 - Evaluado: 30/08/2017 - Aceptado: 17/10/2017

RESUMEN

En este trabajo se presentan los resultados del aislamiento de once especies de microalgas clorofitas y una cianobacteria aisladas de efluentes residuales industriales. Se trabajó con la especie *Lagerheimia* sp. y se realizó un análisis de la biomasa algal cosechada, para identificar triacilglicéridos por espectroscopía infrarroja y por cromatografía de gases. Se determinó que la especie tiene una capacidad de remoción de la DQO de hasta 43.17 % con valores iniciales de DQO en el orden de 1 199 mg/L y se reporta 26.4% de ácido palmítico, 16.07% de ácido elaídico, 18.80% de ácido linoleico y 20.4% de ácido gama linoleico. Los cultivos de microalgas obtenidos de la zona industrial de Altamira representan una alternativa para la biorremediación de estas aguas residuales industriales a la par de la obtención de metabolitos de interés como los lípidos para la síntesis de biodiesel.

ABSTRACT

In this work the results of the isolation of eleven species of chlorophyll microalgae and one cyanobacterium isolated from industrial residual effluents is presented. It was worked with the species *Lagerheimia* sp. and an analysis of the harvested algal biomass was performed to identify triacylglycerides by infrared spectroscopy and gas chromatography. It was determined that this organism shows a great capacity for diminishing the COD (oxygen chemical demand) until 43.17 % in wastewater samples with an initial 1 199 mg/L COD values. 20.4% of palmitic acid, 16.07% of elaidic acid, 18.8% of linoleic acid and 20.04% of gamma-linoleic acid are reported. Microalgae cultures isolated from Altamira industrial zone represent an alternative treatment for wastewaters as well as a potentially biodiesel source.

Palabras clave: aguas residuales industriales, *Lagerheimia* sp., cultivo de microalgas, ácidos grasos
Keywords: industrial wastewater, *Lagerheimia* sp., culture microalgae, fatty acids

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos muy diversos en forma, tamaño y capacidad de adaptación a distintos ambientes. Dependiendo de las condiciones ambientales y nutricionales algunas pueden acumular altas concentraciones de metabolitos de interés biotecnológico como lípidos, vitaminas, antibióticos, antioxidantes, pigmentos, proteínas; con usos subsecuentes en la industria cosmetológica, farmacéutica, alimentaria, sin dejar de mencionar la producción de combustibles ecológicos (Abalde *et al.*, 1995; Chisty, 2007; Vanthoor-Koopmans *et al.*, 2014; Arenas *et al.*, 2016).

Los lípidos, materia prima para la producción de biocombustibles, son uno de los principales componentes de las microalgas. En diversas cepas su concentración fluctúa alrededor del 20 % a 50 % del peso seco (Chisty, 2007; Arenas *et al.*, 2016) y estos valores pueden aumentar mediante la manipulación de variables como la intensidad de luz, temperatura, concentración de dióxido de carbono y concentración de nitrógeno (Chisty, 2007; Garibay-Hernández *et al.*, 2009; Loera-Quezada & Olguín, 2010). Sin embargo, un factor importante para el éxito global de la producción de biocombustibles, es la selección de la cepa de microalga quien debe tener óptimo rendimiento en producción de biomasa algal, acumulación de lípidos del tipo triacilglicéridos y capacidad de adaptarse a ambientes extremos entre otros (Garibay-Hernández *et al.*, 2009; Brennan & Owende, 2010; Loera-Quezada y Olguín, 2010; Sepúlveda-González, 2012; Sacristán de Alva *et al.*, 2013; Toledo-Cervantes *et al.*, 2013; Arenas *et al.*, 2016).

El trabajar con aguas residuales como medios de cultivo para las microalgas, tiene el propósito de reeditar en costo-efectividad, debido a la tecnología simple que envuelve. Los nutrientes son reciclados, es decir que son conservados en biomasa algal rica en nutrientes y/o metabolitos de interés y se logra tener un efluente libre de la carga orgánica (Hernández-Reyes *et al.*, 2012).

