

TRANSFORMACIÓN DE LIXIVIADOS MEDIANTE EL USO DE MICROALGAS

**Transformación de Lixiviados del Parque Tecnológico Ambiental Guayabal (Veolia Aseo  
Cúcuta S.A. E.S.P) en Productos de Valor Agregado Mediante el Uso de Microalgas y  
Cianobacterias**

María Daniela Ortiz Álvarez

Trabajo de Grado para Optar al Título de Magister en Ingeniería Química

Director:

Ing. MSc. Crisóstomo Barajas Ferreira

Magister en Ingeniería Química

Codirectora:

Ing. MSc. PhD. Janet Bibiana García

Dra. En Ingeniería Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Físico Químicas

Escuela de ingeniería Química

Maestría en Ingeniería Química

Bucaramanga

2023

## TRANSFORMACIÓN DE LIXIVIADOS MEDIANTE EL USO DE MICROALGAS

### ***Dedicatoria:***

*A mis padres por su apoyo incondicional, especialmente a mi madre, que con su sabiduría y amor me alentó a continuar en esta etapa aun cuando me encontraba en medio del caos. A mi compañero de vida, que con su paciencia, detalles y palabras me acompañó y me dio fortaleza en los largos días y noches de trabajo para que este proyecto fuera posible. A mi mejor amigo, por que fuimos compañeros y colegas durante este proceso y entre risas y lágrimas logramos hacerlo posible.*

# TRANSFORMACIÓN DE LIXIVIADOS MEDIANTE EL USO DE MICROALGAS

## **Agradecimientos**

Gracias a Dios, porque cuando me sentía perdida me guiaba para encontrar de nuevo el camino.

Gracias a mi director, el profesor Crisóstomo Barajas Ferreira y a mi codirectora, Janet Bibiana García Martínez, por orientarme en cada paso y porque su apoyo incondicional hizo posible este proyecto.

A la Universidad Industrial de Santander, especialmente a la escuela de ingeniería química, por la calidad humana y profesional de los docentes y administrativos, por sus enseñanzas y guía en este proceso. Así como al grupo de investigación CIDES, por su apoyo en cada etapa.

Agradecimientos especiales al profesor Andrés Fernando Barajas Solano, quien con su sabiduría fue un apoyo incondicional en esta investigación.

A la Universidad Francisco de Paula Santander, especialmente al equipo de trabajo del laboratorio INNOValgae, quienes me permitieron el uso de sus instalaciones y de los insumos necesarios para hacer posible el desarrollo de este proyecto.

A Veolia Aseo Cúcuta, especialmente al ing. Miguel Ángel Velasco Muñoz, por su aporte a este proyecto y por brindarme todo su valioso conocimiento técnico relacionado al funcionamiento de un relleno sanitario.

# TRANSFORMACIÓN DE LIXIVIADOS MEDIANTE EL USO DE MICROALGAS

## Tabla de contenido

Introducción	1
1 Estado Del Arte	5
1.1 Uso de Microalgas en Aguas Residuales	5
1.2 Metabolitos	8
1.2.1 Lípidos	8
1.2.2 Carbohidratos	8
1.2.3 Fitohormonas	9
1.2.4 PHB	9
1.3 Análisis Bibliométrico para Uso de Microalgas en Lixiviados de Rellenos Sanitarios	10
1.4 Lixiviados y Microalgas en Colombia	20
2 Planteamiento del problema	23
3 Justificación	25
4 Hipótesis	27
5 Pregunta de Investigación	27
6 Objetivos	28
6.1 Objetivo General	28
6.2 Objetivos Específicos	28
7 Alcance	29
8 Metodología	29
8.1 Selección de Cepas Productoras de Lípidos, Carbohidratos, Fitohormonas AIA y PHB del Banco de Cepas de la UFPS en Lixiviado al 5%	29
8.1.1 Cuantificación de biomasa	30
8.1.2 Cuantificación de lípidos totales	30

## TRANSFORMACIÓN DE LIXIVIADOS MEDIANTE EL USO DE MICROALGAS

8.1.3 Cuantificación de carbohidratos	31
8.1.4 Cuantificación de Fitohormonas AIA	32
8.1.5 Cuantificación de PHB	32
8.1.6 Selección de cepas de microalgas y cepas de cianobacterias	33
8.2 Cultivo de cepas de microalgas y cepas de cianobacterias en lixiviados tratados	34
8.3 Diseño de experimentos de variables de crecimiento para la producción de lípidos, carbohidratos, fitohormona AIA y PHB	35
8.3.1 Diseño de experimentos	35
8.3.2 Evaluación de cultivos en reactores de 20 L de la mejor condición de cultivo	36
9 Resultados	37
9.1 Selección de Cepas con Altos Contenidos de Lípidos, Carbohidratos, Fitohormonas AIA y PHB del Banco de Cepas de la UFPS en Lixiviado al 5%.	37
9.2 Cultivo de Cepas de Microalgas y Cepas de Cianobacterias en Lixiviados Tratados	42
9.3 Diseño de Experimentos con Variables de Crecimiento para la Producción de Lípidos, Carbohidratos, Fitohormonas AIA y PHB	49
9.3.1 Diseño de Experimentos: Análisis Estadístico	49
9.3.1.1 Variable de respuesta: Biomasa.	50
9.3.1.2 Variable de respuesta: Carbohidratos.	51
9.3.1.3 Variable de respuesta: Lípidos.	52
9.3.1.4 Variable de respuesta: Fitohormonas AIA.	52
9.3.1.5 Variable de respuesta: PHB.	53
9.3.1.6 Función de deseabilidad para sugerir condiciones mejoradas de cultivo para cada metabolito.	54

## TRANSFORMACIÓN DE LIXIVIADOS MEDIANTE EL USO DE MICROALGAS

9.3.2 Evaluación de cultivos en reactores de 20 L a la mejor condición de cultivo	58
9.3.2.1 Lípidos	59
9.3.2.2 Carbohidratos	61
9.3.2.3 Fitohormonas AIA	63
9.3.2.4 PHB	64
10 Conclusiones	68
Referencias	71

# TRANSFORMACIÓN DE LIXIVIADOS MEDIANTE EL USO DE MICROALGAS

## Lista de Figuras

Figura 1 <i>Proceso de cultivo de microalgas</i>	6
Figura 2 <i>Conexiones bibliométricas entre Microalgas y Lixiviados</i>	12
Figura 3 <i>Publicaciones por año</i>	13
Figura 4 <i>Contribuciones por afiliación</i>	15
Figura 5 <i>Documentos por área de estudio</i>	16
Figura 6 <i>Cultivo de cianobacterias (a) y microalgas (b) en lixiviados al 5%</i>	38
Figura 7 <i>Concentración de biomasa (g/L) en cianobacterias (a) y microalgas (b)</i>	38
Figura 8 <i>Contenido de carbohidratos (% p/p) en cianobacterias (a) y microalgas (b)</i>	40
Figura 9 <i>Contenido de lípidos (% p/p) en cianobacterias (a) y microalgas (b)</i>	40
Figura 10 <i>Esquema del tratamiento de los lixiviados y las remociones obtenidas</i>	42
Figura 11 <i>Cultivo de microalgas y cianobacterias bajo diferentes condiciones de lixiviado</i>	43
Figura 12 <i>Concentración de biomasa bajo diferentes condiciones de lixiviado</i>	44
Figura 13 <i>Contenido de metabolitos bajo diferentes condiciones de lixiviado</i>	46
Figura 14 <i>Función de deseabilidad sugerido por software Design-Expert para carbohidratos</i>	55
Figura 15 <i>Función de deseabilidad sugerido por el software Design-Expert para lípidos</i>	56
Figura 16 <i>Función de deseabilidad sugerido por el software Design-Expert para AIA</i>	56
Figura 17 <i>Función de deseabilidad sugerido por el software Design-Expert para PHB</i>	57
Figura 18 <i>Resultados lípidos en reactor de 20 L</i>	59
Figura 19 <i>Resultados carbohidratos en reactor de 20 L</i>	61
Figura 20 <i>Resultados AIA en reactor de 20 L</i>	63
Figura 21 <i>Resultados PHB en reactor de 20 L</i>	65

# TRANSFORMACIÓN DE LIXIVIADOS MEDIANTE EL USO DE MICROALGAS

## Lista de Tablas

Tabla 1 <i>Utilización de microalgas en el tratamiento de aguas residuales</i>	7
Tabla 2 <i>Top de autores búsqueda SCOPUS</i>	14
Tabla 3 <i>Países con mayores contribuciones</i>	17
Tabla 4 <i>Artículos relevantes en el uso de microalgas en lixiviados de rellenos sanitarios</i>	18
Tabla 5 <i>Tipos de tratamiento de lixiviados en Colombia</i>	21
Tabla 6 <i>Condiciones diseño experimental</i>	36
Tabla 7 <i>Caracterización de los lixiviados y su comparativo con los medios estándar</i>	37
Tabla 8 <i>Matriz de ponderación para selección de cepas</i>	41
Tabla 9 <i>Diseño de experimentos mediante el software Design- Expert</i>	49
Tabla 10 <i>Análisis estadístico ANOVA para modelo significativo: Biomasa</i>	50
Tabla 11 <i>Análisis estadístico ANOVA para modelo cuadrático: Carbohidratos</i>	51
Tabla 12 <i>Análisis estadístico ANOVA para modelo lineal: Lípidos</i>	52
Tabla 13 <i>Análisis estadístico ANOVA para modelo cuadrático: AIA</i>	52
Tabla 14 <i>Análisis estadístico ANOVA para modelo lineal: PHB</i>	53
Tabla 15 <i>Condiciones ideales para mejorar el contenido de metabolitos</i>	57
Tabla 16 <i>Análisis fisicoquímico de los reactores con condiciones modificadas</i>	58
Tabla 17 <i>comparativo en diferentes volúmenes a condiciones mejoradas</i>	66

## RESUMEN

**Título:** Transformación de lixiviados del parque tecnológico ambiental guayabal (Veolia Aseo Cúcuta S.A. E.S.P) en productos de valor agregado mediante el uso de microalgas y cianobacterias \*

**Autor:** María Daniela Ortiz Álvarez\*\*

**Palabras Claves:** Lixiviados de relleno sanitario, Microalgas, Cianobacterias, Aprovechamiento, Sistemas de cultivo.

**Descripción:** El presente proyecto evaluó el proceso de transformación de lixiviados de relleno sanitario provenientes del Parque Tecnológico Ambiental Guayabal en productos de valor agregado (lípidos, carbohidratos, fitohormonas AIA y PHB), mediante el uso de microalgas y cianobacterias pertenecientes al banco de cepas del laboratorio INNOValgae de la UFPS. Se evaluó el crecimiento y contenido de metabolitos en 16 cepas, identificando 4 con mayor potencial de uso, de las cuales se analizó su crecimiento en lixiviado tratado y lixiviado crudo a concentraciones del 5% y 10%, siendo el lixiviado al 5% el mejor medio de cultivo. Al realizar un diseño de experimentos con el fin de evaluar el impacto de diferentes factores (Tipo de luz, ciclo de luz y cepa), se determinó un modelo significativo para las variables de respuesta de lípidos, carbohidratos, AIA y PHB y se identificaron condiciones mejoradas para cada cultivo. Al evaluar las condiciones mejoradas en cultivos a escala piloto de 20L, se obtuvieron resultados positivos, alcanzando valores de  $14.2 \pm 0.2$  % p/p de lípidos,  $65 \pm 1.7$  % p/p de carbohidratos,  $3.5 \pm 0.0$  % p/p de AIA y  $19.7 \pm 0.4$  % p/p de PHB, siendo el primer sistema a escala piloto en Colombia donde se identificó el contenido de AIA y PHB. Este estudio demostró ser un proceso innovador a nivel nacional y un referente importante a nivel global, siendo insumo para la evaluación de diversos sistemas acoplados de microalgas/cianobacterias y lixiviados de relleno sanitario y promoviendo la transformación sostenible de los lixiviados en productos útiles en la industria.

---

\* \* Proyecto de investigación de Maestría.

\*\* Facultad de Ingenierías Físico Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Maestría en Ingeniería Química. Director: Crisóstomo Barajas Ferreira. Magister en ingeniería química. Codirector: Janet Bibiana García Martínez. Candidata a Dra. en ingeniería química

**ABSTRACT**

**Title:** Transformation of landfill leachate from Parque Tecnológico Ambiental Guayabal (Veolia Aseo Cúcuta S.A. E.S.P) into value-added products using microalgae and cyanobacteria \*

**Author:** María Daniela Ortiz Alvarez\*\*

**Keys Words:** Landfill leachates, Microalgae, Cyanobacteria, Exploitation, Culture systems.

**Description:** This research project evaluated the transformation process of the landfill leachate from Parque Tecnológico Ambiental Guayabal (Veolia Aseo Cúcuta S.A. E.S.P) into value-added products (lipids, carbohydrates, IAA's and PHB), using microalgae and cyanobacteria belonging to the strain bank of the UFPS's INNOValgae laboratory. The growth and metabolite content of sixteen strains were evaluated, identifying four with the greatest production potential, of which their growth in treated leachate and crude leachate at concentrations of 10% and 5% were analyzed, from which the last one was the best culture medium. An experiment design was developed in order to evaluate the impact of different factors (type of light, light cycle and strain), this allowed to determine a significant model for the response variables of lipids, carbohydrates, AIA and PHB, identifying the best conditions for each culture. When evaluating the improved conditions in cultures at a 20L pilot scale, positive results were obtained, reaching values of  $14.2 \pm 0.2\%$  w/w of lipids,  $65 \pm 1.7\%$  w/w of carbohydrates,  $3.5 \pm 0.0\%$  w/w of IAA's. and  $19.7 \pm 0.4\%$  w/w of PHB, being the first pilot-scale system in Colombia where the content of IAA's and PHB was identified. This study proved to be an innovative process at the national level and an important benchmark at the global level since it evaluates various coupled systems of microalgae/cyanobacteria and leachates from the landfill leachate, promoting the sustainable transformation of landfill leachates into useful products in the industry.

---

\* \* Master's research project

\*\*Faculty of Physical Chemical Engineering. School of Chemical Engineering. Master's in chemical engineering. Director: Crisostomo Barajas Ferreira. Master in chemical engineering. Co-director: Janet Bibiana García Martínez. PhD candidate in chemical engineering.

## Introducción

El lixiviado de relleno sanitario es un tipo de agua residual formada del proceso de descomposición de la materia presente en las masas de residuos junto con agua lluvia percolada, que contiene altas concentraciones de compuestos orgánicos e inorgánicos (Pinpatthanapong et al., 2022), como metales pesados, amonio, nitratos y otros compuestos nocivos (Fan et al., 2018), producto de procesos físicos y reacciones químicas y biológicas. Esos compuestos generan un impacto ambiental negativo alto, pues la exposición directa a ambientes acuáticos y terrestres generan eutrofización y toxicidad en cuerpos de agua a causa de la presencia de altas concentraciones de  $\text{NO}_3$ , Pb, Mn, Fe (León-Gómez et al., 2015), la alta demanda química de oxígeno (DQO) y la presencia de compuestos nitrogenados (Vinay Kumar et al., 2023); la pérdida de flora y fauna; la contaminación del suelo y la bioacumulación de metales pesados (Gonçalves et al., 2017; Tighiri & Erkurt, 2019).

A causa de la complejidad de los lixiviados, actualmente se han evaluado diferentes procesos físicos, químicos y biológicos con el fin de reducir el impacto ambiental. Algunos de los métodos más explorados son los procesos avanzados de oxidación, los biorreactores de membrana, los humedales construidos, la coagulación – floculación y los tratamientos electroquímicos (Vinay Kumar et al., 2023), sin embargo, no existe una eficiencia total y estos métodos presentan altos costos de materiales, equipos, productos químicos y eléctricos, sin ningún tipo de recuperación, haciéndolos insostenibles a largo plazo (Khanzada & Övez, 2017). Por tal motivo, se exploran diferentes métodos biológicos que presentan favorabilidad por su fiabilidad, sencillez y rentabilidad (Kumari et al., 2016). En la actualidad se ha desencadenado la búsqueda de alternativas sostenibles que permitan el manejo adecuado de este residuo, no solo bajo el aspecto de tratamiento, sino también de procesos que permitan la recuperación o la

reutilización de nutrientes con el fin de contribuir a los procesos de economía circular (Kurniawan et al., 2023) y valorizar los lixiviados para mitigar los costos de su manejo.

Las microalgas y cianobacterias son microorganismos fotosintéticos que viven en ambientes acuáticos, transforman el carbono inorgánico y utilizan nutrientes como nitrato y fosfato para producir su propia energía (Jaiswal et al., 2021; Song et al., 2022). El cultivo de estos microorganismos en aguas residuales ha ganado gran interés por su capacidad adaptativa que les permite crecer en condiciones diversas, pero sobre todo, por su capacidad de reutilizar nutrientes presentes en este tipo de aguas, permitiendo la reducción de contaminantes y la metabolización de diversos compuestos, mediante la producción de biomasa rica en lípidos, proteínas, carbohidratos y otros bioproductos (Haixing Chang et al., 2018; Franco-Morgado et al., 2023), los cuales son insumos para la generación de biocombustibles (Dogaris et al., 2019), biofertilizantes (Cao et al., 2023), bioplásticos (Mehariya et al., 2023), entre otros. Este proceso permite la transformación de nutrientes presentes en las aguas residuales, más específicamente en los lixiviados, por compuestos de valor agregado, lo que permite la valorización de un residuo no aprovechado en la actualidad (Franco-Morgado et al., 2023) y reduce los impactos ambientales del cultivo de microalgas en medios de cultivo estándar (Arashiro et al., 2022), reduciendo al mismo tiempo los costos a gran escala (Liao et al., 2018). Lo que se ha demostrado en especies como *Scenedesmus cf. Rubescens* y *Chlorella cf. Ellipsoidea* (Edmundson & Wilkie, 2013)

Diversas investigaciones han demostrado que utilizar lixiviados de rellenos sanitarios diluidos como medio de cultivo para el crecimiento de las cianobacterias y microalgas arroja resultados positivos en la producción de biomasa rica en metabolitos de interés (Haixing Chang et al., 2018; A Hernández-García et al., 2019). La alteración de nutrientes en el medio, como la

presente en los lixiviados (Wicker et al., 2022), junto a factores como la especie del alga y las condiciones de cultivo (Temperatura, pH, intensidad de luz, entre otros), promueven la producción de biomasa y el contenido de bioactivos útiles en sectores industriales (Chia et al., 2018), tales como, pigmentos en el sector farmacéutico y textil (J. Hu et al., 2018; Rubio Fernández et al., 2017), lípidos en el área de los biocombustibles (Ray et al., 2022), biomasa como biofertilizante agrícola (Saadat et al., 2023); y los biomateriales como polihidroxicanoatos (PHA) y polihidroxibutirato (PHB), usados como biopolímeros (García et al., 2021; Rueda & García, 2021). Basándose en lo anterior, la implementación de un sistema ajustado que permita la adecuación de las condiciones de cultivo para mejorar la producción de bioproductos es muy importante al momento de emplear las microalgas y cianobacterias (Wan et al., 2015).

No obstante, el principal inconveniente de utilizar lixiviados como medio de cultivo de microalgas y cianobacterias es la complejidad en la composición de estos, pues la presencia de compuestos tóxicos inhibe el crecimiento de las microalgas (H Chang et al., 2019). Por este motivo se plantean alternativas como el uso de lixiviados diluidos o pretratados que disminuyan la concentración de compuestos específicos y estabilicen el pH (D. Hu et al., 2021), sin embargo, la primera opción aumenta los costos y la segunda agrava la tensión del recurso hídrico, por lo cual se plantea la mezcla con otro tipo de aguas residuales para reducir el efecto tóxico (Nawaz et al., 2020; Tang et al., 2023). Los estudios evaluados a la fecha demuestran que el principal enfoque de las microalgas en cultivos de lixiviados se encamina al tratamiento de este residuo y aún son limitados aquellos que se ocupan de la transformación de este residuo en productos de valor agregado, lo cual aumenta el interés en esta área de estudio.

Con la presente investigación, se evaluó un proceso de transformación de lixiviados provenientes del Parque Tecnológico Ambiental Guayabal (Veolia Aseo Cúcuta S.A. E.S.P.) mediante el cultivo de microalgas y cianobacterias, donde se identificaron condiciones de cultivo que promovieron la obtención de lípidos, carbohidratos, fitohormonas y PHB. Este proceso se realizó con el fin de introducir los lixiviados en la cadena productiva como una fuente sostenible y ser pioneros en alternativas para el uso de los lixiviados dentro de los procesos de economía circular en Colombia.

## **1 Estado Del Arte**

Se realizó un análisis de avances del uso de microalgas en aguas residuales y un análisis bibliométrico del uso de microalgas en rellenos sanitarios, el cual, fue publicado en la revista de Ingeniería y Competitividad de la Universidad del Valle, Vol. 25, Núm. 2, el día 5 de mayo de 2023 (Ortiz Alvarez et al., 2023) y se presenta a continuación.

### **1.1 Uso de Microalgas en Aguas Residuales**

Las microalgas y cianobacterias han ganado popularidad por su capacidad de crecer bajo diferentes condiciones y entornos. Con el paso de los años, esta habilidad ha sido reportada en diversas investigaciones que han demostrado el uso de las microalgas como una herramienta para contribuir con el mejoramiento de la calidad del medio ambiente, mediante su cultivo en aguas residuales como proceso de fitorremediación y a través de la valorización de residuos líquidos como técnica sostenible (Anbalagan et al., 2015). En una búsqueda realizada en SCOPUS para los últimos 10 años se reportaron 4,984 documentos que describen procesos de cultivos de microalgas en aguas residuales, de los que 3,686 corresponden a artículos de investigación.