Para el tratamiento de aguas residuales de la industria pesquera se ha probado la eficiencia de la microalga *Scenedesmus* sp. reportándose remoción de nitrógeno amoniacal (NAT) hasta de 99.44 %, 77.54 % para fosfatos y de 35.59 % para materia orgánica (Andrade *et al.*, 2009). Chacón *et al.* (2004), utilizaron cultivos de las microalgas *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. en la remoción de nitrógeno, amonio y DQO en aguas residuales municipales con resultados exitosos. Hernández-Reyes *et al.* (2012), reportan el uso de cultivos clonales de *Chlorella vulgaris*, la cianobacteria *Spirulina subsalsa* y cultivos mixtos provenientes del agua residual municipal para el mismo fin.

El presente trabajo tuvo como objetivo el aislamiento de microalgas que crecen de manera natural en las aguas residuales de la zona industrial de Altamira (Tamaulipas, México) y posteriormente evaluar la eficiencia de una de ellas en la disminución de la demanda química de oxígeno en aguas residuales industriales y caracterizar por espectrofotometría infrarroja y cromatografía de gases los lípidos que acumula.

MATERIALES Y METODOS

Se realizaron muestreos en los meses de mayo-junio de 2013 en la zona industrial de Altamira (Tamaulipas), dos en la industria petroquímica y uno en la industria refresquera siguiendo el protocolo de la norma NMX-AA-003-1980. Se determinaron los siguientes parámetros de calidad del agua: conductividad, usando conductímetro (Marca Orión modelo Sens-ion 5 Ames, Iowa. EE.UU.); cloruros por la técnica argentométrica (norma NMX-AA-073-SCFI-2001; dureza de calcio (Standart Methods-3500Ca-D; APHA, 1995); dureza de magnesio (Standart Methods-3500Mg-E; APHA, 1995); sólidos disueltos totales y sólidos suspendidos totales por gravimetría (norma NMX-AA-034-SCFI-2001); sulfatos por la técnica de turbidimetría (norma NMX-AA-074-1981); demanda química de oxígeno (norma NMX-AA-030/1-SCFI-2012); nitrógeno total mediante la técnica de digestión Kjendhal (norma NMX-AA-026-SCFI-2010); suma de nitrógeno de nitratos y nitrógeno de nitritos (basados en normas NMX-AA-079-SCFI-2001 y NMX-AA-099-SCFI-2006), fósforo total por colorimetría (norma NMX-AA-029-SCFI-2001).

Establecimiento de cultivos de microalgas

Debido a la naturaleza de las muestras (Tabla 1), se procedió a modificar el método habitual para aislar células y/o cenobios microalgales (Arredondo-Vega & Voltolina, 2007) y se estableció un procedimiento alterno de la siguiente manera: se filtraron 100 mL de cada muestra de agua residual, con membrana de celulosa de 0.45 μm y se colocó el material filtrado en 100 mL de medio de cultivo AAP (Blaise *et al.*, 2000) en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, posteriormente se colocaron en una cámara de incubación a temperatura de 21 ± 3 °C con ciclo de luz:oscuridad de 12:12 por un periodo de 7 días. Una vez que se verificó el crecimiento de las microalgas, se centrifugaron las muestras para concentrar la biomasa algal y disminuir la cantidad de protozoarios observados. La biomasa centrifugada fué sembrada nuevamente en medio de cultivo estéril.

Posteriormente al término de un mes, con la muestra libre de protozoarios, se procedió a aislar los organismos presentes por la técnica de aislamiento con micropipeta de punta adelgazada (Arredondo-Vega & Votolina, 2007) y se establecieron los cultivos clonales.

Bioensayos

De las 11 cepas establecidas en este trabajo (Tabla 1) se seleccionó para los bioensayos a la especie *Lagerheimia* sp. aislada del agua residual de la industria petroquímica, ya que se tienen registros de que algunas especies de este género pueden crecer en medios alternativos y producir ésteres metílicos de ácidos grasos (Calixto *et al.*, 2016; Sassi *et al.*, 2017).