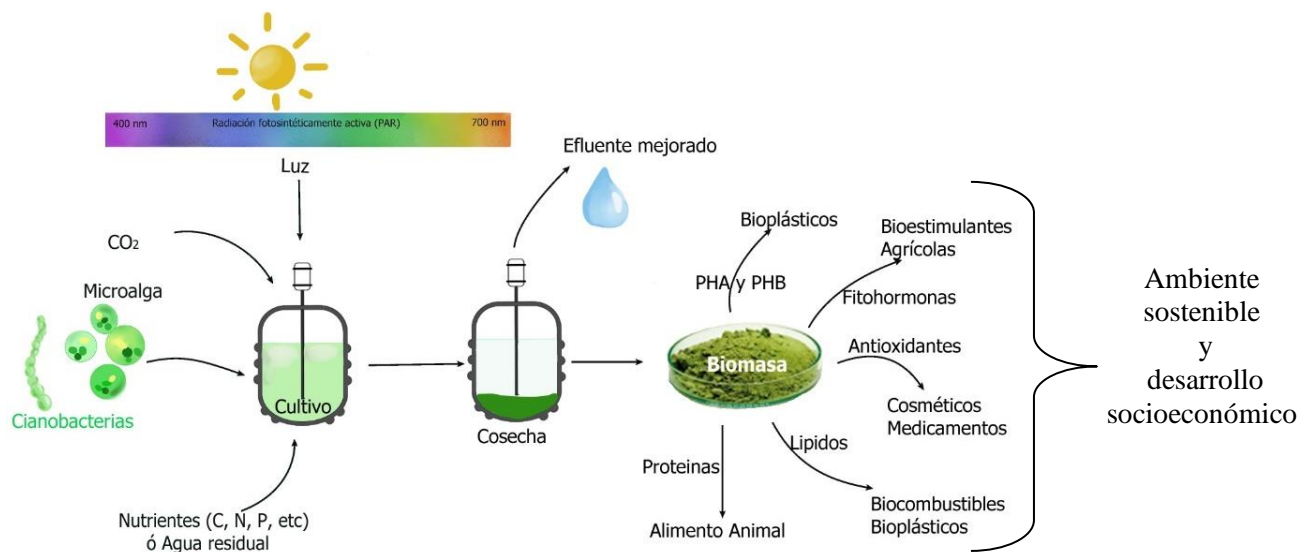
Los principales estudios enfocan sus investigaciones en el tratamiento de aguas residuales con microalgas, dando respuesta a la crisis de los recursos hídricos y la preocupación por la contaminación que está llevando a reevaluar los procesos convencionales para tratamientos (K. Li et al., 2019) y buscando alternativas para la obtención de biocombustibles y bioproductos (Christenson & Sims, 2011). Sin embargo, son limitados los resultados específicos para cianobacterias que se relacionan al tratamiento o aprovechamiento pues este enfoque tiene el auge en los últimos 5 años.

El principio del uso de microalgas en aguas residuales consta de diferentes etapas, la primera relacionada con su cultivo, fase en la que requieren una fuente de carbono, una fuente de

luz y una fuente de nutrientes, siendo esta última aportada por las aguas residuales, y los transforman en moléculas que promueven su crecimiento; la segunda etapa es la cosecha, en donde se busca el mayor crecimiento y la purificación del efluente; finalmente se extrae la biomasa producida para ser procesada y obtener diferentes metabolitos (Figura 1) (Su, 2021).

**Figura 1**

*Proceso de cultivo de microalgas*



*Nota:* (Ortiz Alvarez et al., 2023)

Con el fin de apreciar los avances del cultivo de microalgas en aguas residuales tanto para biorremediación como para aprovechamiento, en la tabla 1 se presenta un resumen de algunos artículos, en los que se muestran condiciones de cultivos, remociones y obtención de productos de valor agregado.

**Tabla 1***Utilización de microalgas en el tratamiento de aguas residuales*

Microorganismo	Agua residual	Condiciones de cultivo	Remociones	Producto de valor agregado	Referencia
<i>Chlorella vulgaris</i>	textil	Agua residual al 50%	80% de nitrógeno y fósforo.	Lípidos para biodiesel	(Fazal et al., 2021)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	doméstica	Adición de acetato de sodio	82.20 % de nitrógeno total 76.35% fósforo total	Lípidos	(J. Liu et al., 2021)
<i>Tetrademus obliquus</i> , <i>C. protothecoides</i> , <i>C. vulgaris</i> , <i>Synechocystis sp.</i>	porcina	Agua residual diluida 1:20	62-79% para DQO, 84-92% para TKN, 79-92% para NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> más del 96% para PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Biomasa como Bioestimulante	(Ferreira et al., 2021)
<i>Thermosynechococcus sp.</i>	porcina	Diferentes intensidades de luz, tipo de tratamiento del agua residual. Agua diluida	N/A	Ficobiliproteína y carotenoide	(Narindri Rara Winayu et al., 2021)
<i>Chlorella sp</i> y <i>C. vulgaris</i> *	textil	Condiciones mixotróficas Agua residual al a diferentes diluciones	80% NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 60% DQO	Lípidos	(Wu et al., 2020)
<i>Chlorella vulgaris G-9</i>	sintética	Relación TOC/TN de 24 y 30	90% de nitrógeno.	35.3 y 36.5% lípidos	(Gao et al., 2019)
<i>C. vulgaris</i>	doméstica primaria, secundaria y efluente de petróleo.	Mezcla de agua residual y medio standard. Concentraciones del 100%, 75%, 50% y 25%	80% para nitrógeno 100 para Fosforo	N/A	(Znad et al., 2018)
	doméstica	Enriquecido con carbono orgánico	90% NH <sub>3</sub> -N y PO <sub>4</sub> -P	N/A	(Evans et al., 2017)
<i>Scenedesmus sp.</i>	doméstica	Agua residual filtrada y estéril. Diferentes concentraciones de CO <sub>2</sub>	98% para NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , 70.2% para NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , 78.9% para PO <sub>4</sub> y 95.9% para DQO	33.3% de lípidos totales	(Nayak et al., 2016)
<i>C. vulgaris JSC-6</i>	porcina	Agua residual filtrada a diferentes concentraciones	91% nitrógeno 76% DQO	58% de carbohidratos	(Y. Wang et al., 2015)
<b>Consorcio (bacillariophyceae, chlorophyceae, cyanophyceae)</b>	doméstica	Agua residual filtrada y estéril	6% carbono orgánico 90%, nitrógeno total 89% NH <sub>4</sub> -N 70% fósforo total 76% fósforo	18% lípidos.	(Mahapatra et al., 2014)
<i>C. zofingiensis</i>	Porcina	Agua residual pretratada a diferentes concentraciones de DQO	65.81% - 79.84% para DQO, 68.96% - 82.70% para nitrógeno total y entre el 85.00% y el 100% para fósforo total	110.56 mg/L·d <sup>-1</sup> de lípidos	(Zhu et al., 2013)
<b>Consorcio de Spirulina sp., Oscillatoria sp., y Synechocystis sp.</b>	Curtiembre sintética	100 mg/L Cr <sub>3</sub>	100 % Cr <sub>3</sub>	N/A	(Shashirekha et al., 2011)

\* inmovilizadas en capsulas inmovilizadas de alginato.

Las aguas residuales domésticas y porcícolas han sido las de mayor uso en cultivos de microalgas, pues su carga orgánica es fuente de nutrientes para su crecimiento (Mennaa et al., 2015). La microalga más ampliamente utilizada es *Chlorella* por su capacidad de adaptarse a diferentes condiciones. Los resultados de las diferentes investigaciones demuestran la habilidad de las microalgas para tratar aguas residuales, así como también de producir metabolitos de valor agregado, con el fin de crear técnicas sostenibles, lo que las hace una herramienta prometedora para el uso con otros tipos de aguas residuales.

## **1.2 Metabolitos**

### ***1.2.1 Lípidos***

Diversos estudios han demostrado la capacidad de las microalgas de alterar sus rutas biosintéticas hacia la acumulación de lípidos en contenidos desde el 20 al 50 % p/p en lo que se refiere a la formación de biomasa (Q. Hu et al., 2008; Mishra et al., 2014). La composición de lípidos varía dependiendo de la especie de microalgas o cianobacteria y se ve afectada por las condiciones de cultivo, entre ellas la temperatura, la composición del medio, el ciclo de luz y la aireación, aumentando su contenido de lípidos entre un 10 a 20%. (Leal Medina et al., 2017). Se han reportado concentraciones de lípidos en porcentaje de peso seco entre 25% y 75% para cepas de *Dunaliella* y *Botryococcus* y 14% a 56% para cepas de *Chlorella* (Morais Junior et al., 2020)

### ***1.2.2 Carbohidratos***

Los carbohidratos en las algas verdes provienen en gran medida de los almidones presentes en los cloroplastos y la celulosa /polisacáridos provenientes de la pared celular (Ho et al., 2013). La cantidad de carbohidratos que se almacenan en las microalgas varían según su género y especie, así como la fase de crecimiento (Draaisma et al., 2013). Se han reportado

concentraciones de carbohidratos en porcentaje de peso seco entre 50% y 80% para cepas de *Dunaliella* y 10% a 58% para cepas de *Chlorella* (Morais Junior et al., 2020)

### **1.2.3 Fitohormonas**

Las fitohormonas son una clase de pequeñas moléculas que tienen como función ser mensajeros químicos en las actividades celulares, juegan un papel regulador en el metabolismo de las células, permitiendo un aumento en la tolerancia al estrés y mejorando la eficiencia fotosintética, así como la producción de biomasa y proteínas (C. Wang et al., 2022). Las microalgas pueden contener diferentes fitohormonas, dentro de las que se encuentran las citoquinas, giberelinas y auxinas. Dentro de esta última categoría se han registrado en las microalgas auxinas como el ácido indol-3- acético (AIA) (Braun & Colla, 2023).

### **1.2.4 PHB**

Los polihidroxialcanoatos (PHA) son una familia de poliésteres sintetizados de forma natural por diversos tipos de macroorganismos, pues se acumula intracelularmente y actúa como una fuente de carbono y energía que puede ser utilizada cuando crecen en condiciones desfavorables (Ferre-Guell & Winterburn, 2017). Debido a la característica de los PHA de ser biopolímeros, se consideran una alternativa viable a los plásticos sintéticos derivados del petróleo y tienen aplicaciones en campos como la agricultura, farmacéutica o industria alimentaria (Costa et al., 2019), el más común de los PHA es el Polihidroxibutirato (PHB), un tipo de polímero de cadena corta que a menudo se encuentra en bacterias (Lutzu et al., 2021)

Las cianobacterias producen en su mayoría PHB, los cuales bajo condiciones deficientes de fósforo alcanzan valores significativos, como es el caso de *Spirulina Platensis*, *Synechocystis* sp y *Nostoc Muscorum*. Por otra parte, cepas de *Synechocystis* sp, acumulan hasta un 14% en condiciones limitantes de nitrógeno, lo que demuestra que la acumulación de PHB está regulada

por la concentración de carbono, el pH, los ciclos de luz y las relaciones de fósforo y nitrógeno (Kaparapu, 2018). Normalmente, el contenido de PHB en las cianobacterias es del 10% en condiciones naturales, sin embargo, alterando las condiciones de cultivo se ha logrado obtener hasta un 55% con la cianobacteria *Synechococcus* sp en medio con deficiencia de fósforo (Dang et al., 2022)

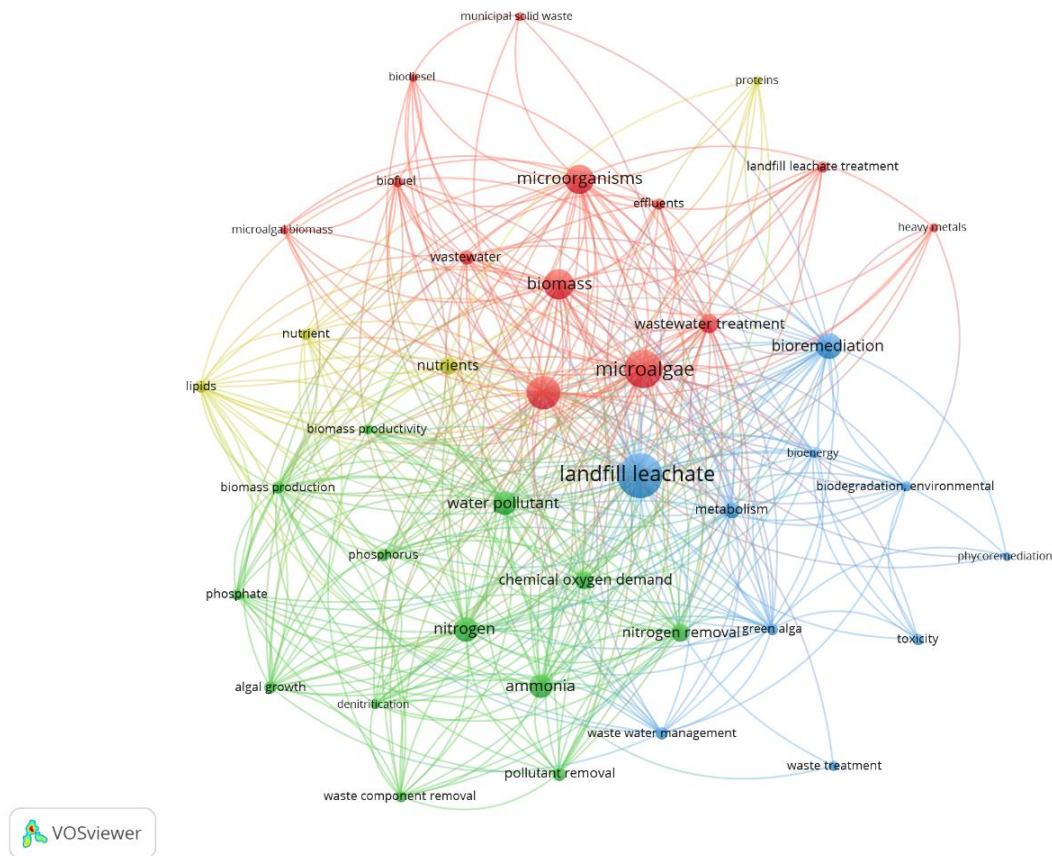
### **1.3 Análisis Bibliométrico para Uso de Microalgas en Lixiviados de Rellenos Sanitarios**

Los lixiviados son residuos líquidos con altas cargas de compuestos tóxicos que presentan gran impacto al medio ambiente (Ghosh et al., 2017), por lo que se resalta la necesidad de buscar diferentes alternativas para su manejo. Las microalgas se presentan como una alternativa para el tratamiento de los lixiviados, a pesar de los factores que demuestran la toxicidad de los lixiviados a hacia ellas (Pereira et al., 2016). La implementación de este tipo de tratamiento biológico se puede desarrollar mediante estrategias que permitan una mejor adaptabilidad, capacidad de tratamiento y su aprovechamiento (Khanzada & Övez, 2017).

Con el fin de entender el proceso que se ha implementado en el uso de lixiviados con cultivos de microalgas y de abarcar el panorama del estado del arte, se realizó una búsqueda sistemática en SCOPUS, incluyendo los artículos publicados en todo el mundo desde 1993 hasta el 2023, con fecha de recolección de datos del 10/04/2023. La ecuación de búsqueda fue: TITLE-ABS-KEY ("microalgae" AND "landfill leachate"). Con el fin de realizar el análisis de la información, se evaluó la frecuencia de las palabras claves empleando el software VOSviewer (versión 1.6.19, Leiden University, Leiden, The Netherlands) (van Eck & Waltman, 2010). El número mínimo de ocurrencias de palabras claves que se manejó fue de 5, con el fin de que los resultados fueran significativos debido a la limitada información al respecto. En este análisis cada esfera simboliza una palabra clave, su tamaño representa el número de apariciones, el color

indica la relación y categorización de las palabras y los enlaces señalan la relación de co-ocurrencia entre las palabras. Posteriormente se realizó un análisis de los resultados encontrados teniendo en cuenta: 1) documentos por año; 2) relevancia de los autores; 3) instituciones vinculadas; 4) áreas de estudio y 5) documentos por países.

En el análisis de correlación de palabras claves realizado en VOSviewer utilizando todos los artículos publicados, se encontraron 4 grandes grupos (figura 2), en donde los ejes centrales son los lixiviados de relleno y las microalgas. El primer grupo se enfoca en el uso de microalgas para el tratamiento de lixiviados mediante la remoción de compuestos y la producción de biomasa (Verde), el segundo grupo relaciona la producción de biomasa y la obtención biocombustibles (Rojo), el tercer grupo demuestra el uso de microalgas como indicador de respuestas tóxicas, debido a los compuestos químicos presentes en los lixiviados y su uso para biorremediación (Azul), finalmente se presenta un grupo más pequeño relacionado con la obtención de bioproductos (amarillo), lo que demuestra que la valorización de la biomasa aún se encuentra en desarrollo.

**Figura 2***Conexiones bibliométricas entre Microalgas y Lixiviados*

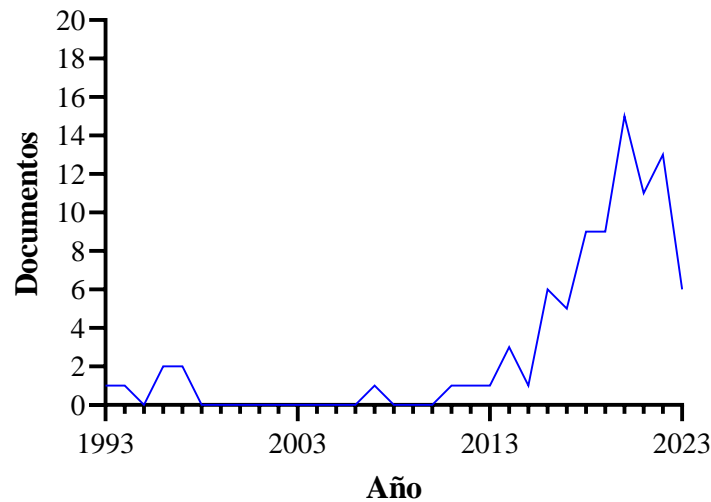
Se registraron un total de 1135 palabras, entre palabras clave de autor y palabras clave indexadas, de las cuales 79 aparecieron más de 5 veces. Las palabras clave con mayor incidencia fueron: “landfill leachate” (n=63), seguida de “microalgae” (n=49), “leachate treatment” (n=40), “biomass” (n=35) y “microorganism” (n=33)

De la búsqueda realizada en SCOPUS, se encontró un total de 88 artículos comprendidos entre los años 1993 -2023 (Figura 3), lo que comparado con los resultados obtenidos para aguas residuales abarca solo un 1.76 %. Se aprecia que las publicaciones antes del año 2011 se limitan a 7 y después de este año se presenta una tendencia creciente, encontrando su pico en el año

2020 con 15 artículos, sin embargo, es importante resaltar que el año 2023 se encuentra aún vigente.

### Figura 3

*Publicaciones por año*



El primer estudio en el año 1993 está relacionado con el efecto tóxico de los lixiviados en las microalgas *Chlorella pyrenoidosa*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus* sp. y *Dunaliella tertiolecta* (Cheung et al., 1993), al igual que los artículos encontrados para los años 1994, 1996 y 1997, pues estiman el efecto tóxico de los lixiviados de rellenos sanitarios mediante el uso de una prueba que contenían microorganismos, entre los que se encontraban las microalgas (Bernard et al., 1996, 1997; Lambalez et al., 1994; Sallenave & Fomin, 1997). Esto demuestra que los primeros usos de las microalgas se enfocaron en identificar la toxicidad de los lixiviados, sin considerarlos un recurso aprovechable.

Después de ello no se realizaron más estudios sino hasta el año 2007 en donde se comparó la tolerancia de microalgas aisladas de lixiviados y de agua limpia, a diferentes concentraciones de lixiviado (10 %, 30 %, 50 %, 80 %, 100 %), demostrando que en

concentraciones de hasta el 10 % hubo crecimiento de microalgas y reducción de nitrógeno amoniacal, ortofosfatos y DQO y para porcentajes superiores al 10% se presentó una inhibición en el crecimiento, atribuido al alto nivel de amoniaco (Lin et al., 2007), siendo éste, el primer estudio encontrado que relaciona las remociones de los contaminantes con el uso de microalgas en lixiviados, llegando a ser el segundo artículo más citado (118 citas) de la búsqueda solo después de dos artículos de revisión.

La tabla 2 muestra los 8 autores más relevantes con base en el número de publicaciones y se reporta el número de citas. El análisis resalta que este top de autores se divide en 3 grupos, pues sus publicaciones son colaboraciones. Demostrando que a la fecha los estudios se limitan a unos grupos de investigación específicos y comprenden los años 2016 al 2023.

**Tabla 2**

*Top de autores búsqueda SCOPUS*

Agrupación según colaboraciones	Top	Autor	<i>h</i> -índice	Documentos	Afiliación	# citas
1	1	Chang, H.	18	7	Chongqing University of Technology, China	245
	2	Zhong, N.	25	6	Universidad de Cádiz, España	244
	3	Quan, X.	22	3	Atlantic Technological University, Killybegs, Ireland	187
2	4	Touzet, N.	18	3	Universidad de Cádiz, España	114
	5	Paskuliakova, A.	6	3	Universidad de Cádiz, España	
3	6	Tonry, S.	5	3	Universidad de Cádiz, España	23
	7	Cantero, D.	32	3	Universidad de Cádiz, España	
	8	Ramírez, M.	21	3	Universidad de Cádiz, España	

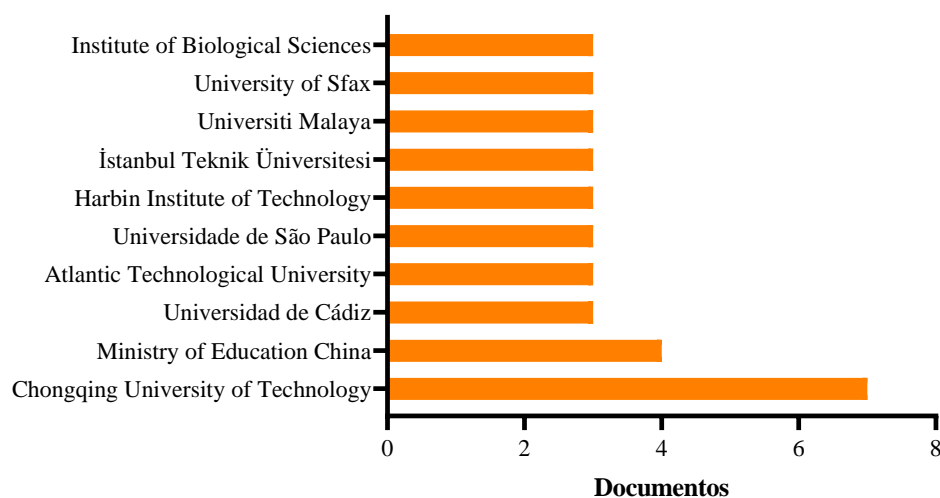
Los estudios realizados por el equipo de Zhong N., Chang H. y Quan X. se enfocaron en el uso de microalgas como tratamiento para los lixiviados, la recuperación de nutrientes como nitrógeno y fósforo, la producción de lípidos, biohidrógeno y ácidos grasos volátiles (AGV) (H Chang et al., 2019, 2023; Haixing Chang et al., 2018; Quan et al., 2020). Touzet N.,

Paskuliakova A. y Tonry S. abarcan solamente la fitorremediación del lixiviado sin realizar búsqueda de metabolitos (Paskuliakova et al., 2016, 2018b, 2018a). Finalmente los estudios realizados por Centero D. y Ramirez M. se relacionan a la implementación de microalgas aisladas de lixiviados de rellenos sanitarios, sin contemplar inicialmente el uso de los lixiviados como medio de cultivo; sin embargo para su último estudio lo implementan en un sistema de producción de biogás (Callejo-López et al., 2020; Saldarriaga et al., 2020, 2021).

La figura 4 muestra las instituciones vinculadas a procesos de investigación con microalgas y lixiviados, siendo en total 144 instituciones participantes. En este contexto se puede evidenciar que la institución principal es la Chongqing University of Technology encabezando la lista con 7 publicaciones, lo que se relaciona directamente con los resultados obtenidos para autores, puesto que los principales contribuyentes están vinculados a esta institución. Esta misma relación la guardan la Universidad de Cádiz y la Atlantic Technological University, siendo las afiliaciones más relevantes.

#### Figura 4

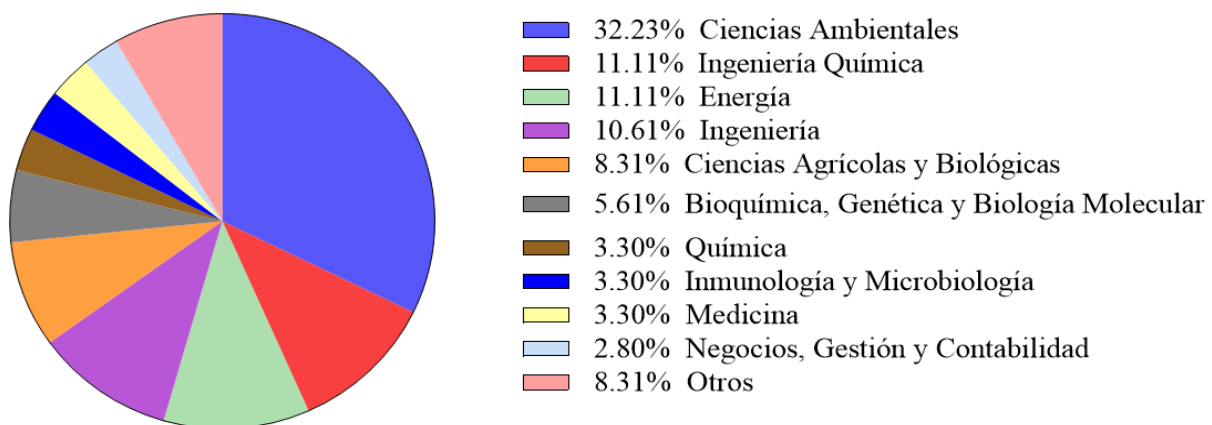
*Contribuciones por afiliación*



En total hay 18 áreas de estudio que han contribuido en investigaciones relacionadas con el cultivo de microalgas en lixiviados, tal como lo muestra la figura 5, de las cuales las principales son: ciencias ambientales con 58 publicaciones, ingeniería química con 20, energía con 20, ingeniería con 19 y ciencias agrícolas y biológicas con 15 publicaciones. El hecho de que el área de ciencias ambientales abarque un 32.2 %, demuestra el enfoque que se le ha dado en los últimos años, pues aunque es un campo relativamente nuevo, las principales investigaciones abarcan aspectos del mejoramiento de la calidad del medio ambiente al implementar procesos de fitorremediación de un residuo altamente complejo aunque se encuentre a escala laboratorio o piloto (Nawaz et al., 2020). Así mismo se muestra el uso de microalgas como una adición sostenible de aprovechamiento de lixiviados (Sforza et al., 2015).

**Figura 5**

*Documentos por área de estudio*



Las principales investigaciones en el área de ciencias ambientales abarcan directamente el uso de microalgas como herramienta para el tratamiento de lixiviados (Casazza & Rovatti, 2018; Elmaadawy et al., 2020). Por otra parte, se muestra el uso de microalgas como una adición sostenible de aprovechamiento de lixiviados (A Hernández-García et al., 2019; Sforza et al., 2015) orientada a la obtención de energía (Cheah et al., 2016), fijación de carbono (Zhao et al.,

2014) y obtención de metabolitos (Nordin et al., 2017; Paiva et al., 2021). En otros aspectos se exponen diferentes artículos de revisión y capítulos de libros en donde se muestra su prospección como tratamiento de lixiviados (Abdel-Shafy & Mansour, 2018) y fuente de materia prima para biocombustibles (Callegari et al., 2020).

De igual manera la influencia de las contribuciones por países se presenta en la tabla 3, en donde se detallan los 10 países con mayor producción bibliográfica, siendo China quien ocupa el primer lugar con 21 documentos. Así mismo se describe el número de artículos enfocados solamente a tratamiento de lixiviados de rellenos sanitarios con microalgas y el número de aquellos que buscan aprovechar los lixiviados para la generación de metabolitos, los demás documentos no contemplados hacen referencias a capítulos de libros, revisiones bibliográficas, procesos de aislamiento o análisis de toxicidad.

**Tabla 3**

*Países con mayores contribuciones*

<b>País</b>	<b>Documentos</b>	<b># citas</b>	<b>Año de inicio</b>	<b>Artículos relacionados a tratamiento</b>	<b>Artículos relacionados con Aprovechamiento</b>
<b>China</b>	21	609	2007	9	10
<b>Malasia</b>	9	234	2012	7	0
<b>EE. UU</b>	8	260	2014	4	3
<b>Brasil</b>	7	61	2014	4	3
<b>Italia</b>	6	187	2015	2	1
<b>España</b>	5	40	2020	2	0
<b>Turquía</b>	5	102	2017	3	1
<b>España</b>	4	10	2020	1	0
<b>Colombia</b>	4	19	2016	0	1
<b>India</b>	4	129	2016	3	0

Los estudios reportados en China presentan una mayor tendencia a la investigación relacionada con procesos de aprovechamiento, por otra parte, EE.UU. y Brasil se relacionan

directamente con el tratamiento de aguas residuales, sin embargo, alrededor de la mitad de los artículos reportan procesos de aprovechamiento de lixiviados en simultaneo con la remediación de los mismos, por otro lado, el panorama cambia para los demás países, pues su principal enfoque es el tratamiento (Shaari et al., 2021). Los estudios reportados en Colombia solo abarcan temas de aislamiento de microalgas para implementarlas en un modelo matemático de captura de CO<sub>2</sub> (Saldarriaga et al., 2020) y de identificación en un sistema de biorremediación de lixiviados a escala piloto asociado al relleno sanitario Presidente ubicado en el Valle del Cauca (Sardi-Saavedra et al., 2016; Sardi Saavedra et al., 2018), no obstante, los resultados del proceso de biorremediación no se encuentra reportados en un artículo indexado a la búsqueda. Finalmente, el último estudio reportado en Colombia abarca la producción de biogás en un sistema mixto implementado microalgas y lixiviado como medio de cultivo (Saldarriaga et al., 2021). Lo cual demuestra que el enfoque de aprovechamiento para los lixiviados con microalgas aún es un tema en desarrollo, a pesar de la importancia que se le da a este aspecto en los cultivos de microalgas con aguas residuales en general.

Con base en los análisis realizados anteriormente y con el fin de apreciar mejor la relación entre microalgas y lixiviados, en la tabla 4 se describen algunos de los artículos más citados en los últimos 10 años, sin tener en cuenta aquellos relacionados con test de toxicidad o artículos de revisión.

**Tabla 4**

*Artículos relevantes en el uso de microalgas en lixiviados de rellenos sanitarios*

Microorganismo	Citas	Condiciones de cultivo	Remociones	Producto de valor agregado	Referencia
Consortio de microalgas ( <i>Desmodesmus</i> spp. <i>S. obliquus</i> ) y bacterias	112	Mezcla de agua residual y lixiviado. Dilución del 0, 7%, 10%, y 15% de lixiviado en AR	82% de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> y 43% ortofosfatos	20% lípidos, 41% carbohidratos.	(A Hernández-García et al., 2019)

<i>C. pyrenoidosa</i> y bacterias	109	Mezcla de agua residual doméstica enriquecida con Lixiviado al 0, 5% 10 %, 15% y 20% (ideal 10%)	90% nitrógeno total	24.1 mg/L·d de lípidos	(Zhao et al., 2014)
<i>C. vulgaris</i>	94	En fotobiorreactor de membrana	-	Recuperación del 50% de N y 70% de P. 10 mg/L·d de lípidos para biocombustibles	(Haixing Chang et al., 2018)
<i>C. vulgaris</i> , <i>S. quadricauda</i> , <i>E. gracilis</i> , <i>A. convolutus</i> <i>Ch. oviforme</i>	64	Lixiviado pretratado diluido hasta 50%	91% DQO, 99.9% nitrógeno amoniacal y 86% ortofosfatos	N/A	(Mustafa et al., 2012)
<i>Scenedesmus</i> sp. <i>Paenibacillus</i> sp.	62	Lixiviado al 20%	Reducción de compuestos orgánicos, citotoxicidad y genotoxicidad	N/A	(Kumari et al., 2016)
2 cepas de <i>Chlamydomonas</i> sp y 2 cepas de, <i>Scenedesmus</i> sp	56	Lixiviado crudo, del proceso y tratado. Dilución al 10% en agua desionizada	51.7 % nitrógeno amoniacal	N/A	(Paskuliakova et al., 2016)
<i>C. vulgaris</i>	38	Lixiviado pretratado bajo 3 procesos diferentes	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> y P	N/A	(Pereira et al., 2016)
<i>S. obliquus</i>	37	Técnica integrada de ozonización y biorremediación	81.6% de N	N/A	(Quan et al., 2020)
Cultivo mixto microalgas-bacterias	26	Lixiviado diluido entre el 5% y 20%	Máxima de 9.18 mg N /L·d	N/A	(Sniffen et al., 2016)

De los diferentes resultados se aprecia la implementación de cultivos mixtos con bacterias, lo que se atribuye a la habilidad de las microalgas para la eliminación de nutrientes y metales pesados, proporcionando O<sub>2</sub>, que es utilizado por las bacterias para degradar compuestos orgánicos (Kumari et al., 2016). Otro factor importante es la relación N:P, para garantizar la estabilidad del proceso, pues las grandes cantidades de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pueden inhibir el crecimiento (Pereira et al., 2016), al igual que las concentraciones por encima de los 80 mg N-NH<sub>3</sub>/L (Sniffen et al., 2016) y la limitación de fósforo (Paskuliakova et al., 2016). Esto se evidencia en

la necesidad de realizar pretratamientos al lixiviado o diluciones con el fin de disminuir el efecto inhibitor, en donde diversos estudios demuestran que la concentración más apropiada de dilución para el uso de lixiviados se encuentra en el 10% (Zhao et al., 2014) siendo *Chlorella* sp. la cepa más tolerante comparada con *Scenedesmus* sp. (El Ouaer et al., 2017). Para cianobacterias los estudios son más limitados, pues solo se reportó un artículo dentro de la búsqueda en el cual se emplearon junto con otros filos como Proteobacteria, Bacteroidetes y Chlorophyta como cátodos para la producción de energía y eliminación de nutrientes (H. T. H. Nguyen & Min, 2020).

Lo anterior demuestra que el principal enfoque que se le ha dado en los últimos años a las microalgas y cianobacterias es el tratamiento de los lixiviado, pues los estudios en aprovechamiento aún son limitados a pesar de obtener resultados prometedores. Esto hace que esta área sea de gran interés para su exploración, con el fin de cambiar el concepto actual que se tiene de los lixiviados como un residuo sin valor y transformarlo en un residuo altamente aprovechable, así mismo, identificar y estudiar más las condiciones de cultivo para el mejoramiento de este proceso es aún más prometedor.

#### **1.4 Lixiviados y Microalgas en Colombia**

En Colombia la información referente a los lixiviados de rellenos sanitarios es limitada y su enfoque es la problemática ambiental que causan en los diferentes rellenos sanitarios, por lo cual los procesos relacionados con ellos se enfocan hacia el tratamiento con el fin de mitigar los impactos ambientales. Diversas empresas han generado estrategias para su tratamiento, entre las que se destacan tratamientos físicos, fisicoquímicos y algunos procesos biológicos con consorcios de microorganismos, siendo el sistema de ósmosis inversa el más implementado (Tabla 5) (García, 2019).

**Tabla 5***Tipos de tratamiento de lixiviados en Colombia*

<b>Nombre del vertedero</b>	<b>Ubicación</b>	<b>Descripción/detalle</b>
Parque Ambiental La Pradera	Municipio de Don Matías, a 57 kilómetros de Medellín	Sistema de tratamiento de lixiviados que posee tres etapas: - Tratamiento físico - Tratamiento fisicoquímico - Biorreactores con membrana – MBR.
Planta de lixiviados del Carrasco	Bucaramanga	Plantas de membrana de separación - Sistema de ósmosis inversa con vibración mecánica - Sistema de ósmosis inversa con espirales estáticos
Relleno Sanitario Nuevo Mondoñedo	Bojacá	Sistema biológico - Sistema de tratamiento de ósmosis y nano filtración
Relleno Sanitario Colombo – El Guabal,	Yotoco, Valle del Cauca	- Sistema de tratamiento de ósmosis inversa
Relleno Sanitario Regional presidente	Buga	- Sistema de tratamiento de ósmosis inversa con sistema de vibración (VSEP)
Relleno Sanitario de Navarro	Santiago de Cali	- Pretratamiento fisicoquímico - Sistema de tratamiento de ósmosis inversa
Parque Tecnológico Ambiental Guayabal	Cúcuta	Sistema de tratamiento de ósmosis inversa

*Nota:* Adaptado de García, 2019

Sin embargo, los métodos expuestos son costosos y algunas veces ineficaces, como los reportados por Canizales et al. (2013) para el relleno Doña Juana (Bogotá) con su sistema de tratamiento con humedales y para el relleno sanitario de Navarro (Cali). Por esta razón, diversas instituciones han guiado sus investigaciones a procesos de mejora en los tratamientos de estos residuos con el fin de brindar alternativas más eficientes. En este contexto, se desarrolló una investigación utilizando un sistema combinado de electrodisolución de hierro, oxidación de hierro por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y floculación química para lixiviados provenientes del relleno sanitario “El

Carrasco” (Bucaramanga), obteniendo remociones del 85 %, 96 % y 76 % para DQO, color y turbidez respectivamente (Donneys-Victoria et al., 2018). En Medellín se estudiaron diferentes procesos fisicoquímicos, siendo la oxidación de Fenton la más prometedora, con remoción de hasta un 95 % y 97 % para DQO y color respectivamente (Canizales et al., 2013), así como se evaluó la viabilidad de biorremediación con bacterias (Gomez et al., 2011). En Valle del Cauca se evaluó el efecto de acumulación de Cd (II), Hg (II), Cr (VI) y Pb (II) de plantas (*Gynerium sagittatum*, *Colocasia esculenta* y *Heliconia psittacorum*) en humedales artificiales para el tratamiento de lixiviados provenientes del Relleno Sanitario Regional presidente (Madera-Parra et al., 2015).

En Norte de Santander son limitados los estudios realizados; sin embargo, en el año 2020 se evaluó un acople de un proceso de fotocátalisis con  $\text{TiO}_2$  y un sistema biológico aeróbico de lodos activos, proporcionando remociones del 68 % y 76 % para DQO y carbono orgánico disuelto (Becerra et al., 2020). Todo lo anterior demuestra que el aprovechamiento de este residuo para producción de metabolitos y el uso de microalgas como sistema principal no se han contemplado aún. A nivel bibliográfico no se reportan estudios indexados relacionados con la implementación de microalgas en cultivos de lixiviado para su aprovechamiento. Sin embargo, en línea con el estudio reportado en Norte de Santander, se está desarrollando por parte del Laboratorio INNOValgae perteneciente a la Universidad Francisco de Paula Santander, sede Cúcuta, un proyecto que busca evaluar el acople de un sistema de fotocátalisis con cultivos de microalgas con el fin de valorizar los lixiviados de relleno sanitario orientado a la producción de metabolitos como bioplásticos, biofertilizantes para cultivos no alimentarios y colorantes.

## 2 Planteamiento del problema

Los rellenos sanitarios son la tecnología más ampliamente utilizada para la disposición de residuos sólidos en el mundo, ya que es un método simple y asequible. Sin embargo, producto del proceso de degradación de los residuos almacenados en las celdas de disposición, la percolación de las aguas lluvias y las variaciones fisicoquímicas generadas por la interacción entre compuestos y microorganismos, se obtienen los denominados lixiviados (Deng et al., 2021). Este residuo puede contener  $\text{CH}_4$ , ácidos grasos volátiles, compuestos refractarios, macrocomponentes inorgánicos como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , metales pesados y compuestos orgánicos xenobióticos (Ghosh et al., 2017) (Luo et al., 2020).

Esta composición varía dependiendo de factores como: la edad de los lixiviados, los niveles de precipitación, las variaciones climáticas estacionales, el tipo de residuos y su composición, el contenido de humedad de los residuos y el tipo de tecnología propia de cada relleno sanitario, afectando la calidad de los mismos (Omar & Rohani, 2015). Esta variación los hace residuos altamente complejos de disponer, y al no ser tratados adecuadamente pueden filtrarse al suelo y al agua subterránea, causando problemas ambientales y de salud. Dentro de los principales efectos se encuentran: la contaminación de aguas subterráneas, la alteración y reducción de la permeabilidad del suelo, la contaminación de aguas superficiales y la alteración de la flora y fauna (Mukherjee et al., 2015). Estos efectos sumados al incremento en la producción de residuos y por ende de lixiviados, son un verdadero reto para los entes gubernamentales y las empresas de disposición final, por lo cual, implementar estrategias que reduzcan el riesgo ambiental del sector es una prioridad.

En la actualidad se han implementado diversos métodos que permiten la reducción de la carga contaminante de los lixiviados con el fin de evitar que estos residuos terminen

directamente en los ecosistemas, dentro de los que se contemplan métodos biológicos (Sistemas aerobios y anaerobios), métodos fisicoquímicos (Precipitación química, floculación/coagulación, procesos de membranas, etc.) (Nawaz et al., 2020) y la combinación de tratamientos con procesos biológicos (Pereira et al., 2016). Siendo los tratamientos fisicoquímicos los mayormente implementados en Colombia (García, 2019). No obstante, estos procesos requieren altos costos a causa de la implementación de productos químicos, equipos y materiales, muchas veces sin obtener resultados positivos o limitándose a mejorar las condiciones del efluente sin ningún tipo de recuperación, lo que los hace insostenibles a largo plazo (Khanzada & Övez, 2017). Esto se ve reflejado en los enfoques regulatorios actuales para el manejo de lixiviados de rellenos sanitarios, pues consideran la reducción de la caracterización fisicoquímica del lixiviado, más no incentiva la búsqueda de alternativas que permitan el aprovechamiento de estos.

Con base en esto y teniendo en cuenta la composición de los lixiviados, diversas investigaciones han avanzado en procesos de recuperación de compuestos tales como nitrógeno, fósforo (Kurniawan et al., 2021) y metales pesados (Lee et al., 2022) con el fin de incorporarlos a la cadena de valor, sin embargo, son reducidos los enfoques que promueven la obtención de bioactivos mediante la conversión del lixiviado. Razón por la cual, es de gran importancia explorar tecnologías que permitan la transformación de los lixiviados de rellenos sanitarios en productos de valor agregado, promoviendo el mejoramiento de la calidad del medio ambiente y contribuyendo a la aplicación de la economía circular en el manejo de este residuo.