La especie se escaló de un tubo falcon con 10 mL a un matraz Erlenmeyer que contenía 100 mL de medio de cultivo estéril. Una vez que este cultivo alcanzó la fase de crecimiento exponencial, se sembró en matraces que contenían 100 mL de agua residual industrial cruda, en una proporción del 10 % de inóculo; esto se hizo por triplicado.

Se monitoreó el experimento por un período de 30 días y se determinó la capacidad de remoción de DQO midiendo las concentraciones iniciales y finales (norma NMX-AA-030/1-SCFI-2012) y el crecimiento celular por conteo en cámara de Neubauer (Arredondo-Vega & Votolina, 2007).

Análisis de biomasa

Se cosecharon 50 mL de los cultivos en fase de crecimiento estacionaria, se centrifugaron a 2500 RPM por 15 min, la biomasa centrifugada se secó en un vidrio de reloj a 40 °C por 12 h. Una vez seca la biomasa, se colocó en un dedal de celulosa con un arreglo manual para evitar la salida de la muestra y se montó en el equipo Soxhlet usando n-Hexano grado A.C.S a reflujo de 20 ciclos por hora, por un periodo de 4 h. Al término de los ciclos, se retiraron los matraces con las respectivas muestras extraídas y se evaporó el resto del hexano en horno de convección por un período de aprox 3 h, a una temperatura constante de 70 °C. Las condiciones para extracción de lípidos se realizó conforme a la norma NMX-AA-005-2005. Se agregó 10 mL de éter etílico A.C.S para disolver toda la grasa extraída y poder realizar el análisis por espectroscopía infrarroja IR (Espectrofotómetro de Infrarrojo FT-IR Perkin Elmer modelo Spectrum One. Whaltam, Massachusetts. EE.UU.) También se determinaron los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME's) a través de transesterificación, en un cromatógrafo de gases con ionización de llama detector (FID, modelo HP6890) (Toledo-Cervantes *et al.*, 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se lograron establecer un total de 11 cultivos clonales de las especies de clorofitas: *Chlorella* sp., *Desmodesmus quadricauda*, *Lagerheimia* sp., *Scenedesmus dimorphus* y la cianobacteria *Oscillatoria* sp. (Tabla 1).

Debido a la metodología que se utilizó en este trabajo, para la limpieza de la muestra y posterior aislamiento de los microorganismos fotosintéticos, se considera posible que además de los protozoarios, se pudieron haber eliminado otras especies microalgales presentes, lo cual se refleja en una baja diversidad encontrada y por tanto se lograron establecer un bajo número de cultivos clonales. Esta diversidad baja también se puede explicar por las condiciones del agua residual que se observan en la Tabla 1, debido a que los sólidos disueltos disminuyeron drásticamente la transparencia del agua, impidiendo o disminuyendo la penetración de la luz para que se realizara la fotosíntesis; la dureza del agua tiende a precipita algunas sales minerales; las altas concentraciones de Nitrógeno que se presentaron (M3, Tabla 1) pudieron tener efecto tóxico para algunas especies de microalgas impidiendo su crecimiento y aunado a esto la presencia de cloruros pudo favorecer el crecimiento sólo de especies tolerantes a estos (Romero-Rojas, 1999; IMTA, 2005; Arredondo-Vega & Votolina, 2007; Camargo & Alonso, 2007; Conzonno, 2009).