### 3 Justificación

La búsqueda de tecnologías que permitan la valorización de residuos líquidos ha ganado gran interés en los últimos años, siendo la biotecnología con microalgas y cianobacterias una técnica sostenible en auge (Anbalagan et al., 2015). Las microalgas y cianobacterias son microorganismos fotosintéticos capaces de vivir en diversos ambientes acuáticos, lo que les permite crecer en diversos tipos de aguas residuales, como municipales, agrícolas e industriales (Su, 2021) incluso en lixiviados de rellenos sanitarios (Porto et al., 2021). Esto se atribuye a la capacidad adaptativa de las microalgas y cianobacterias que les permite asimilar los contaminantes de las aguas residuales como nutrientes para su crecimiento, el cual es 100 veces más rápido que el de las plantas terrestres (Hariz et al., 2019).

Su principal enfoque ha sido como tecnología verde en el tratamiento de aguas residuales (Shaikh Abdur Razzak et al., 2017), sin embargo, la capacidad de metabolizar productos de alto valor agregado ha ganado gran interés. Lo anterior es atribuido a su alta tasa de producción de biomasa, compuesta principalmente por proteínas (30% - 50%), carbohidratos (20% - 40%) y lípidos (8% - 15%) que actúan como fuente de energía bajo condiciones de crecimiento normales (de Farias Silva & Sforza, 2016). No obstante, la variación en las condiciones de cultivo a causa de cambios en la concentración de nutrientes, temperatura, pH y la limitación de una fuente de luz, pueden alterar significativamente la producción de biomasa y bioactivos, permitiendo la acumulación de otras sustancias como biopolímeros (Costa et al., 2019) y pigmentos (Sun et al., 2019). Esta característica las posiciona como una alternativa significativa para la transformación de residuos líquidos en productos de valor agregado para diversos sectores industriales.

El cultivo de microalgas y cianobacterias en lixiviados ha llamado la atención de diversas investigaciones en los últimos años, sin embargo, su principal enfoque se relaciona con la

remoción de contaminantes (Nawaz et al., 2020) y los estudios que se orientan al aprovechamiento de los mismos, se refieren a la producción de lípidos para biocombustibles (Haixing Chang et al., 2018). Por lo cual, la exploración de estos procesos para la extracción de otros metabolitos de interés como biopolímeros, carbohidratos y fitohormonas, es una alternativa innovadora y sostenible para la comercialización de estos subproductos y la conversión de los mismos, en energía o productos químicos de interés industrial, lo que junto a la capacidad adaptativa de las microalgas permite la optimización del proceso, reduciendo los costos operativos (Rizwan et al., 2018).

La búsqueda de alternativas ecológicas para el uso de los lixiviados tiene como finalidad introducir un residuo no aprovechable actualmente (Economía lineal) dentro de un proceso de valorización de los recursos, bajo las estrategias de economía circular. Esto permite la innovación en el proceso de transformación de lixiviados y la apertura de negocios sostenibles mediante el uso de bioproductos, basados en la riqueza del capital natural, la optimización del uso de recursos y armonizado con los objetivos de desarrollo sostenible, teniendo como indicadores el porcentaje de reutilización de agua y el aprovechamiento de biomasa (Gobierno de la República de Colombia, 2019)

Por consiguiente, se hace necesario el desarrollo de un proceso de investigación en este campo que permita la innovación en procesos de transformación de lixiviados, incursionando en la obtención de metabolitos de interés comercial mediante el uso de microalgas y cianobacterias, permitiendo introducir este residuo líquido dentro del proceso de valorización de economía circular nacional e internacional, mitigando el impacto al medio ambiente y promoviendo procesos sostenibles de generación de productos de interés comercial.

#### **4 Hipótesis**

A partir del estudio de condiciones de crecimiento de microalgas y cianobacterias en lixiviados del Parque Tecnológico Ambiental Guayabal (Veolia Aseo Cúcuta S.A. E.S.P.), es posible evaluar un sistema a escala de 20L que permita la transformación de lixiviados en lípidos, carbohidratos, fitohormonas AIA y PHB.

#### **5 Pregunta de Investigación**

¿Cuáles son las mejores condiciones de cultivo a partir del uso de lixiviados para la transformación de lixiviados del Parque Tecnológico Ambiental Guayabal (Veolia Aseo Cúcuta S.A. E.S.P.), a partir de cultivos de microalgas y cianobacterias provenientes de la Universidad Francisco de Paula Santander (UFPS) que permitan la generación de metabolitos de interés comercial?

## **6 Objetivos**

### **6.1 Objetivo General**

Evaluar el proceso de transformación de lixiviados del Parque Tecnológico Ambiental Guayabal (Veolia Aseo Cúcuta S.A. E.S.P.), en productos de valor agregado mediante el uso de microalgas y cianobacterias.

### **6.2 Objetivos Específicos**

- Identificar las cepas con mayor potencial en la producción de lípidos, carbohidratos, fitohormonas AIA y PHB del banco de cepas de la UFPS en cultivos con lixiviados.
- Analizar el crecimiento de las cepas promisorias de microalgas y cianobacterias utilizando lixiviado tratado y lixiviado diluido al 5% y 10%.
- Determinar las condiciones de operación (tipo de luz, ciclo de luz y cepa) del sistema de cultivo con microalgas o cianobacterias, que favorezcan la obtención de lípidos, carbohidratos, fitohormonas AIA y PHB de la biomasa producida.

## 7 Alcance

Este proyecto se realizó implementando microalgas y cianobacterias del cepario del laboratorio INNOValgae de la Universidad Francisco de Paula Santander (UFPS) y se utilizaron las instalaciones de este laboratorio.

Los lixiviados fueron proporcionados por parte de la empresa Veolia Aseo Cúcuta S.A E.S.P del Parque Tecnológico Ambiental Guayabal.

## 8 Metodología

### 8.1 Selección de Cepas Productoras de Lípidos, Carbohidratos, Fitohormonas AIA y PHB del Banco de Cepas de la UFPS en Lixiviado al 5%

Con el fin de seleccionar las cepas productoras de metabolitos, se cultivaron reactores madre de las microalgas y cianobacterias en medios Bold Basal y BG11 respectivamente, disponibles en el cepario del laboratorio de INNOValgae de la Universidad Francisco de Paula Santander en reactores de capacidad de 500 mL con un volumen útil de 300 mL, bajo una temperatura de  $25 \pm 4$  °C, un caudal de aire de 0.6 L/L, radiación de 900 lúmenes y fotoperíodo de 12:12 durante 20 días, tiempo bajo el cual las microalgas alcanzaron una densidad de inóculo de  $\pm 0.7$  DO (Densidad óptica medida a una absorbancia de 550 nm). En el caso de las cianobacterias debido a sus propiedades filamentosas no es recomendable medir la DO por lo que se estableció los 20 días como condición principal para los inóculos, de acuerdo con estudios previos realizados en el Laboratorio INNOValgae.

Para proceder a la fase de selección se implementaron reactores con volúmenes finales de 300 mL, los cuales contenían 270 mL de lixiviado diluido al 5% con agua destilada (concentración que tuvo en cuenta el volumen final del reactor) y 30 mL de inóculo de la cepa evaluada, equivalente al 10% del volumen final. Las condiciones de operación (temperatura, caudal de aire, radiación, fotoperíodo y tiempo de cultivo) se mantuvieron con relación a los cultivos madre. Así mismo, se empleó como control los resultados obtenidos del cultivo de las cepas en los medios Bold Basal y BG11.

Posteriormente, se realizó la cosecha y cuantificación de la biomasa al día 20 de cultivo, para finalmente, evaluar el contenido de lípidos, carbohidratos, fitohormonas y PHB de la

biomasa cosechada. A continuación, se describen los métodos para la cuantificación de biomasa y metabolitos.

### 8.1.1 Cuantificación de biomasa

- Al finalizar el tiempo de cultivo se centrifugó la totalidad del volumen contenido en el reactor a 4 °C y 4000 rpm durante 10 min.
- Una vez centrifugado se retiró el sobrenadante y la biomasa obtenida se depositó en recipientes de silicona, los cuales se llevaron al deshidratador a 40 °C por 24 h.
- Posteriormente los recipientes se colocaron en el desecador durante 15 min.
- Finalmente, la biomasa se retiró de los recipientes y se pesó. Los datos obtenidos fueron reemplazados en la siguiente fórmula

$$\text{Concentración de biomasa (g/L)} = \frac{\text{Peso de la biomasa (g)}}{\text{Volumen filtrado (L)}} \quad (1)$$

### 8.1.2 Cuantificación de lípidos totales

El método de sulfo-fosfo vainillina, adaptado al método de Frings & Dunn (1970), es uno de los más utilizados y se fundamenta en una catálisis ácida de los lípidos con formación de iones carbono, éstos, en presencia de sulfo-fosfo vainillina generan coloraciones que permiten ser determinados espectrofotométricamente.

Obtención del reactivo de sulfo-fosfo-vainillina

- Se disolvió 0.6 g de vainillina en 10 mL de etanol absoluto
- Se agregaron 90 mL de agua desionizada y se agitó vigorosamente por 2 min
- Se añadieron 400 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a la mezcla, se agitó y almacenó en oscuridad para su uso.

Preparación de la muestra

- Se tomaron entre 0.5 mg – 1 mg de biomasa seca.
- Se agregaron 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y se calentaron a 100 °C durante 10 min.
- Las muestras se enfriaron en baño de agua fría por 5 min.
- Se mezclaron con 5 mL del reactivo de sulfo-fosfo-vainillina recién preparado e incubaron a 37 °C, 200 rpm durante 15 min.
- Se midió a una longitud de onda de 530 nm

Los lípidos presentes en la muestra se determinaron teniendo en cuenta la siguiente ecuación:

$$\text{lípidos totales } (\mu\text{g}) = (\text{OD } 530 - 0.0236)/0.0106 \quad (2)$$

Esta ecuación se obtuvo de una curva de calibración realizada con extractos de lípidos de microalgas (SIGMA ALDRICH), como solución patrón, en las instalaciones del laboratorio INNOValgae de la Universidad Francisco de Paula Santander.

### 8.1.3 Cuantificación de carbohidratos

El método propuesto por Dubois et al en 1956 se fundamenta en la condensación de productos fenólicos a través de compuestos derivados del furano bajo condiciones previas de deshidratación y catálisis ácida, permitiendo su medida a longitudes de onda de 485 nm.

Preparación de la muestra

- Se tomaron entre 0.8 mg – 1.5 mg de biomasa seca, se depositaron en tubos de ensayo resistentes al ácido (FALCON)
- Se agregaron 0.5 mL de solución 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se homogeneizó la muestra en vórtex por 2 min.
- Se completó el volumen hasta 5 mL con 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e incubó la muestra en baño maría 100 °C durante 1 hora.
- Se removió el tubo del baño maría y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos, seguido por centrifugación (4000 rpm, 5 °C por 10 minutos)
- En tubos de vidrio, se agregó 2 mL de sobrenadante, 1 mL de fenol al 5% agitando vigorosamente, rápidamente se adicionó 5 mL de solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y se agitó la muestra empleando córtex a velocidad media por 1 min
- La muestra se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- En una celda de cuarzo se depositaron 2 mL de muestra y se leyó a 485 nm

Los carbohidratos totales se calcularon utilizando la siguiente ecuación

$$\text{Azúcares totales } (\text{mg/mL}) = (0.0116 \times \text{OD } 485) + 0.0712 \quad (3)$$

Esta ecuación se obtuvo de una curva de calibración realizada con glucosa (estándar de referencia, SIGMA ALDRICH), como solución patrón, en las instalaciones del laboratorio INNOValgae de la Universidad Francisco de Paula Santander.

#### **8.1.4 Cuantificación de Fitohormonas AIA**

Método de medición de AIA extracelulares de Salkowski modificado por Bric et al 1991,

Reactivo Salkowski modificado

HCl concentrado 142 mL

Agua destilada 250 mL

FeCl<sub>3</sub> 0.5 M en H<sub>2</sub>O destilada 7.5 mL

Preparación de la muestra

- Se tomó 1 ml del sobrenadante obtenido del proceso de centrifugación en la cuantificación de la biomasa y se adicionaron 4 ml de reactivo de Salkowski.
- Se agitó la solución y se dejó incubar a temperatura ambiente por 30 min.
- La absorbancia fue medida a 530 nm.

$$\text{Concentración de AIA (mg/mL)} = (0.019 \times OD530) - 0.0073 \quad (4)$$

Esta ecuación se obtuvo de una curva de calibración realizada con ácido Indol acético (AIA) (SIGMA ALDRICH), como solución patrón, en las instalaciones del laboratorio INNOValgae de la Universidad Francisco de Paula Santander.

#### **8.1.5 Cuantificación de PHB**

Método adaptado de Getachew & Woldesenbert (2016).

- Se tomaron entre 3-7 mg de biomasa seca en un tubo donde la biomasa fue tratada con 10 mL de hipoclorito de sodio y se incubó a 30 °C por 2 h.
- La mezcla fue centrifugada a 4000 rpm por 15 min, posteriormente el pellet fue lavado con 10 mL agua destilada y centrifugado a las mismas condiciones. Ese mismo procedimiento se realizó con 10 mL de acetona y 10 mL de metanol respectivamente.

- El pellet fue disuelto en 5 mL de cloroformo.
- En una celda de cuarzo se depositaron 2 mL de muestra y se midió a 240 nm

$$PHB \text{ (mg/mL)} = \frac{OD_{240} + 0.3066}{6.9756} \quad (5)$$

Esta ecuación se obtuvo de una curva de calibración realizada con una solución patrón de PHB (SIGMA ALDRICH), en las instalaciones del laboratorio INNOValgae de la Universidad Francisco de Paula Santander.

Los métodos empleados son ampliamente utilizados en literatura, adicional a ello, fueron estudiados y evaluados por el laboratorio INNOValgae mediante soluciones de referencia (SIGMA ALDRICH) con alta confiabilidad e implementados en diferentes estudios bajo diversas condiciones, por lo que representan un buen nivel de especificidad. Es importante resaltar que los metabolitos evaluados se reportaron en %p/p en relación con la biomasa.

#### **8.1.6 Selección de cepas de microalgas y cepas de cianobacterias**

La selección de las cepas se definió mediante una matriz de ponderación. Teniendo en cuenta que, no se encontraron contenidos de fitohormonas ni PHB, en la matriz solo se relacionó el contenido de lípidos, carbohidratos y la concentración final de biomasa obtenida. La matriz se dividió en dos grupos, uno para cianobacterias y otro para microalgas y de cada uno se seleccionaron las dos cepas con mayor puntuación de cada grupo. Teniendo en cuenta que el contenido de PHB sólo se identifica en cianobacterias y aunque en esta etapa no se encontró este metabolito, se seleccionaron cepas de cianobacterias con el fin de evaluar el contenido de PHB bajo otras condiciones de cultivo que pueden promover su aparición. Se definió un valor de 33.33% a cada variable, en donde este porcentaje equivale a valor máximo obtenido de cada variable.

## 8.2 Cultivo de cepas de microalgas y cepas de cianobacterias en lixiviados tratados

Se realizó un diseño experimental para evaluar el crecimiento de las cepas a diferentes condiciones de lixiviado tratado, en donde se tuvo en cuenta como variables del diseño: 4 condiciones operativas del tipo de tratamiento (censurado por patente), pH del lixiviado, dilución del lixiviado y cepa. Se evaluaron un total de 135 experimentos distribuidos en 5 bloques, donde la variable de respuesta fue la producción de biomasa, este diseño se llevó a cabo en tubos falcon de 50 mL con volúmenes útiles de 30 mL y las siguientes condiciones de crecimiento: temperatura de  $25 \pm 4$  °C, agitación mecánica de 200 rpm, intensidad de  $75 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y fotoperíodo luz: oscuridad de 12 h:12 h durante 15 días. Este cambio en el tiempo de cultivo se realizó porque después de los 15 días de cultivo se inhibió el crecimiento.

Definidas las condiciones del lixiviado tratado y las microalgas y cianobacterias, se evaluó el crecimiento de las cepas y la producción de metabolitos utilizando lixiviados tratados (método en proceso de patente por parte del laboratorio de INNOValgae) en reactores de capacidad de 500 mL con 270 mL de lixiviado tratado y 30 mL de inóculo de cada microalga o cianobacteria. Los reactores se mantuvieron bajo una temperatura de  $25 \pm 4$  °C y un caudal de aire de 0.6 L/L, con radiación de 900 lúmenes, intensidad de luz de  $75 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fotoperíodo luz: oscuridad de 12 h:12 h, durante 15 días. Así mismo, se evaluó el crecimiento de las cepas con lixiviado al 5% y 10%, teniendo en cuenta el nuevo tiempo de cultivo.

Finalmente, se cuantificó el contenido de lípidos, carbohidratos, fitohormonas AIA y PHB presentes en cada una de las cepas bajo los 3 medios de cultivo descritos anteriormente. Esto determinó la capacidad metabólica de las microalgas y cianobacterias de contener productos de interés industrial. Teniendo en cuenta que en la primera etapa no se encontró contenido de fitohormonas extracelulares, se decidió evaluar el contenido de fitohormonas intracelulares, por

lo cual, al procedimiento descrito en la primera fase metodológica para extracción de este metabolito, se incluyó una primera etapa de destrucción celular con los siguientes pasos:

- Se tomaron entre 3 - 5 mg de biomasa seca.
- Se agregaron 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y se calentaron a 100 °C durante 10 min.
- Las muestras se enfriaron en baño de agua fría por 5 min.
- Los siguientes pasos correspondieron a la metodología descrita en la primera etapa metodológica.

### **8.3 Diseño de experimentos de variables de crecimiento para la producción de lípidos, carbohidratos, fitohormona AIA y PHB**

#### ***8.3.1 Diseño de experimentos***

Con el fin de mejorar la producción de metabolitos de las cepas elegidas, se desarrolló una serie de cultivos donde se variaron 3 factores (1 factor numérico y 2 factores categóricos): condiciones lumínicas, tipo de luz (Luz blanca y Luz Roja-Azul 3:1) y fotoperíodo luz: oscuridad (12 h:12 h y 24 h :0 h); y la cepa a utilizar. Con este fin se realizó un diseño de experimentos tipo I-optimal acoplado con superficie de respuesta, con 5 bloques mediante el software Design Expert (Versión 13) para un total de 28 experimentos más 3 réplicas. Los cultivos se llevaron a cabo bajo una temperatura de  $25 \pm 4$  °C y un caudal de aire de 0.6 L<sub>aire</sub>/min.L. Las variables de respuestas fueron: la concentración de biomasa (g/L), el % p/p de lípidos, el % p/p de carbohidratos, el % p/p de AIA y % p/p PHB, las cuales se determinaron a los 15 días de cultivo.

**Tabla 6***Condiciones diseño experimental*

Factor	Nombre	Unidades	Tipo	Subtipo	Mínimo	Máximo	Código bajo	Código alto	Media
A	Ciclo de luz	h	numérica	Continua	10.00	24.00	-1 ↔ 10.00	+1 ↔ 24.00	17.40
B	LED	Longitud de Onda	Categoría	Nominal	Roja:Azul 1 3:1	Blanca			Nivel:
C	Cepa			Nominal	Alga1	Cyano2			Nivel:

### 8.3.2 Evaluación de cultivos en reactores de 20 L de la mejor condición de cultivo

Con base en el análisis de los resultados obtenidos del diseño de experimentos en su última etapa de crecimiento de las microalgas y/o cianobacterias bajo las mejores condiciones, se realizó la evaluación de un cultivo en reactores cónicos de 30 L, con volumen útil de 20L, fabricados con columna de burbujeo, los cuales son específicos para el cultivo de microalgas.

Dentro de las ventajas de estos reactores se encuentran:

- Columna de burbujas que permite el intercambio de microalgas entre zonas de luz y oscuridad.
- Mejor transferencia de luz al cultivo, porque las burbujas permiten la agitación directa.

Así mismo, se identificaron los siguientes parámetros:

La productividad de biomasa ( $P_b$ ) y la productividad del metabolito (Tighiri & Erkurt, 2019) se calculan mediante las ecuaciones 6 y 7.

$$P_b \text{ (g/L}\cdot\text{d)} = \frac{C - C_0}{t - t_0} \quad (6)$$

$$\text{Productividad metabolito (g/L}\cdot\text{d)} = P_b \cdot C_f \quad (7)$$

Donde  $C_0$  es la concentración inicial o concentración a un tiempo específico ( $t_0$ ) y  $C$  es la concentración de biomasa a tiempo final ( $t$ ).  $C_f$  representa el contenido final del metabolito (dado en %)

## 9 Resultados

### 9.1 Selección de Cepas con Altos Contenidos de Lípidos, Carbohidratos, Fitohormonas AIA y PHB del Banco de Cepas de la UFPS en Lixiviado al 5%.

Se utilizó como medio de cultivo el lixiviado proveniente de la piscina 3 del PTAG. Al ser un lixiviado medio, se atribuyen unas cantidades sustanciales de materia orgánica, lo que promueve la formación de ácidos grasos volátiles (AGV) y se caracteriza por tener niveles moderadamente elevados de DQO, TOC y DBO y una relación DBO/DQO aproximada de 0.7 (El-Saadony et al., 2023), lo cual se evidencia en la tabla 7.