Tabla 1: Descripción y características de las muestras

MUESTRA	DESCRIPCIÓN	CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA	NÚMERO DE CEPAS	ESPECIES
M1	Proveniente de Industria Petroquímica. Fecha de Muestreo: 21/mayo/13	Conductividad: 13 000µS/cm Cloruros: 3 252.65 mg/L Dureza de Ca :1 851.30 mg/L Dureza de mg: 762.3 mg/L Sólidos Disueltos Totales: 9 765 mg/L Sulfatos: 2 531.35 mg/L	2 2	<i>Chlorella</i> sp. <i>Lagerheimia</i> sp.
M2	Proveniente de Industria Petroquímica. Fecha de Muestreo: 04/junio/13	Conductividad: 5 420µS/cm Cloruros: 1 220.48 mg/L Dureza de Ca: 686.0 mg/L Dureza de mg: 388.08 mg/L Sólidos Disueltos Totales:3 310mg/L Sulfatos: 1012.30 mg/L	1 1 1 2	<i>Chlorella</i> sp. <i>Desmodesmus quadricauda</i> <i>Scenedesmus dimorphus</i> <i>Oscillatoria</i> sp.
M3	Agua residual de proceso de elaboración de refrescos. Fecha de Muestreo: 05/julio/13	DQO: 5 259.60 mg/L Nitrógeno Total: 31.27 mg/L Sólidos Suspendidos Totales: 400 mg/L Fósforo: 1.75 mg/L	2	<i>Chlorella</i> sp.

De las especies que se establecieron en cultivo, algunas han sido reportadas en trabajos de biorremediación para tratamiento de aguas residuales (Chacón *et al.*, 2004; Hernández-Reyes *et al.*, 2012; Calixto *et al.*, 2016), por lo que podrán ser utilizadas en estudios posteriores y estas se sumaron a la colección de cultivos de microalgas del laboratorio de Ficología Aplicada, UAMI.

Tabla 2: Resultados de remoción de DQO en agua residual industrial.

	Concentración cel/ml	DQO inicial	DQO final	% REMOCIÓN
1	426700	1 199.5 mg/L	565.04 mg/L	47.10
2	740 000	1 199.5 mg/L	494.41 mg/L	41.21
3	390 000	1 199.5 mg/L	494.41 mg/L	41.21
Media	518 900	1 199.5 mg/L	517.95 mg/L	43.17

En cuanto a la remoción de DQO Sacristán-de-Alva *et al.* (2013), reportan niveles de remoción cercanos del 77% utilizando aguas residuales municipales y en este mismo tipo de efluente Chacón *et al.* (2004), reportan remoción de DQO del 55,8% y de 54,8%. Vacca-Jimeno *et al.* (2017), trabajaron con cultivos en agua residual http://www.exeedu.com/publishing.cl/av_cienc_ing/

de la industria textil con niveles de remoción de la DQO de un 94,6%, en una dilución del 30 %; en nuestro trabajo se utilizó el agua residual cruda, sin diluir, logrando un porcentaje de 43.17% (Tabla 2), siendo un resultado aceptable, ya que pudo mejorar la calidad del efluente.