**Tabla 7**

*Caracterización de los lixiviados y su comparativo con los medios estándar*

Variable	Crudo	5%	Bold Basal	BG11
Amoniaco (mg NH <sub>3</sub> -N / L)	970	48.50	-	-
Fosfatos (mg PO <sub>4</sub> -P / L)	131.2	6.56	163.02	16.62
Nitratos (mg NO <sub>3</sub> -N / L)	664.56	33.23	182.36	1091.20
DQO (mg O <sub>2</sub> / L)	5024	251,2	-	-
DBO (mg O <sub>2</sub> / L)	3114	155,7	-	-
TOC (ppm)	107972.15	5398.61	-	-
DBO/DQO	0.620	0.62	-	-

Se cultivaron 7 cepas de cianobacterias y 9 cepas de microalgas pertenecientes al cepario del laboratorio de INNOValgae de la Universidad Francisco de Paula Santander (Figura 6). Cianobacterias del género *Hapalosiphon* sp. (UFPS\_02) y *Oscillatoria* Sp. (UFPS\_01, UFPS\_03, UFPS\_04, UFPS\_05, UFPS\_08) y microalgas del género *Chlorella* sp. (UFPS\_12, UFPS\_14, UFPS\_15, UFPS\_16, UFPS\_17, UFPS\_18, UFPS\_19, UFPS\_20) y *Scenedesmus* sp. (UFPS\_13). Después de transcurridos los 20 días de cultivo se evaluó la concentración de biomasa de cada una de las cepas y se comparó con los resultados obtenidos en medio estándar (Figura 7).

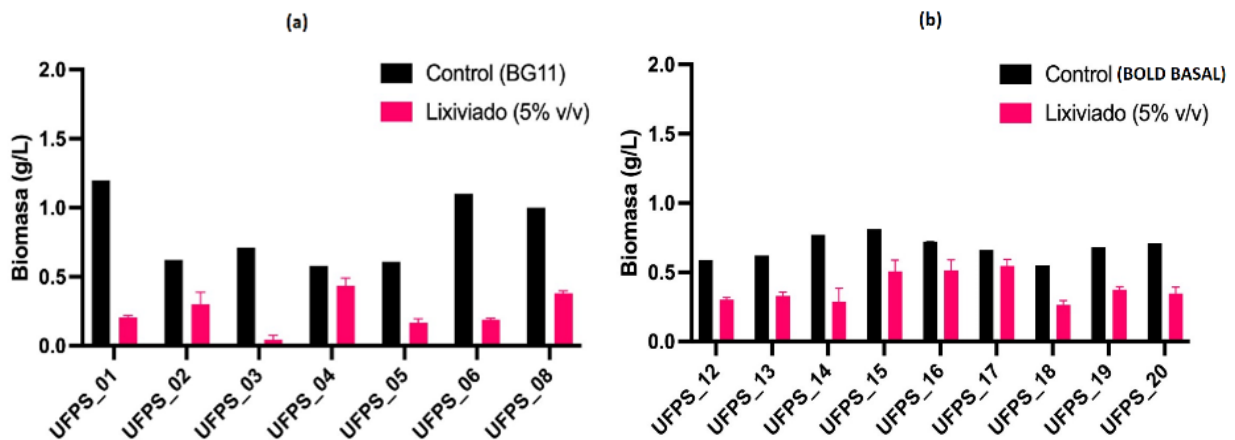
**Figura 6**

*Cultivo de cianobacterias (a) y microalgas (b) en lixiviados al 5%*



**Figura 7**

*Concentración de biomasa (g/L) en cianobacterias (a) y microalgas (b)*



Al comparar los resultados con el control se apreció una disminución significativa de la concentración en la mayoría de las cepas, debido a que el control es un medio específico para estos microorganismos, sin embargo, se destaca los resultados de las cepas UFPS 04, 16 y 17, que obtuvieron valores cercanos a los observados en BG11 Y BOLD BASAL. Con el fin de recrear condiciones más cercanas a la práctica, no se realizó esterilización del medio, lo cual evita los costos en procesos de esterilización del lixiviado a escala mayor. En estudios donde el

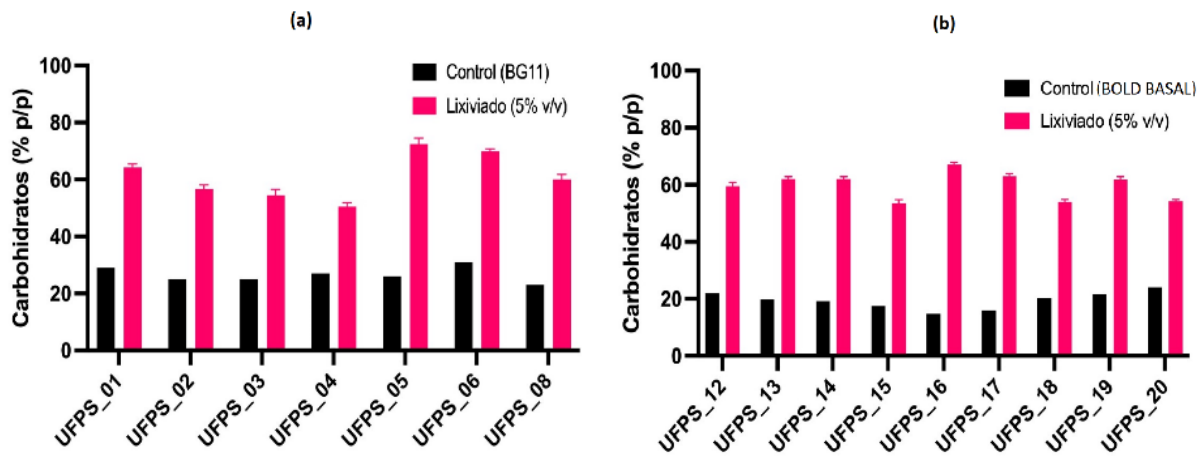
uso de un cultivo mixto de microalgas y bacterias en lixiviados no estériles se obtuvo como resultados una concentración de biomasa de 0.48 g/L (Sniffen et al., 2016), valor similar al reportado en el presente estudio para las cepas UFPS\_04, 15, 16 y 17 con una concentración de 0.40 g/L, 0.46 g/L, 0.47 g/L y 0.52 g/L respectivamente.

Diversos estudios a escala laboratorio resaltan el papel de las bacterias en la remineralización de macronutrientes, micronutrientes y el aporte de CO<sub>2</sub>, lo que promueve el crecimiento de las microalgas y el contenido de metabolitos (Lian et al., 2018), y le otorga un cierto grado de protección a las microalgas de los compuestos tóxicos (Díaz et al., 2022), pues emulan ecosistemas naturales y establecen un equilibrio dinámico (Kazamia et al., 2014; Wicker et al., 2022; Zhang et al., 2020). Sin embargo, existe el riesgo de una interacción negativa a causa de la competencia por los nutrientes del medio. Teniendo en cuenta esos factores, actualmente no se conoce a profundidad el efecto en entornos industriales a gran escala, por tanto, se hace necesaria la evaluación de estos sistemas con un diseño bien construido, que reduzca costos y permita comprender mejor los beneficios o riesgos de las asociaciones entre estos microorganismos (Okurowska et al., 2021).

Después de obtenida la biomasa seca a los 20 días de cultivo, se evaluó el contenido de carbohidratos (Figura 8), lípidos (Figura 9), fitohormonas y PHB, con el fin de comparar los resultados para cada cepa.

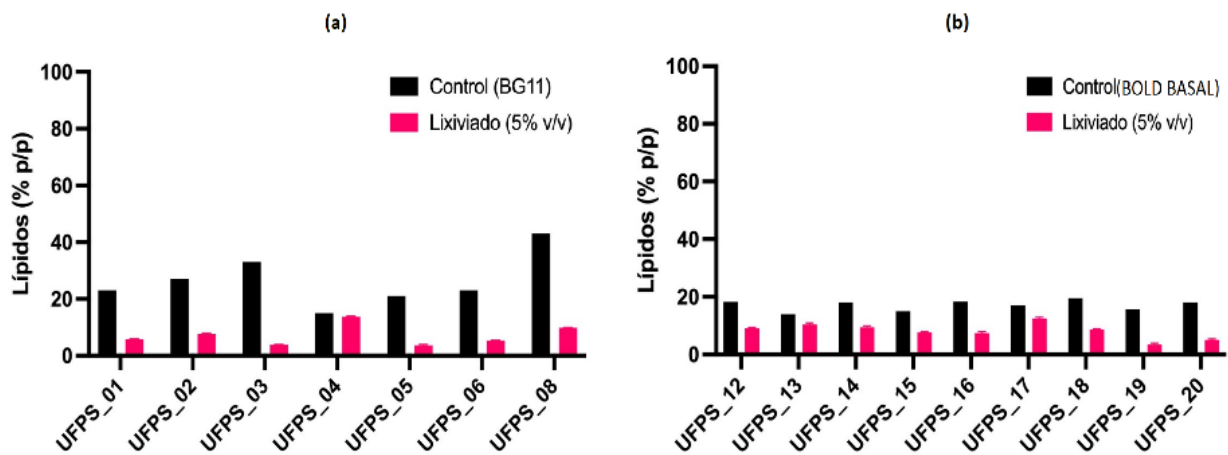
**Figura 8**

*Contenido de carbohidratos (% p/p) en cianobacterias (a) y microalgas (b)*



**Figura 9**

*Contenido de lípidos (% p/p) en cianobacterias (a) y microalgas (b)*



Los resultados arrojaron contenidos de carbohidratos entre el 51.3% - 73.6 % p/p para cianobacterias y el 52.7% - 66.5% p/p para microalgas. Por otra parte, los contenidos de lípidos oscilaron entre el 3.4% - 13.5% p/p para cianobacterias y el 3.2% - 12.3% p/p para microalgas. Se ha demostrado que al utilizar aguas residuales con altos contenidos de carbono orgánico y una relación N/P relativamente adecuada se promueve el crecimiento y la acumulación de metabolitos, demostrando la viabilidad de este tipo de aguas como sustrato, con el fin de reducir los costos de operación (R. Liu et al., 2022)

En esta fase no se evidenció contenido de fitohormonas externas y PHB, por lo cual, la selección de las cepas se definió mediante una matriz de ponderación en la que se relacionó el contenido de lípidos, carbohidratos y la concentración final de biomasa obtenida (Tabla 8). Para esta matriz se dividieron los resultados en dos grupos, uno para cianobacterias y otro para microalgas, de donde se seleccionaron las dos cepas con mayor puntuación de cada grupo, esto con el fin de garantizar dos cepas de cianobacterias a las cuales se les evaluará el contenido de PHB en las siguientes etapas. Se definió un valor máximo de 33.33% al mayor valor obtenido de cada variable.

**Tabla 8**

*Matriz de ponderación para selección de cepas*

Grupo	Cepa	Carbohidratos (% p/p)	Puntuación %	Lípidos (% p/p)	Puntuación %	Biomasa g/L	Puntuación %	TOTAL
Cianobacterias	UFPS_01	65.0	29.4	5.7	14.0	0.2	16.5	60.0
	UFPS_02	57.5	26.0	7.5	18.4	0.3	20.9	65.3
	UFPS_03	55.6	25.2	3.8	9.4	0.0	2.2	36.8
	UFPS_04	51.3	23.2	13.5	33.3	0.4	33.3	89.9
	UFPS_05	73.6	33.3	3.4	8.3	0.2	12.5	54.2
	UFPS_06	70.5	31.9	5.2	12.7	0.2	15.3	59.9
	UFPS_08	61.0	27.6	10.0	24.6	0.4	30.9	83.2
	Microalgas	UFPS_12	58.8	29.5	9.0	24.3	0.3	19.0
UFPS_13		61.5	30.8	10.2	27.7	0.3	20.1	78.7
UFPS_14		61.6	30.9	9.2	24.9	0.2	14.9	70.7
UFPS_15		52.7	26.4	7.5	20.5	0.5	29.5	76.3
UFPS_16		66.5	33.3	7.2	19.5	0.5	30.2	83.1
UFPS_17		62.4	31.3	12.3	33.3	0.5	33.3	97.9
UFPS_18		53.4	26.7	8.6	23.3	0.2	15.7	65.8
UFPS_19		61.3	30.7	3.2	8.6	0.4	23.1	62.4
UFPS_20		53.9	27.0	4.9	13.4	0.3	20.4	60.8

Los resultados de la matriz exaltaron la viabilidad de utilizar las cepas UFPS\_04 y UFPS\_08 de cianobacterias y las cepas UFPS\_16 y UFPS\_17 de microalgas, lo que las hace ideales al momento de cultivarlas bajo otras condiciones con el fin de promover el aumento en los contenidos de los metabolitos. Esto demuestra la capacidad de especies de los géneros

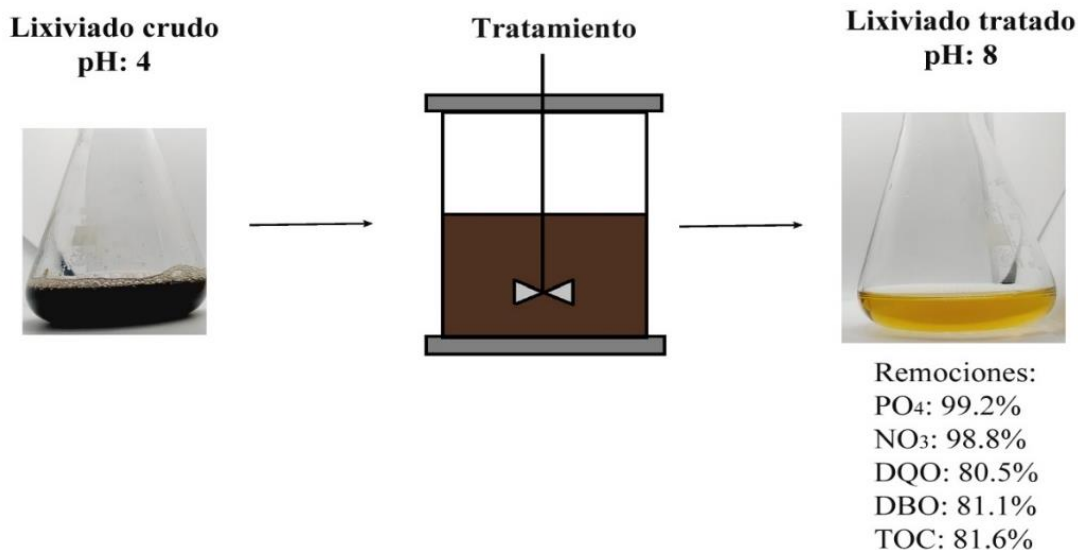
*Chlorella* y *Oscillatoria* para adaptarse a cultivos con contenidos de lixiviados de relleno sanitario (Martínez-Ruiz et al., 2022; Nordin et al., 2017)

## 9.2 Cultivo de Cepas de Microalgas y Cepas de Cianobacterias en Lixiviados Tratados

Del diseño experimental realizado a diferentes condiciones de lixiviado tratado, en donde se tuvo en cuenta como variables del diseño: 4 condiciones operativas del tipo de tratamiento (proceso desarrollado por UFPS y en proceso de patentamiento), el pH del lixiviado, la dilución del lixiviado y la cepa, los resultados obtenidos arrojaron un modelo estadísticamente significativo donde las variables incidentes se relacionan directamente a las condiciones operativas del tratamiento; así mismo, los resultados arrojaron que no se requiere diluir el lixiviado tratado para ser utilizado como medio de cultivo y no se evidenció una cepa determinante en la generación de biomasa (*Nota: El tipo de tratamiento y los resultados detallados de esta fase no son publicados debido a un acuerdo de confidencialidad firmado con el laboratorio INNOValgae por proceso de patente*). El tratamiento elegido demostró una adecuada eficiencia en la remoción de compuestos (Figura 10).

### Figura 10

*Esquema del tratamiento de los lixiviados y las remociones obtenidas*



Al comparar los resultados de este tratamiento con otro tipo de tratamientos para lixiviados de rellenos sanitarios reportados por El-Saadony et al. (2023), lo cuales presentan tasas de remoción de DBO y DQO del 99% y 79% para reactores biológicos de membrana, 84% y 75% para reactores batch, 77% y 49% para filtros percolados y del 73.8% de DQO para floculación/fenton, se demuestra que si a la hora de implementar una escala mayor del tratamiento es posible mantener estas tasas de remoción, se puede competir con otros tipos de tratamiento.

Teniendo en cuenta los porcentajes de remoción obtenidos y al evaluar las concentraciones de fosfatos y nitratos al finalizar el proceso (1.04 mg PO<sub>4</sub>-P / L y 8.89 mg NO<sub>3</sub>-N / L), se aprecia que el tratamiento disminuye significativamente estos compuestos, lo cuales, al compararse con las concentraciones del medio con el lixiviado al 5% y los medios estándar podría llegar a ser un limitante al momento de cultivar las microalgas, tanto para la etapa de cosecha de la biomasa como para la evaluación del contenido de metabolitos.

Posteriormente, y con base en los resultados obtenidos, se procedió a realizar experimentos con lixiviado al 5%, 10% y tratado con las cepas seleccionadas (Figura 11), con el fin de evaluar que tanto afectan estos medios de cultivo la obtención de metabolitos.

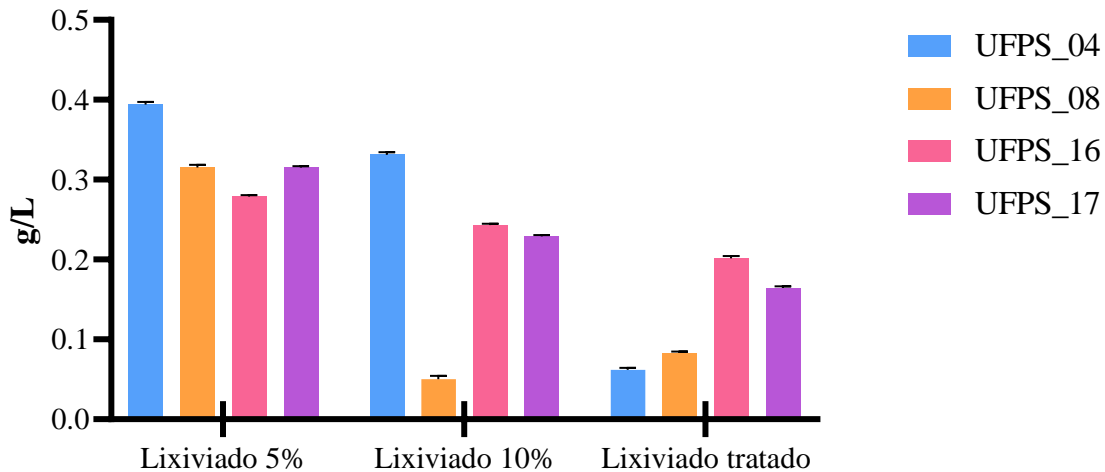
### Figura 11

*Cultivo de microalgas y cianobacterias bajo diferentes condiciones de lixiviado*



**Figura 12**

*Concentración de biomasa bajo diferentes condiciones de lixiviado*



La Figura 12 muestra la concentración de biomasa para las 3 condiciones de lixiviado con cada una de las cepas evaluadas, arrojando los mejores resultados con lixiviado al 5% y más específicamente con la cepa UFPS\_04, con la que se obtuvo una concentración de  $0.394 \pm 0.002$  g/L de biomasa seca. Esto se atribuye a que a concentraciones de lixiviado al 10% o más, existe una inhibición en el crecimiento debido a la presencia de altos contenidos de compuestos tóxicos que se acumulan en la célula. La presencia de una concentración de amoníaco de  $97 \text{ mg NH}_3\text{-N / L}$  en el lixiviado al 10%, supone una inhibición causada por la toxicidad, pues se estima que concentraciones superiores a  $80 \text{ mg NH}_3\text{-N / L}$  generan este efecto (Sniffen et al., 2016). Otro factor influyente es la reducción significativa de la disponibilidad de luz, lo que puede inhibir la fotosíntesis. Esto ha sido demostrado en un estudio donde implementaron una concentración del lixiviado al 10% y al 20% con 200 mL de solución, el cual concluyó que la disponibilidad de luz se redujo en un 47%- 62% y en un 71%-80% respectivamente (Okurowska et al., 2021).

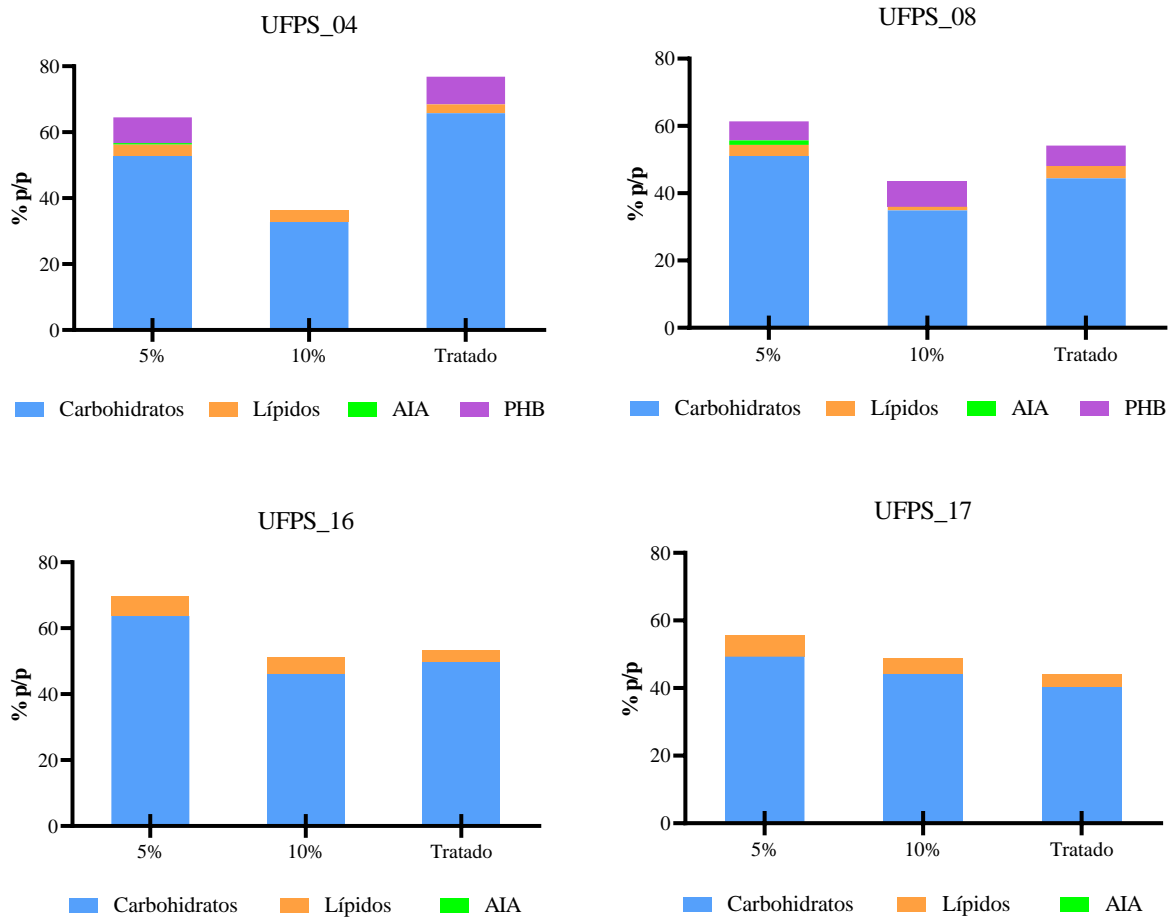
De forma similar, los resultados obtenidos con el lixiviado tratado también presentaron inhibición, sin embargo, la inhibición en este tipo de medio se da por la presencia de bajos

contenidos de compuestos necesarios para el crecimiento de las microalgas y cianobacterias, como lo son los fosfatos y nitratos (Shaikh A Razzak et al., 2022). Resultados obtenidos con otro tipo de tratamiento no convencional mediante el uso de cenizas para tratar lixiviados, mostró remociones en un rango de DQO de 18-62 %, nitrógeno de 63-71% y fósforo de 15-100% y al ser utilizado sin dilución para el crecimiento de *Chlorella vulgaris* obtuvo una concentración de biomasa de 1.23 g/L (Viegas et al., 2021). Concentración de biomasa muy superior a las obtenidas en este proyecto, sin embargo, se atribuye a que las remociones del tratamiento no fueron tan eficientes, lo que permitió mayor disponibilidad de nutrientes para el cultivo con microalgas.

En la figura 13 se evidencian los contenidos de metabolitos para cada cepa, teniendo en cuenta los diferentes medios utilizados. Los resultados demostraron que en las cepas 8, 16 y 17 existe menor contenido de metabolitos al ser cultivadas en lixiviado al 10% y lixiviado tratado, al ser comparados con los resultados del cultivo en lixiviado al 5%, presentando la misma tendencia que la concentración de biomasa descrita anteriormente, atribuido a los mismos factores. Por otra parte, en las cepas 4, 8 y 16 existe mayor capacidad de metabolizar nutrientes en lixiviado tratado que en lixiviado al 10%. La cepa 4 demostró mayor contenido de metabolitos con lixiviado tratado, aunque la concentración de biomasa fue la más baja. Esto se debe a la capacidad de la cepa de acumular estos compuestos para conservar energía en situaciones de inhibición de crecimiento por limitación de nutrientes.

**Figura 13**

*Contenido de metabolitos bajo diferentes condiciones de lixiviado*



Para todas las cepas en los diferentes medios de cultivo, la composición más predominante fue de carbohidratos con valores entre el 32.8 % - 65.8% para UFPS\_04, 34.9% - 51% para UFPS\_08, 45.8% - 63.7% para UFPS\_16 y 40.2% - 49.32% para UFPS\_17; siendo el lixiviado al 5% el medio predominante para los valores más altos, exceptuando para UFPS\_04. Resultados reportados por Feng et al. (2022) demostraron una composición intracelular de carbohidratos de 26.4 a 28.9% a diferentes concentraciones de lixiviado (5%, 10%, 15% y 20%) con la microalga *Chlorella vulgaris*, siendo el mayor valor obtenido con lixiviado al 20%, demostrando contenidos muy inferiores a los reportados en el presente estudio. No obstante,

aunque el método de cuantificación de carbohidratos en ambos estudios tiene el mismo principio y el contenido de DQO en el medio es similar, es importante resaltar que la concentración de nitratos y fosfatos varía significativamente en ambos estudios, pudiendo ser la causa en la diferencia de los resultados. Con relación al contenido de los metabolitos en lixiviado tratado, aunque los resultados son menores comparados con el lixiviado al 5% siguen siendo mejores comparados con el lixiviado al 10%, demostrando que a pesar de que la concentración de biomasa se ve afectada, se demuestra un buen contenido de metabolitos, obteniendo hasta un 65.7%, 2.7% y 8.4% para carbohidratos, lípidos y PHB respectivamente. Esto evidencia que después de pasar por un procedimiento de tratamiento, los lixiviados pueden ser un medio útil, lo que mejoraría la calidad del efluente liberado y generaría biomasa rica en metabolitos (de Souza et al., 2021)

Utilizando un medio de cultivo con lixiviado al 10% se aprecia una disminución significativa en los contenidos de los diferentes metabolitos evaluados, lo cual también es atribuido a los contenidos de compuestos tóxicos, entre los que se encuentran principalmente el amonio y los metales pesados, estos últimos identificados en la caracterización detallada del medio, pero no expuestos en el presente documento por acuerdos de confidencialidad con la empresa VEOLIA ASEO CÚCUTA. Los lixiviados de rellenos sanitarios tienen presencias de microcontaminantes dentro de los que se encuentran los fenoles, ftalatos, metales pesados, entre otros (Kanyatrakul et al., 2020), que a bajas concentraciones generan estrés en las microalgas y permiten la acumulación de lípidos celulares, sin embargo, las concentraciones excesivas de estos compuestos dificultan el crecimiento de las microalgas y la producción de metabolitos (H. T. Nguyen et al., 2021). Por lo cual se recomienda que las condiciones de cultivos de las

microalgas en lixiviados de relleno sanitario se optimicen para promover el crecimiento de las mismas y la producción de metabolitos (Pinpatthanapong et al., 2022).

La aparición de PHB en esta etapa es atribuible a la adaptación de la cepa, puesto que, para este momento ya se encontraban en una fase de cultivo periódico en lixiviado al 5%, disminuyendo el estrés por el cambio del medio, lo que de la mano con la limitación de nutrientes como el fosfato y el nitrato juegan un papel importante, así mismo, el tiempo de evaluación del contenido de PHB teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado es relevante, puesto que en la literatura se identifica que las cianobacterias podrían cosechar el mayor rendimiento de PHB en 15 días de cultivo aproximadamente (R. Liu et al., 2022). Por otra parte, la producción de fitohormonas AIA solo se evidencia en las cepas de cianobacterias con medio de lixiviado al 5%. Es importante resaltar que al no encontrar fitohormonas externas en la primera etapa ni en el medio, pero si, fitohormonas intracelulares, se demuestra la capacidad de metabolizar estos compuestos. En diversos estudios se ha demostrado que la producción de auxinas, donde se encuentran categorizadas las AIA, puede ser más favorable en medios con mayor cantidad de nitrógeno y materia orgánica (Braun & Colla, 2023; Zapata et al., 2021)

Estos resultados permitieron corroborar que, aunque el tratamiento funciona adecuadamente como proceso de remoción de contaminantes, con resultados tolerados por las microalgas, las altas tasas de remoción presentaron una limitación de nutrientes como medio de cultivo ideal, por este motivo, el efluente de este tratamiento no fue implementado en las siguientes fases del proyecto y se propone como alternativa en futuras investigaciones del laboratorio INNOValgae, donde una vez evaluado a profundidad los resultados del tipo de tratamiento a una escala mayor, sea utilizado como agua de dilución para minimizar los impactos del uso de agua fresca en la dilución del lixiviado.

### 9.3 Diseño de Experimentos con Variables de Crecimiento para la Producción de Lípidos, Carbohidratos, Fitohormonas AIA y PHB

#### 9.3.1 Diseño de Experimentos: Análisis Estadístico

Mediante el software Design-Expert se plantearon 28 experimentos contenidos en 5 bloques (Tabla 9). Teniendo en cuenta los resultados anteriores se decidió utilizar lixiviado al 5% como medio de cultivo.

**Tabla 9**

*Diseño de experimentos mediante el software Design- Expert*

Bloque	#	A: Ciclo de Luz	B: LED	C:Cepa
		h de luz	Longitud de Onda	
<b>Bloque 1</b>	1	10	Rojo:Azul 3:1	UFPS_04
	2	16.37	Blanca	UFPS_17
	3	10	Rojo:Azul 3:1	UFPS_04
	4	24	Rojo:Azul 3:1	UFPS_08
	5	16.37	Blanca	UFPS_17
	6	10	Blanca	UFPS_08
	7	24	Blanca	UFPS_04
	8	24	Blanca	UFPS_04
	9	24	Rojo:Azul 3:1	UFPS_08
<b>Bloque 2</b>	10	18.4	Rojo:Azul 3:1	UFPS_08
	11	18.4	Blanca	UFPS_04
	12	10	Blanca	UFPS_16
	13	24	Rojo:Azul 3:1	UFPS_16
	14	10	Rojo:Azul 3:1	UFPS_17
<b>Bloque 3</b>	15	10	Blanca	UFPS_17
	16	20.99	Rojo:Azul 3:1	UFPS_17
	17	15.39	Blanca	UFPS_08
	18	13.01	Rojo:Azul 3:1	UFPS_16
	19	20.99	Rojo:Azul 3:1	UFPS_17
	20	17.56	Blanca	UFPS_16
<b>Bloque 4</b>	21	20.92	Blanca	UFPS_08
	22	20.99	Rojo:Azul 3:1	UFPS_04
	23	13.01	Rojo:Azul 3:1	UFPS_08
	24	12.87	Blanca	UFPS_04
<b>Bloque 5</b>	25	18.4	Rojo:Azul 3:1	UFPS_16
	26	24	Blanca	UFPS_17
	27	24	Blanca	UFPS_16

Tener en cuenta parámetros como la longitud de onda de luz y el ciclo de luz es de gran importancia, pues se ha demostrado que existe un efecto de la longitud de onda en el crecimiento de las microalgas y la producción de metabolitos, sin embargo, este efecto es específico de cada especie debido a las características metabólicas y estructurales de cada una (Juneja et al., 2013), llegando hasta el punto de que la longitud de onda (blanca, roja y azul) sea utilizada como un factor clave para el aislamiento de cepas (Izadpanah et al., 2018). Así mismo, se ha demostrado que ciclos de luz con mayor exposición a la luz promueven el crecimiento de las microalgas y la producción de metabolitos específicamente de carbohidratos (Beigbeder & Lavoie, 2022) y lípidos (Leong et al., 2022). Finalmente, es importante tener en cuenta que encontrar una relación óptima entre el tipo de luz y el ciclo de luz en cultivos mixtos promueve no solo el crecimiento de las microalgas, sino también la remoción de compuestos (H. Wang et al., 2023). Por esta razón se plantea la importancia de evaluar estas variables con diferentes cepas.

### 9.3.1.1 Variable de respuesta: Biomasa.

**Tabla 10**

*Análisis estadístico ANOVA para modelo significativo: Biomasa*

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
<b>Block</b>	0.2431	4	0.0608			
<b>Model</b>	0.0000	0				
<b>Residual</b>	0.2745	23	0.0119			
<b>Lack of Fit</b>	0.2429	18	0.0135	2.14	0.2050	not significant
<b>Pure Error</b>	0.0316	5	0.0063			
<b>Cor Total</b>	0.5176	27				

Los resultados obtenidos demostraron que los factores evaluados no son significativos en la concentración de biomasa. Esto demuestra la capacidad de las 4 cepas evaluadas de crecer bajo diferentes condiciones lumínicas sin alterar de forma significativa la concentración final de la biomasa. Aunque se ha evidenciado que en algunos casos las condiciones lumínicas influyen

para promover o inhibir el crecimiento de las microalgas y cianobacterias, es importante resaltar que los resultados obtenidos son probables, puesto que, esa alteración puede presentarse en condiciones lumínicas diferentes a las evaluadas, como tiempos de exposición lumínica menores a 10 h o variaciones en la intensidad de la luz.

### 9.3.1.2 Variable de respuesta: Carbohidratos.

**Tabla 11**

*Análisis estadístico ANOVA para modelo cuadrático: Carbohidratos*

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
<b>Block</b>	1.20	4	0.3011			
<b>Model</b>	4.57	13	0.3512	24.30	< 0.0001	significant
<b>A-Photoperiod</b>	1.45	1	1.45	100.54	< 0.0001	
<b>B-LED</b>	0.2620	1	0.2620	18.13	0.0017	
<b>C-Strain</b>	1.27	3	0.4249	29.40	< 0.0001	
<b>AB</b>	0.1270	1	0.1270	8.79	0.0142	
<b>AC</b>	1.02	3	0.3384	23.41	< 0.0001	
<b>BC</b>	0.5628	3	0.1876	12.98	0.0009	
<b>A<sup>2</sup></b>	0.1957	1	0.1957	13.54	0.0042	
<b>Residual</b>	0.1445	10	0.0145			
<b>Lack of Fit</b>	0.0390	5	0.0078	0.3698	0.8505	not significant
<b>Pure Error</b>	0.1055	5	0.0211			
<b>Cor Total</b>	5.91	27				

La tabla 11 muestra que el valor F del modelo es significativo, este valor es comparado por el software con los valores críticos, en donde el valor F debe ser mayor para que el modelo sea significativo. Los valores p inferiores a 0.0500 indican que los términos del modelo son significativos, en este caso cada una de las variables (A, B, C) y sus interacciones (AB, AC, BC, A<sup>2</sup>) son significativas. El R<sup>2</sup> es de 0.9693, donde el R<sup>2</sup> previsto es de 0.7924, el cual está razonablemente de acuerdo con el R<sup>2</sup> ajustado que es de 0.9294, es decir, la diferencia es inferior a 0.2. Esto va de la mano a diversos estudios que han demostrado que los efectos de la longitud de onda de la luz pueden ser tan importantes como la intensidad y la duración de la luz (Wicker et al., 2022) (A Hernández-García et al., 2019)

### 9.3.1.3 Variable de respuesta: Lípidos.

**Tabla 12**

*Análisis estadístico ANOVA para modelo lineal: Lípidos*

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
<b>Block</b>	111.89	4	27.97			
<b>Model</b>	133.09	5	26.62	17.29	< 0.0001	significant
<b>A-Photoperiod</b>	0.4327	1	0.4327	0.2811	0.6025	
<b>B-LED</b>	12.70	1	12.70	8.25	0.0101	
<b>C-Strain</b>	114.41	3	38.14	24.77	< 0.0001	
<b>Residual</b>	27.71	18	1.54			
<b>Lack of Fit</b>	18.67	13	1.44	0.7946	0.6614	not significant
<b>Pure Error</b>	9.04	5	1.81			
<b>Cor Total</b>	272.69	27				

La tabla 12 muestra el análisis estadístico para el modelo de lípidos, en el cual el valor F de 17.29 implica un modelo significativo. Las variables B (Tipo de Luz) y C (Cepa) son términos significativos en el contenido de lípidos, por otra parte, el fotoperíodo no parece influir en la obtención de estos. El  $R^2$  es de 0.8277, donde el  $R^2$  previsto es de 0.5901, el cual está razonablemente de acuerdo con el  $R^2$  ajustado de 0.7798, es decir, la diferencia es menor que 0.2. Un estudio realizado por W. Chang et al. (2022) demostró la incidencia del tipo de luz en la producción de lípidos, en donde obtuvieron un contenido del 28.34% bajo irradiación con luz roja, sin embargo, es importante resaltar que los medios de cultivo utilizados eran estándar y optimizados con fitohormonas AIA.

### 9.3.1.4 Variable de respuesta: Fitohormonas AIA.

**Tabla 13**

*Análisis estadístico ANOVA para modelo cuadrático: AIA*

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
<b>Block</b>	3.29	4	0.8236			
<b>Model</b>	27.94	13	2.15	28.43	< 0.0001	significant
<b>A-Photoperiod</b>	5.55	1	5.55	73.49	< 0.0001	
<b>B-LED</b>	0.2103	1	0.2103	2.78	0.1262	
<b>C-Strain</b>	14.28	3	4.76	62.99	< 0.0001	
<b>AB</b>	1.53	1	1.53	20.18	0.0012	

<b>AC</b>	1.73	3	0.5780	7.65	0.0060	
<b>BC</b>	3.39	3	1.13	14.94	0.0005	
<b>A<sup>2</sup></b>	3.64	1	3.64	48.21	< 0.0001	
<b>Residual</b>	0.7559	10	0.0756			
<b>Lack of Fit</b>	0.1393	5	0.0279	0.2259	0.9359	not significant
<b>Pure Error</b>	0.6166	5	0.1233			
<b>Cor Total</b>	31.99	27				

La tabla 13 muestra el análisis estadístico para el modelo de fitohormonas AIA, en el cual el valor F de 28.43 indica un modelo significativo. Las variables A (fotoperíodo) y C (Cepa) son significativas al evaluar el contenido de lípidos, al igual que las interacciones (AB, AC, BC, A<sup>2</sup>). El R<sup>2</sup> es de 0.9737, donde el R<sup>2</sup> previsto es de 0.8237, el cual, está razonablemente acorde con el R<sup>2</sup> ajustado que es de 0.9394. Son limitados los estudios que relacionan el contenido de bioestimulantes de las microalgas en cultivos con aguas residuales (Braun & Colla, 2023) y aún más, aquellos relacionados con mejorar las condiciones de cultivo para evaluar el contenido de la fitohormona AIA, por lo cual, se establece la importancia de los resultados encontrados, ya que son una alternativa sostenible para mejorar los sistemas de cultivo de plantas y son insumo para futuras investigaciones. Por otra parte, en estudios realizados con *Spirulina platensis* cultivada en agua residual de productos lácteos, se demostró que en cultivos con intensidades de 82  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  y 42  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ , las bajas intensidades de luz estimulan el contenido de la fitohormona AIA (Zapata et al., 2021), lo que resalta la importancia de tener en cuenta la intensidad de luz como factor adicional.

### 9.3.1.5 Variable de respuesta: PHB.

**Tabla 14**

*Análisis estadístico ANOVA para modelo lineal: PHB*

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
<b>Block</b>	210.50	4	52.62			
<b>Model</b>	347.80	5	69.56	318.50	< 0.0001	significant
<b>A-Photoperiod</b>	0.1287	1	0.1287	0.5891	0.4527	
<b>B-LED</b>	0.0355	1	0.0355	0.1625	0.6917	

<b>C-Strain</b>	343.14	3	114.38	523.71	< 0.0001	
<b>Residual</b>	3.93	18	0.2184			
<b>Lack of Fit</b>	3.70	13	0.2846	6.15	0.0280	significant
<b>Pure Error</b>	0.2313	5	0.0463			
<b>Cor Total</b>	562.23	27				

La tabla 14 muestra el análisis estadístico para el modelo de PHB, en el cual el valor F de 318.50 indica que el modelo es significativo. La variable C (Cepa) es la única significativa en este estudio al evaluar el contenido de PHB. El  $R^2$  es de 0.9888, donde el  $R^2$  previsto es de 0.9713, el cual, está razonablemente acorde con el  $R^2$  ajustado que es de 0.9857. Esto puede atribuirse directamente a la capacidad de cada cepa de metabolizar y acumular este bioproducto. Así mismo, al no encontrar influencia directa del tipo de luz y el ciclo de luz, se determina que existe una mayor incidencia de otros factores como el contenido de nutrientes evaluado desde las combinaciones de carbono, nitratos y fosfatos, como lo reportado por Samadhiya et al. (2022) quienes evaluaron los efectos del nitrato, fosfato y fuentes de carbono (glucosa, fructosa, glicerol, entre otros) en tres especies, demostrando que la correlación de estos nutrientes presenta efectos significativos en la producción de PHB.

Por otra parte, en la literatura se han reportado resultados diferentes, donde se demostró que la luz de espectro completo genera fotoinhibición, bajo rendimiento de biomasa y promueve mayor contenido de PHB; sin embargo, estos resultados se puede atribuir a la interacción de otras variables como el tipo de agua residual (Acuicultura), la relación de nutrientes, así como la variación de la intensidad de luz de 130 – 500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ , (Wicker et al., 2022).