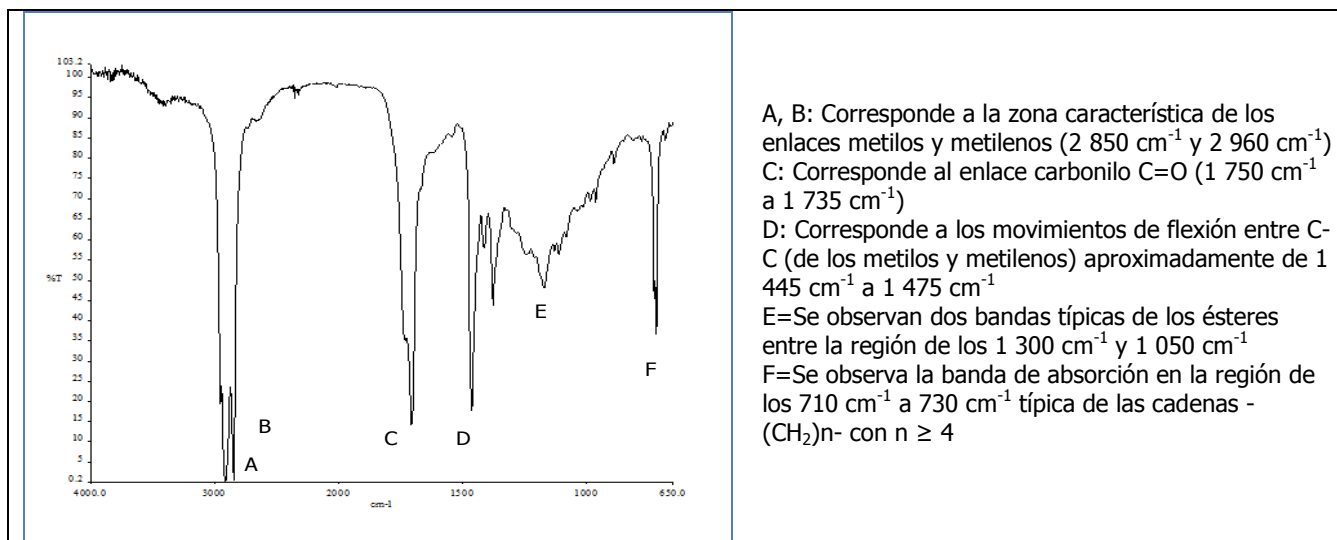


Fig. 1: Espectrofotometría de infra-rojo de biomasa algal de *Lagerheimia* sp.

Tabla 3: Perfil de FAME´s de la biomasa microalgal

Ácido graso	Porcentaje
Acido palmítico	26.42
Ácido palmitoleico	0.07
Ácido heptadecanoico	0.23
Ácido heptadecenoico	3.10
Acido esteárico	2.60
Ácido elaídico	16.07
Ácido oleico	2.70
Ácido linoeláidico	0.20
Ácido linoléico	18.80
Ácido araquídico	1.60
Ácido γ - linoléico	20.40
Ácido gadolínico	0.39
Otros	7.20

El uso de la espectroscopía infrarroja IR para caracterizar la biomasa microalgal, no ha sido muy explotado; Laurens y Wolfrum (2011), publicaron un trabajo al respecto con el fin de evaluar la calidad lipídica, especialmente en la identificación de las bandas de absorbancia características de los fosfolípidos presentes en microalgas; en ese trabajo, los autores hacen énfasis a las principales bandas en la región de los 3000 a 2800 nm características correspondientes a los enlaces CH_3 y CH_2 , así como las bandas de absorción en la región de los 1760 a 1730 nm correspondiente a los enlaces carbonilo, mencionan que los picos en la región de los 1000 a 1100 nm correspondientes a los enlaces C-O. Por otro lado, Mayers *et al.* (2013), también utilizan los resultados de la espectroscopía infrarroja como herramienta de caracterización de la calidad lipídica de la biomasa algal identificando las bandas de interés para triglicéridos. Por tanto, se pueden comparar los resultados del espectro IR

con estudios de referencia, para poder identificar la presencia de triglicéridos en estas bandas (Figura 1). Una vez que se detecta esta presencia en la muestra, se decidió realizar un análisis cuantitativo de estos ácidos grasos.

En el análisis cuantitativo realizado del perfil lipídico de la especie (Tabla 3), el ácido palmítico resultó ser el de mayor concentración porcentual en la biomasa algal 26.42 %, y de importancia también resultaron los ácidos, eláidico, linoleico y γ -linoléico con un rango porcentual del 16.07-20.40%. La presencia del ácido linoleico y el ácido eláidico, en esta especie, son importantes si la biomasa algal se desea utilizar para la síntesis de biodiesel, ya que los ésteres metílicos de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga mejoran propiedades como el número de cetano, estabilidad a la oxidación y propiedades de flujo en frío (Dai *et al.*, 2014). Calixto *et al.* (2016), evaluaron biomasa algal de *Lagerheimia* y también lograron obtener altos contenidos de ésteres metílicos de ácidos grasos cultivándola en medio de lombricomposta y en agua residual municipal. Comparando los resultados obtenidos, en este trabajo, con los de Calixto *et al.* (2016), se puede proponer que la especie tiene potencial para la generación de biocombustibles y biorremediación de efluentes contaminados, sin necesidad de someter las células a estrés metabólico.

La espectrofotometría FT-IR como método cualitativo, se puede usar como herramienta de rutina para detección primaria de triacilglicéridos y si lo amerita entonces se recomienda realizar trabajos cuantitativos para el análisis de la biomasa algal, como en el presente trabajo. Logrando que un método se complemente y corrobore al otro.