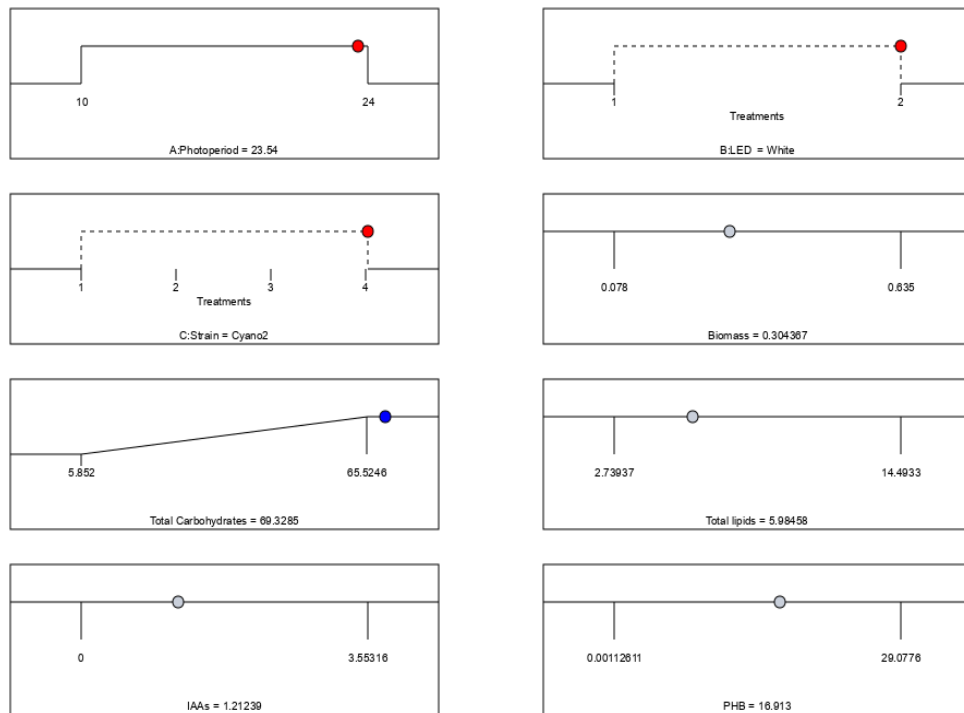
### **9.3.1.6 Función de deseabilidad para sugerir condiciones mejoradas de cultivo para cada metabolito.**

Una vez evaluados los resultados del análisis estadístico, se obtuvo las condiciones ideales, predichas estadísticamente mediante gráficos de función de deseabilidad sugeridas por el

software Design Expert (Figuras 14, 15, 16 y 17), para mejorar el contenido de cada metabolito teniendo en cuenta los 3 parámetros ciclo de luz, tipo de luz y cepa.

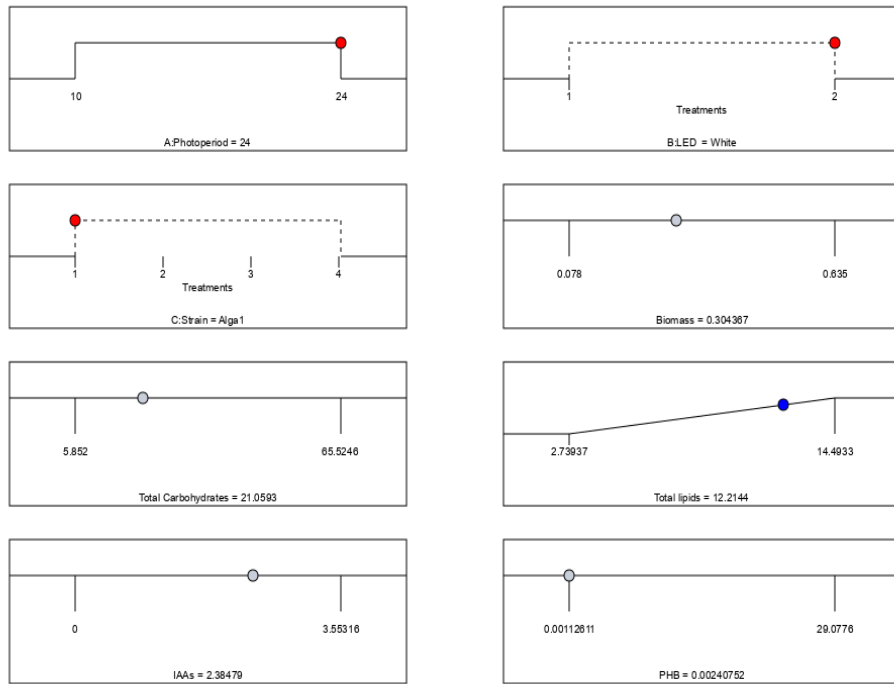
**Figura 14**

*Gráfico de función de deseabilidad sugerido por el software Design-Expert para carbohidratos*



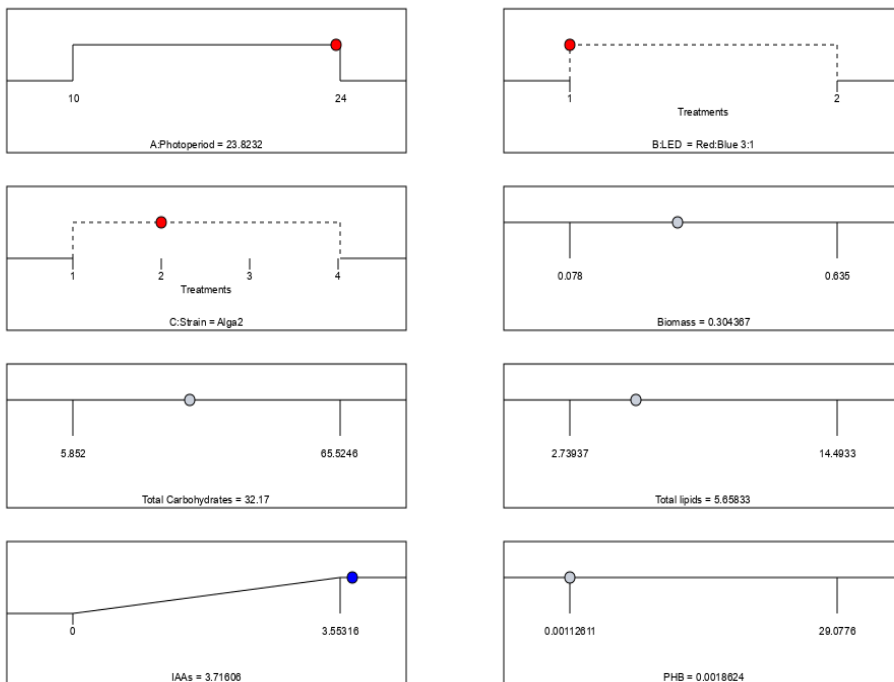
**Figura 15**

*Gráfico de función de deseabilidad sugerido por el software Design-Expert para lípidos*



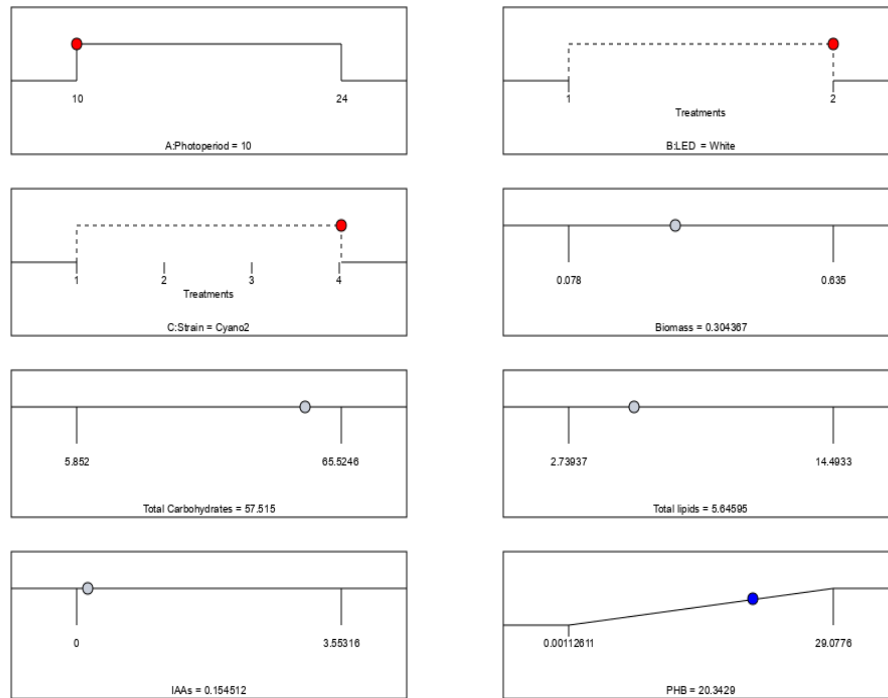
**Figura 16**

*Gráfico de función de deseabilidad sugerido por el software Design-Expert para AIA*



**Figura 17**

Gráfico de función de deseabilidad sugerido por el software Design-Expert para PHB



**Tabla 15**

Condiciones ideales para mejorar el contenido de metabolitos

Variables	Ciclo de Luz	Tipo de luz	Cepa	% p/p esperado
<b>Carbohidratos</b>	23.54	Blanca	UFPS_08	69.3
<b>Lípidos</b>	24	Blanca	UFPS_16	12.2
<b>Fitohormonas</b>	23.82	Roja:Azul	UFPS_17	3.7
<b>PHB</b>	10	Blanca	UFPS_08	20.3

Se puede observar en la tabla 15 el resumen de las condiciones establecidas por la función de deseabilidad y la variación en los parámetros requeridos para cada variable de respuesta con el fin de promover su contenido, demostrando la necesidad de un proceso propio. Esto reafirmó el hecho de que, los efectos que generan parámetros como el tipo de luz y el ciclo de luz son específicos para cada especie y que es necesario tener en cuenta las características

metabólicas de cada una (Juneja et al., 2013), con el fin de brindar procesos adecuados que mejoren los resultados y permitan una mayor sostenibilidad del sistema (Pinpatthanapong et al., 2022).

### 9.3.2 Evaluación de cultivos en reactores de 20 L a la mejor condición de cultivo

La tabla 16 muestra los resultados en la remoción de fosfatos y nitratos en los cultivos en reactores de 30L con un volumen útil de 20L y condiciones mejoradas. Donde en RL, RC, RF y RP se evalúan las variables de lípidos, carbohidratos, fitohormona AIA y PHB respectivamente.

**Tabla 16**

*Análisis fisicoquímico de los reactores con condiciones modificadas*

	Medio	RL	RC	RF	RP
<b>Fosfatos (mg PO<sub>4</sub>-P /L)</b>	6.56	1.18	1.40	1.36	1.60
<b>Nitratos (mg NO<sub>3</sub>-N/L)</b>	33.23	28.78	12.96	68.13	14.18
<b>DQO (mg O<sub>2</sub>/L)</b>	251.2	280	560	219	630.4
<b>DBO<sub>5</sub></b>	155.7	176.41	347	138.0	390

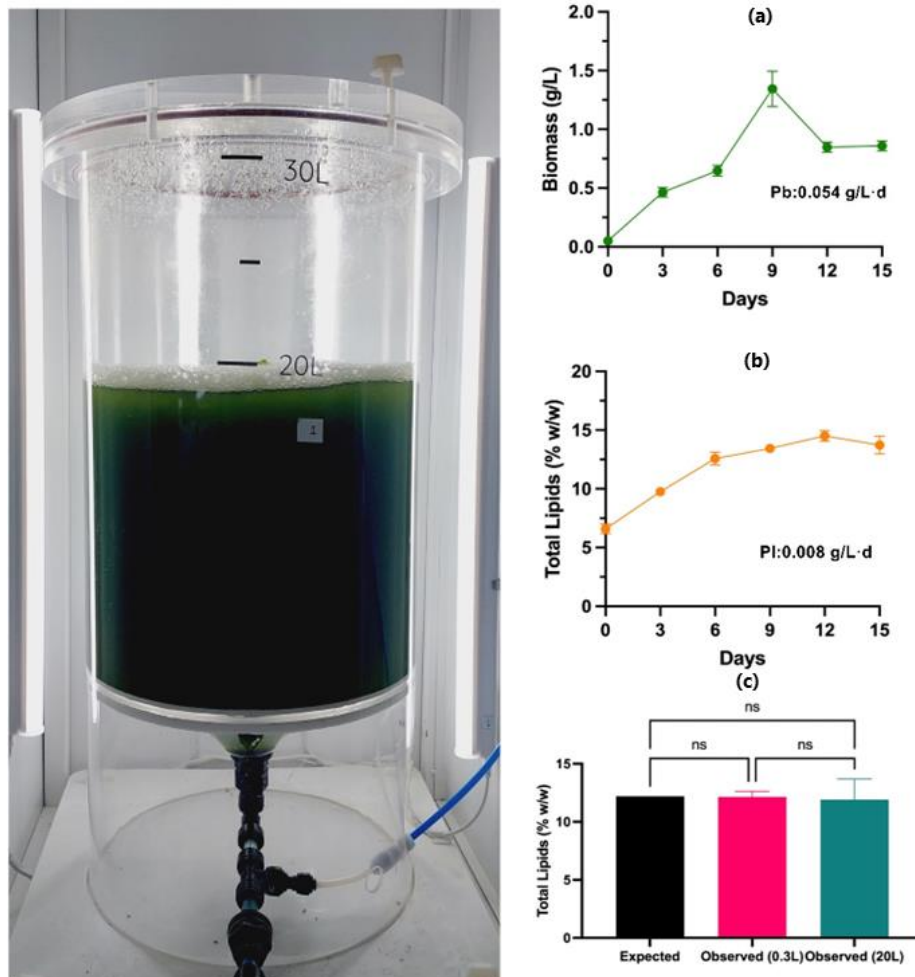
Las remociones de fosfatos fueron de 82.0%, 78.7%, 79.3% y 75.6% para RL, RC, RF y RP respectivamente y de nitratos de 13.4%, 61.0% y 57.3% RL, RC y RP respectivamente. En otros estudios reportados en literatura con cultivos sin condiciones mejoradas, pero con lixiviado pretratado con NaClO y diluido al 10%, se obtuvieron remociones de DQO, Nitrógeno amoniacal, TN y TP de 81.0%, 80.1%, 72.1% y 86.0% respectivamente (D. Hu et al., 2021) y en resultados encontrados con lixiviado al 10% con cultivo mixto de microalgas, se obtuvieron remociones del 76.26%, 75.48, 74.58 y 73.52% para DQO, DBO, nitrato y nitrito respectivamente (Emalya et al., 2023). En ambos casos, se presentaron tasas de remoción mayores a las encontradas en el presente estudio.

### 9.3.2.1 Lípidos

La figura 18 muestra los resultados obtenidos para el reactor donde se evaluó el contenido de lípidos dados en concentración de biomasa, % de lípidos, productividad de biomasa y lípidos.

**Figura 18**

*Resultados lípidos en reactor de 20 L (Cepa 16, Luz blanca, 24 h Luz)*



*Nota:* (a) Concentración de biomasa, (b) contenido de lípidos y (c) comparativo de resultados esperados y observados.

Los resultados arrojaron la mayor concentración de biomasa al día 9 con  $1.331 \pm 0.15$  g/L, para después tener una caída y encontrar estabilidad a partir del día 12. El contenido máximo de lípidos se da al día 12 con un valor de  $14.4 \pm 0.2$  % p/p. Al comparar los resultados esperados

con los obtenidos a 0.3L y 20L (Figura 18.c) no se evidenció una diferencia significativa, lo que es positivo pues sugiere que no hay una pérdida relevante del contenido de lípidos al momento de aumentar el volumen. Otros estudios han demostrado contenidos de hasta el 29.90% en lixiviado pretratado y diluido al 10% a los 10 días de cultivo, sin embargo, estos resultados son atribuidos al rápido consumo de fósforo en un cultivo mixto de microalgas (D. Hu et al., 2021) y del 27.60% de lípidos en lixiviados diluidos al 10% con agua reciclada por 20 días en co-cultivos de microalgas (Tang et al., 2023). Esto demuestra que una forma de lograr contenidos mayores de lípidos podría ser el uso de cultivos mixtos de microalgas, puesto que, puede aumentar hasta un 50% los resultados comparados con monocultivos (R. Liu et al., 2022).

Estudios realizados con *Scenedesmus* sp. en lixiviado tratado con lagunas de oxidación en dilución al 80% arrojaron productividad de biomasa y lípidos de 241 mg/L·d y 36 mg/L·d respectivamente (de Souza et al., 2021). En sistemas de escala de 10L con luminosidad continua de 76  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  y lixiviado pretratado diluido al 10% (v/v) en cultivos de microalgas y bacterias, se encontraron contenidos de  $13.75\pm 2.49$  % p/p de lípidos con una productividad promedio de  $34.35\pm 8.26$  mg/L·d para el lote 1 y  $21.47\pm 2.35$  % p/p con una productividad promedio de  $126.59\pm 9.57$  mg/L·d para el lote 2, diferencia que es atribuida al contenido de carbono disponible para la biosíntesis de metabolitos (Tighiri & Erkurt, 2019)

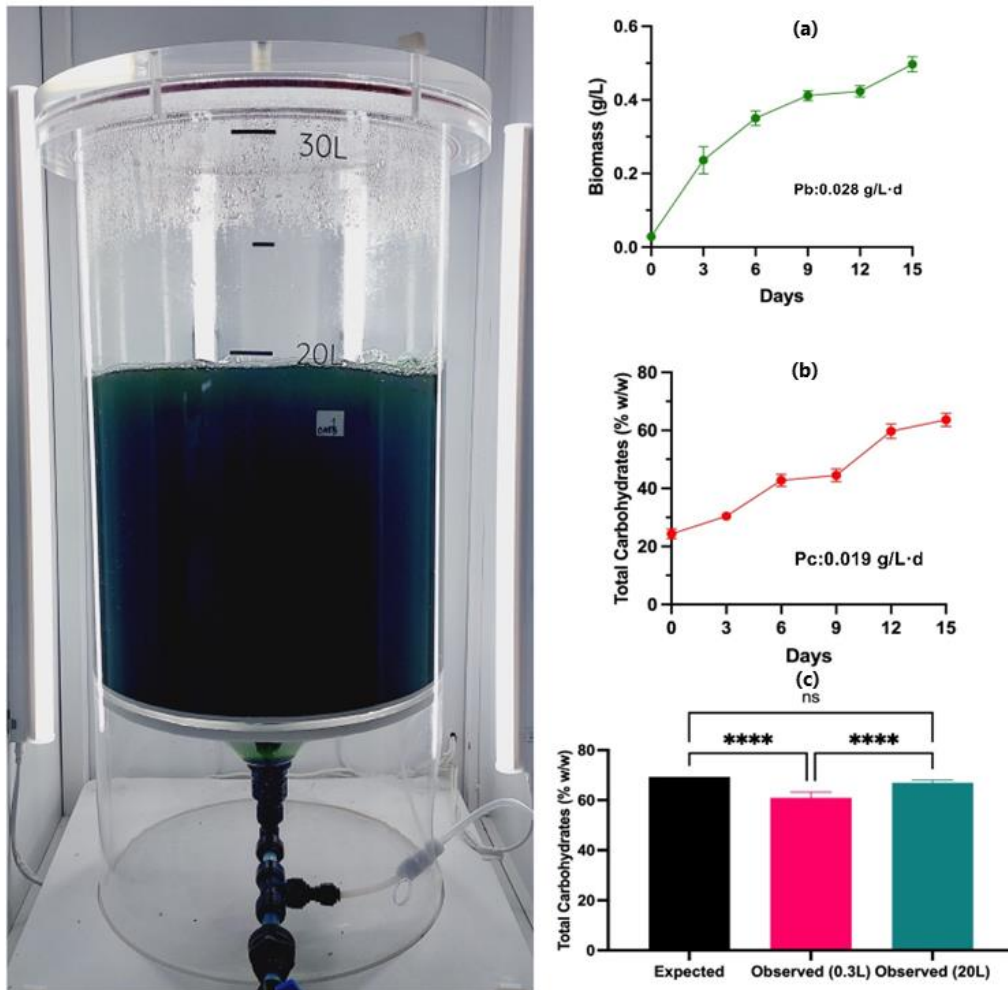
No obstante, obtener valores mayores a los esperados con las condiciones de cultivo mejoradas, demuestra la viabilidad de este proceso para integrarlo dentro de la cadena de economía circular, utilizando compuestos presentes en los lixiviados y transformándolos en lípidos, que podrían utilizarse en la generación de combustibles renovables, lo que sería una alternativa sostenible, pues esta extracción representa alrededor del 30% del costo de la producción de biodiesel (Díaz et al., 2022; Vinod Kumar et al., 2019).

9.3.2.2 Carbohidratos

La figura 19 muestra los resultados obtenidos para el reactor donde se evaluó el contenido de carbohidratos dados en concentración de biomasa, % de carbohidratos, productividad de biomasa y carbohidratos.

Figura 19

Resultados de carbohidratos en reactor de 20 L (Cepa 08, Luz blanca, 23.32 h Luz)



Nota: (a) Concentración de biomasa, (b) contenido de carbohidratos y (c) comparativo de resultados esperados y observados.

La curva de crecimiento muestra estabilidad desde el día 9, teniendo al día 15 un pico con la mayor concentración de biomasa,  $0.452 \pm 0.02$  g/L, tiempo bajo el cual se obtiene el mayor

contenido de carbohidratos con un  $65 \pm 1.7$  % p/p. Al comparar los resultados esperados con los obtenidos a 20L (Figura 19.c) no se evidenció una diferencia significativa, lo que es positivo pues sugiere que no hay una pérdida relevante del contenido de carbohidratos al momento de aumentar el volumen, no obstante, se evidenció una diferencia significativa reducida entre el valor esperado y el observado a 0.3L. Resultados de un diseño de experimentos con diferentes ciclos de luz: oscuridad (4 h: 20 h, 12 h: 12 h y 20 h: 4 h) y concentraciones de CO<sub>2</sub> (0.04%, 2.5%, 5.0% y 10%) para promover el contenido de carbohidratos en medio estándar, demostró que a ciclos de 20 h: 4 h y concentración de CO<sub>2</sub> de 5.0% se obtuvo 44.2% de contenido de carbohidratos con *Parachlorella kessleri*, productividad de biomasa de 104 mg/L·s y tasa de crecimiento específico de 0.58 1/d (Beigbeder & Lavoie, 2022). En otro estudio en el cual se evaluaron tiempos de retención (TRH) con lixiviado al 20%, se encontraron concentraciones de hasta 19.7 % de carbohidratos en un TRH igual a 10 días (Paiva et al., 2021).