CONCLUSIONES

Se lograron establecer 11 cepas de microalgas y cianobacterias con una modificación al método para aislamiento.

Los resultados de la remoción de DQO fue favorable, 43.17 % por trabajarse la muestra de agua residual industrial cruda sin diluir.

La espectrofotometría FT-IR se sugiere como técnica primaria antes de pasar a los métodos cuantitativos de rendimiento lipídico.

La especie *Lagerheimia* tiene potencial para producción de biodiesel y disminución de la DQO.

AGRADECIMIENTOS

Al Convenio de colaboración entre el Instituto de Estudios Superiores de Tamaulipas A.C. y la Universidad Autónoma Metropolitana UAM-I. Al proyecto de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud CByS UAM-I "Cultivos de Microalgas, Usos Potenciales. Caribe y Golfo de México".

REFERENCIAS

1. Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, P., Torres y Torres E. & Herreno, C. (1995). *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones*. Universidad de Coruña, España (210 pp.).
2. Andrade, C., Vera, A., Cárdenas, C. & Morales, E. (2009). Producción de Biomasa de la microalga *Scenedesmus* sp. Utilizando aguas residuales de pescadería. *Revista Técnica de Ingeniería Universidad de Zulia*, 32 (2), 126-134.
3. APHA, American Public Health Association (1995). *Standard methods: For the examination of water and wastewater*. 19th Edition. Ed. American Public Health Association APHA, American Water Works Association AWWA, Water Environment Federation WEF. Washington DC., USA.

4. Arenas, E.G., Rodríguez-Palacio, M.C., Juantorena, A.U. & Sebastian, P.J. (2016). Microalgae as a potential source for biodiesel production: techniques, methods and other challenges. *International Journal of Energy Research*, 41 (6), 761-789. DOI: 10.1002/er.3663.
5. Arredondo-Vega, B.O. & Voltolina, D. (2007). *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*. CIBNOR, S.C. La Paz, Baja California Sur México (97 pp.).
6. Blaise, C., Forget, G. & Trottier S. (2000). Toxicity screening of aqueous samples using a cost-effective 72-hour exposure *Selenastrum capricornutum* assay. *Environ. Toxicol.*, 15, 352-359.
7. Brennan, L. & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae. A review of technologies for production, processing and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14 (2), 557-577.
8. Calixto C.D., da Silva Santana, J.K., de Lira, E.B., Sassi, P.G.P., Rosenhaim, R., da Costa Sassi, C.F., *et al.* (2016). Biochemical compositions and fatty acid profiles in four species of microalgae cultivated on household sewage and agro-industrial residues. *Bioresource Technology*, 221, 438-446. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.066>
9. Camargo J. A. & Alonso A. (2007). Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático. *Ecosistemas* 16 (2), 98-110.
10. Chacón, C., Andrade, C., Cárdenas, C., Araujo, I. & Morales, E. (2004). Uso de *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp. en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 38 (2), 94-108.
11. Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25, 294-306.
12. Conzonno, V.H. (2009). *Limnología química*. 1ª edición. La Plata, Editorial de la Universidad Nacional de la Plata (220 pp.).
13. Dai Y.-M., Hsieh, J.-H. & Chen, C.-C. (2014). Transesterification of Soybean Oil to Biodiesel Catalyzed by Waste Silicone Solid Base Catalyst. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 61 (7), 803-808.
14. Garibay-Hernández, A., Vázquez-Duhalt, R., Sánchez, M.P., Serrano, L. & Martínez-Jiménez, A. (2009). Biodiesel a partir de Microalgas. *Biotecnología*, 13 (3), 38-61.
15. Hernández-Reyes, B.M., Rodríguez-Palacio, M.C., Lozano-Ramírez, C. & Castilla-Hernández, P. (2012). Remoción de nutrientes por tres cultivos de microalgas libres e inmovilizados. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 3 (1), 80-94.
16. IMTA, Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (2005). *Agua saludable, gente saludable. Guía para educadores de la calidad del agua*. D.R. Projeet WET International Foundation and IMTA. Primera edición (231 pp.).
17. Laurens, L.M.L. & Wolfrum, E.J. (2011). Feasibility of spectroscopic characterisation of algal lipids: chemometric correlation of NIR and FTIR spectra with exogenous lipids in algal biomass. *Bioenerg. Res.* 4, 22-35.

18. Loera-Quezada, M. & Olguín, E.J. (2010). Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 1 (1), 91-116.
19. Mayers, J.J., Flynn, K.J. & Shields, R.J. (2013). Rapid determination of bulk microalgal biochemical composition by Fourier-Transform Infrared spectroscopy. *Bioresource Technology*, 148, 215–220
20. NMX-AA-003-1980 (1980). Muestreo de Aguas residuales.
21. NMX-AA-074-1981 (1981). Determinación de sulfatos en aguas naturales, residuales y residuales tratada. Método de prueba.
22. NMX-AA-034-SCFI-2001 (2001). Determinación de sólidos totales en aguas naturales, residuales y residuales tratada. Método de prueba.
23. NMX- AA-079-SCFI-2001 (2001). Análisis de aguas. Determinación de nitratos en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas. Método de prueba (Cancela a la NMX-AA-079-1986).
24. NMX-AA-073-SCFI-2001 (2001). Determinación de cloruros en aguas naturales, residuales y residuales tratada. Método de prueba.
25. NMX-AA-029-SCFI-2001 (2001). Determinación de fósforo total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Método de prueba.
26. NMX-AA-005-2005 (2005). Determinación de grasas y aceites recuperables en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - método de prueba
27. NMX-AA-099-SCFI-2006 (2006). Análisis de agua. Determinación de nitrógeno de nitritos en aguas naturales y residuales. Métodos de prueba.
28. NMX-AA-026-SCFI-2010 (2010). Determinación de nitrógeno total Kjeldahl en aguas naturales, residuales y residuales tratadas.
29. NMX-AA-030/1-SCFI-2012 (2012). Medición de la demanda química de oxígeno en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Método de prueba.
30. Romero-Rojas, J. (1999). *Tratamientos de Aguas residuales: Teoría y diseño*. Ed: Escuela Colombiana de Ingeniería (25 pp.).
31. Sacristán-de-Alva, M., Luna-Pabello, V.M., Cadena, E. & Ortiz, E. (2013). Green microalgae *Scenedesmus acutus* grown on municipal wastewater to copied nutrient removal with lipid accumulation for biodiesel. *Bioresource Technology*, 146, 744-748.
32. Sassi, P.G.P., Calixto, C.D., da Silva Santana, J.K., Sassi, R., da Costa Sassi, C.F. & Abrahão, R. (2017). Cultivation of freshwater microalgae in biodiesel wash water. *Environmental Science and Pollution Research* 24(22), 18332–18340.
33. Sepúlveda-González, I. (2012). Bioturbosina. Producción de cultivos energéticos para la aviación comercial. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(3), 579-594.
34. Toledo-Cervantes, A., Morales, M., Novelo, E. & Revah, S. (2013). Carbon dioxide fixation and lipid storage by *Scenedesmus obtusiusculus*. *Bioresource. Technology*, 130, 652-658.

35. Vacca Jimeno, V.A., Angulo Mercado, E.R., Puentes Ballesteros, D.M., Torres Yépez, J.G. & Plaza Vega, M.E. (2017). Uso de la microalga *Chlorella* sp. viva en suspensión en la decoloración del agua residual de una empresa textil. *Prospect*, 15(1), 93-99.
36. Vanthoor-Koopmans M., Cordoba-Matson, M.V., Arredondo-Vega, B.O., Lozano-Ramírez, C., García Trejo, J.F. & Rodríguez-Palacio, M.C. (2014). Microalgae and cyanobacteria production for food and food supplements. *In: Biosystems Engineering: Biofactories for Food Production in XXI Century*. Ed. Ramon Guevara-Gonzalez and Irineo Torres-Pacheco. Ed Springer, 253-275.