En sistemas de escala de 10L con luminosidad continua de  $76 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y lixiviado pretratado diluido al 10% (v/v) en consorcios de microalgas y bacterias, se encontraron contenidos de  $21.47 \pm 1.49$  % p/p de carbohidratos con una productividad promedio de  $67.05 \pm 8.57$  mg/L·d para el lote 1 y  $32.28 \pm 1.18$  % p/p con una productividad promedio de  $190.25 \pm 8.18$  mg/L·d para el lote 2, diferencia que es atribuida al contenido de carbono disponible para la biosíntesis de metabolitos (Tighiri & Erkurt, 2019). En estudios en los cuales se utilizó *Oscillatoria* sp en cultivos con diferentes concentraciones de lixiviado nitrificado, se obtuvieron productividades de biomasa de 0.11 g/L·d y de carbohidratos de 2.92 g/L·d (Nordin et al., 2017). Los resultados obtenidos, junto con los reportados en los diferentes estudios tanto para lípidos como para carbohidratos, demuestran variabilidad dependiendo de las condiciones iniciales a las que esté expuesto el sistema, esto se atribuye no solo a la influencia de factores operativos como

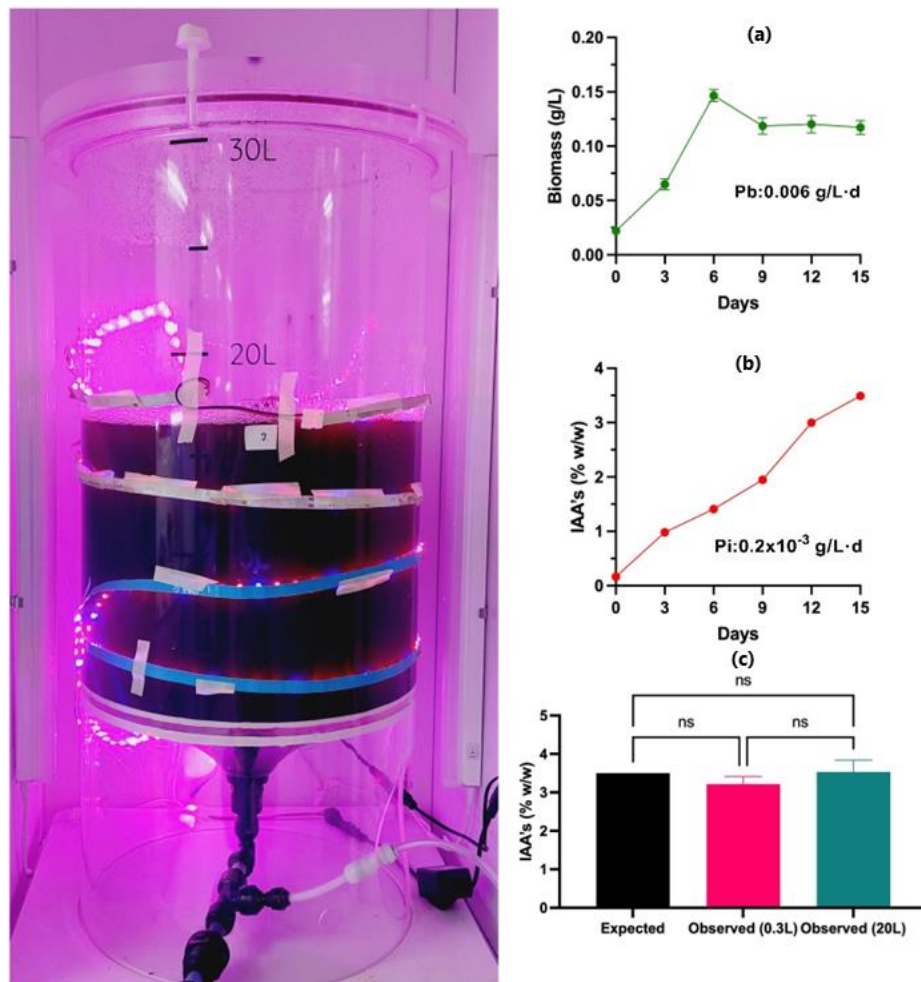
el ciclo de luz y la intensidad de luz sino también a la influencia de las condiciones de los nutrientes como el fósforo, nitrógeno y carbono del medio junto con el periodo de crecimiento (A Hernández-García et al., 2019), razón por la cual, es importante evaluar a futuro otros factores de influencia en el mejoramiento de cultivos a mayor escala.

### 9.3.2.3 Fitohormonas AIA

La figura 20 muestra los resultados obtenidos para el reactor donde se evaluó el contenido de AIA, la concentración de biomasa y la productividad de biomasa y AIA.

**Figura 20**

*Resultados AIA en reactor de 20 L (Cepa 17, Luz Roja:Azul, 23.49 h Luz)*



*Nota:* (a) Concentración de biomasa, (b) contenido de AIA y (c) comparativo de resultados esperados y observados.

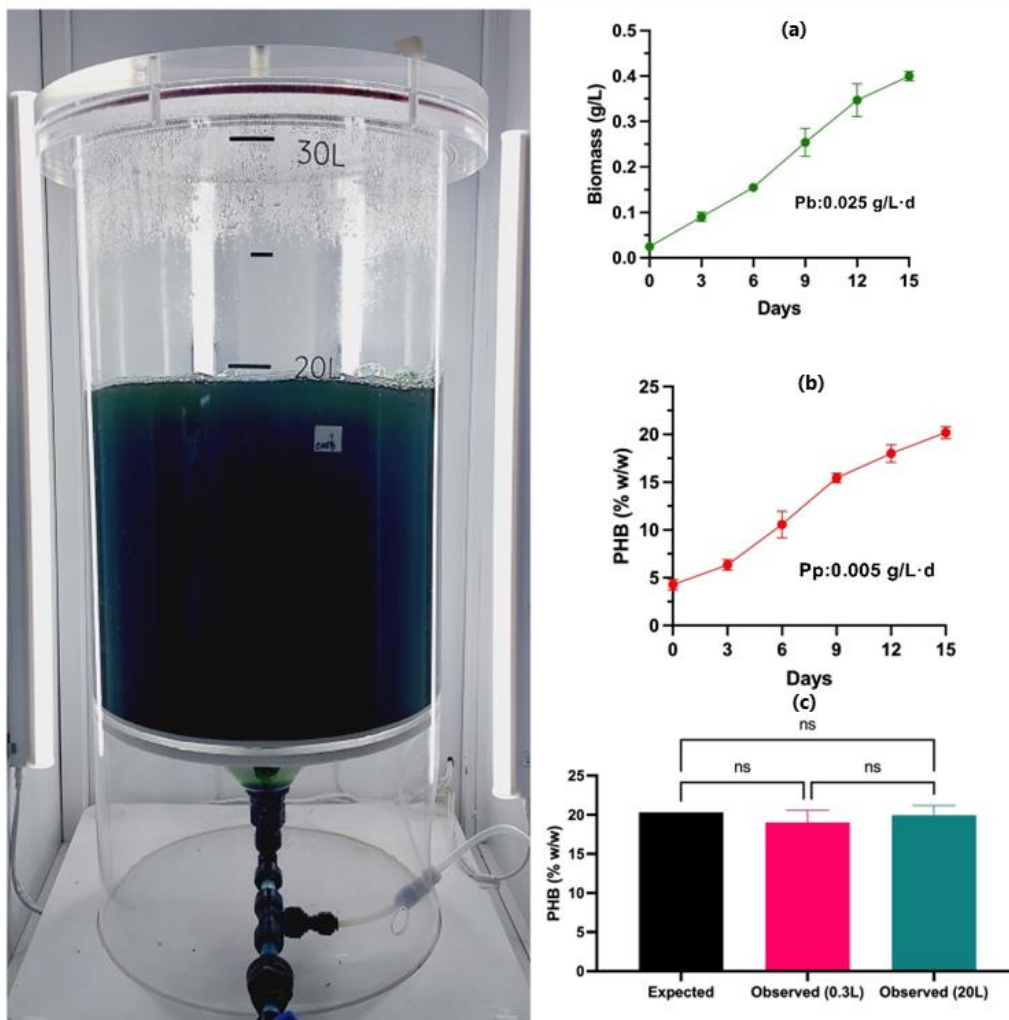
La curva presenta el pico con mayor concentración de biomasa el día 6 con  $0.147 \pm 0.005$  g/L, para después tener un comportamiento decreciente hasta encontrar la fase estacionaria a partir del día 9. El mayor contenido de fitohormonas se presenta al día 15 con 3.5% p/p. Al comparar los resultados esperados con los obtenidos a 0.3L y 20L (Figura 20.c) no se evidenció una diferencia significativa, lo que es positivo pues sugiere que no hay una pérdida relevante del contenido de AIA al momento de aumentar el volumen. Se presentan resultados positivos en contenidos de fitohormonas, pues en la literatura no relacionan estudios con lixiviados como medio de cultivo, lo que resalta la relevancia de este estudio, teniendo en cuenta que el uso de bioestimulantes formulados a partir de microalgas ha demostrado un aumento en el rendimiento de los cultivos, funcionando como una alternativa a los procesos físicos y químicos para disminuir la presencia de compuestos nocivos (Díaz et al., 2022).

#### **9.3.2.4 PHB**

La figura 21 muestra los resultados obtenidos para el reactor donde se evaluó el contenido de PHB dados en concentración de biomasa, % de PHB, productividad de biomasa y PHB.

**Figura 21**

*Resultados PHB en reactor de 20 L (Cepa 08, Luz blanca, 10 h Luz)*



*Nota:* (a) Concentración de biomasa, (b) contenido de PHB y (c) comparativo de resultados esperados y observados.

La curva de crecimiento muestra un comportamiento creciente hasta el día 15, siendo ese día el que presenta mayor concentración de biomasa con  $0.402 \pm 0.01 \text{ g/L}$  y mayor contenido de PHB con  $19.7 \pm 0.4 \%$  p/p. Al comparar los resultados esperados con los obtenidos a 0.3L y 20L (Figura 21.c) no se evidenció una diferencia significativa, lo que es positivo pues sugiere que no hay una pérdida relevante del contenido de PHB al momento de aumentar el volumen. En la

literatura no se relacionan estudios de evaluación de contenidos de PHB con lixiviados como medio de cultivo, lo que resalta la relevancia de este estudio. La implementación de una fuente de carbono adicional se plantea como estrategia para promover la biosíntesis de PHB en las cianobacterias, dentro de las opciones que promueven la acumulación de polímeros se encuentra el CO<sub>2</sub> y el glicerol, este último no solo por su contenido de carbono sino por el contenido de ácidos grasos volátiles y otros nutrientes (Cardeña et al., 2017; Patel et al., 2021; Samadhiya et al., 2022), donde estos ácidos grasos volátiles, también han demostrado ser un aliado en el crecimiento de diversas especies para la producción de lípidos y la generación de biodiésel (Fei et al., 2015; Kim et al., 2023; Patel et al., 2022). Todo esto pudiendo disminuir los costos en la producción de metabolitos (R. Liu et al., 2022)

La tabla 17 muestra el comparativo entre los contenidos de metabolitos al día 15 de cultivo, en donde se plasma el % esperado según el análisis estadístico, el % obtenido a escala de 0.3 L y el % obtenido a escala de 20L.

**Tabla 17**

*comparativo en diferentes volúmenes a condiciones mejoradas*

Reactor	Variables	% esperado según software	% real a escala de 0.3 L	% real a escala de 20 L
<b>RL</b>	Lípidos	12.2	11.4 ± 0.7	14.2 ± 0.2
<b>RC</b>	Carbohidratos	69.3	59.7 ± 2.9	65 ± 1.7
<b>RA</b>	AIA	3.7	3.1 ± 0.3	3.5 ± 0.0
<b>RP</b>	PHB	20.3	19.8 ± 0.2	19.7 ± 0.4

Al analizar los resultados obtenidos se aprecia que los contenidos de metabolitos tanto para los experimentos realizados a escala de 0.3 L como los realizados en volumen de 20 L estuvieron cercanos al valor esperado, a excepción de los lípidos para 20 L que arrojaron un valor superior al esperado. Así mismo, al momento de comparar los resultados obtenidos en las dos etapas experimentales, se observa que los reactores de 20 L tuvieron mejor contenido de

carbohidratos y lípidos. Estos resultados son atribuidos al diseño del reactor de 30L, pues cuenta con un diseño específico para cultivos de microalgas, lo que garantiza un medio mezclado uniformemente, evitando zonas muertas y permitiendo la incidencia lumínica en todo el cultivo. Así mismo, la intensidad lumínica utilizada es mayor comparada con los experimentos a 300 mL, alcanzando los  $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}^1$ , con el fin de garantizar la incidencia de la luz en la masa de cultivo. Siendo éste un factor importante en la producción de lípidos y carbohidratos en cultivos con lixiviado, debido a la coloración del medio (A Hernández-García et al., 2019). Mustafa et al. (2012) demostraron una concentración entre 2.0 – 5.54 g/L de biomasa en estanques de 40 L con lixiviado previamente tratado con aireación mecánica, pudiendo utilizarse en una dilución que contenía hasta el 50% de lixiviado tratado con TRH de 50 días en cultivos mixtos de 5 cepas de microalgas, no obstante, TRH altos significaría alta demanda de área, lo que implicaría inconvenientes a gran escala. Esto demuestra que, aunque a la fecha son limitados los estudios a escalas superiores a los 10 L, se encuentran resultados viables en la obtención de biomasa y metabolitos, sin embargo, al ser un campo relativamente nuevo y en auge de exploración, se requiere evaluar más condiciones que permitan que sea posible llevarlo a cabo a gran escala, reduciendo costos operativos y ambientales, que lo hagan sostenible a largo plazo. De Souza et al. (2021) plantea que después de un estudio inicial, los enfoques en optimización de condiciones deben centrarse en mejorar la tolerancia de las especies para maximizar el uso de concentraciones mayores de lixiviado, lo que puede lograrse adaptando gradualmente la cepa, permitiendo una opción sostenible para la economía y eficiencia de los rellenos sanitarios. Es por esto, que los resultados obtenidos en este estudio son un insumo valioso para el desarrollo de tecnologías sostenibles acopladas entre microalgas/cianobacterias y lixiviados de rellenos sanitarios, para transformar este residuo en productos de interés industrial que mitiguen los

impactos ambientales y económicos de las tecnologías actuales. Así mismo, evaluar el contenido de AIA y PHB fue de vital importancia puesto que las investigaciones a la fecha son muy reducidas, así como evaluar la incidencia de las condiciones lumínicas. Aunque aún existen otros factores que pueden evaluarse para acercarse a las condiciones ideales de cultivo, este proyecto es pionero a nivel nacional, no solo en la evaluación de condiciones operacionales que promuevan los contenidos de metabolitos sino también en la evaluación de esas condiciones a una escala piloto.

## 10 Conclusiones

Al realizar un comparativo entre los contenidos de nitratos y fosfatos presentes entre el medio con lixiviado al 5% y los medios estándar, se identificó la existencia de limitación en los contenidos de estos nutrientes disponibles para las microalgas y cianobacterias, pudiendo ser un factor limitante para el crecimiento, pero también una oportunidad de establecer condiciones de estrés que permitan mejorar los contenidos de bioproductos en las especies con potencial para su aprovechamiento industrial.

Se evaluó la concentración de biomasa y el contenido de lípidos, carbohidratos, fitohormonas AIA y PHB en 16 cepas cultivadas en lixiviado diluido al 5%. En esta etapa no se encontró contenido de AIA ni PHB. De las cepas evaluadas se seleccionaron 4 con los mejores contenidos de lípidos, carbohidratos y concentración de biomasa. Siendo las cepas UFPS\_04 y UFPS\_08 del género *Oscillatoria* y las cepas UFPS\_16 y UFPS\_17 del género *Chlorella*, demostrando la capacidad que tienen las cepas del laboratorio INNOValgae para adaptarse al crecimiento en lixiviado.

Al evaluarse las condiciones ideales del tratamiento del lixiviado como medio de cultivo para las microalgas y cianobacterias, se identificaron remociones del 99.2%, 98.8%, 80.5%,

81.1% y 81.6 % de  $\text{PO}_4$ ,  $\text{NO}_3$ , DQO, DBO y TOC, lo que como tratamiento lo cataloga en un sistema adecuado. No obstante, al evaluarse y compararse los resultados del crecimiento de las 4 cepas seleccionadas con los cultivos realizados con lixiviado al 5% y 10%, no sobresalió en la producción de los metabolitos evaluados (Carbohidratos, lípidos, AIA y PHB), siendo el lixiviado al 5% el que obtuvo mejores resultados. Los resultados obtenidos permiten identificar este tratamiento como una opción viable en la remoción de contaminantes y postular la futura implementación de estas aguas tratadas enriquecidas con lixiviado crudo para la transformación de los lixiviados en biomasa rica en subproductos y el reintegro de los lixiviados en la cadena productiva, con el fin de mitigar los impactos de utilizar agua fresca para dilución.

El diseño de experimentos desarrollado donde se evaluó el tipo de luz, ciclo de luz y la cepa, arrojó en general un modelo significativo para las variables de lípidos, carbohidratos, AIA y PHB y permitió identificar condiciones de cultivo que promueven la producción de metabolitos de interés comercial. Por otra parte, la concentración de biomasa no se vio afectada por las variables estudiadas, lo que es positivo, pues demuestra la capacidad de las cuatro cepas seleccionadas para crecer en lixiviado al 5% sin que haya influencia de las variables lumínicas (Tipo de luz y ciclo de luz).

Al evaluar las condiciones mejoradas en cultivos a escala piloto de 20 L, se identificaron buenos resultados al compararlos con los esperados y con los obtenidos a 0.3 L, especialmente para el contenido de lípidos, el cual fue mayor al esperado, demostrando que evaluar condiciones y mejorarlas permite sistemas estables en escalas piloto. Así mismo, los resultados encontrados son valiosos, pues es el primer sistema evaluado a escala piloto en Colombia donde se identificó el contenido de AIA y PHB.

Finalmente, este estudio demostró ser un proceso innovador a nivel nacional y un referente importante a nivel global, siendo insumo para la evaluación de diversos sistemas acoplados de microalgas/cianobacterias y lixiviados de relleno sanitario, promoviendo la transformación sostenible de los lixiviados en productos útiles en la industria, permitiendo reintegrar estos residuos a la cadena productiva.

### Referencias

- Abdel-Shafy, H. I., & Mansour, M. S. M. (2018). Phytoremediation for the elimination of metals, pesticides, PAHs, and other pollutants from wastewater and soil. In *Phytobiont and Ecosystem Restitution* (pp. 101–136). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-1187-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-981-13-1187-1_5)
- Altunoz, M., Pirrotta, O., Forti, L., Allesina, G., Pedrazzi, S., Obali, O., Tartarini, P., & Arru, L. (2017). Combined effects of LED lights and chicken manure on *Neochloris oleoabundans* growth. *Bioresource Technology*, *244*, 1261–1268. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.094>
- Anbalagan, A., Schwede, S., & Nehrenheim, E. (2015). Influence of Light Emitting Diodes on Indigenous Microalgae Cultivation in Municipal Wastewater. *Energy Procedia*, *75*, 786–792. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.egypro.2015.07.125>
- Arashiro, L. T., Josa, I., Ferrer, I., Van Hulle, S. W. H., Rousseau, D. P. L., & Garfí, M. (2022). Life cycle assessment of microalgae systems for wastewater treatment and bioproducts recovery: Natural pigments, biofertilizer and biogas. *Science of The Total Environment*, *847*, 157615. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157615>
- Atta, M., Idris, A., Bukhari, A., & Wahidin, S. (2013). Intensity of blue LED light: A potential stimulus for biomass and lipid content in fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, *148*, 373–378. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.162>
- Becerra, D., Soto, J., Villamizar, S., Machuca-Martínez, F., & Ramírez, L. (2020). Alternative for the Treatment of Leachates Generated in a Landfill of Norte de Santander–Colombia, by Means of the Coupling of a Photocatalytic and Biological Aerobic Process. *Topics in*

*Catalysis*, 63(11), 1336–1349. <https://doi.org/10.1007/s11244-020-01284-1>

Beigbeder, J.-B., & Lavoie, J.-M. (2022). Effect of photoperiods and CO<sub>2</sub> concentrations on the cultivation of carbohydrate-rich *P. kessleri* microalgae for the sustainable production of bioethanol. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*, 58, 101934. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcou.2022.101934>

Bernard, C., Colin, J. R., & Anne, L. D.-D. (1997). Estimation of the hazard of landfills through toxicity testing of leachates. Comparison of physico-chemical characteristics of landfill leachates with their toxicity determined with a battery of tests. *Chemosphere*, 35(11), 2783–2796. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00332-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00332-9)

Bernard, C., Guido, P., Colin, J., & Anne, L. D.-D. (1996). Estimation of the hazard of landfills through toxicity testing of leachates. I. Determination of leachate toxicity with a battery of acute tests. *Chemosphere*, 33(11), 2303–2320. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(96\)00322-0](https://doi.org/10.1016/0045-6535(96)00322-0)

Braun, J. C. A., & Colla, L. M. (2023). Use of Microalgae for the Development of Biofertilizers and Biostimulants. *BioEnergy Research*, 16(1), 289–310. <https://doi.org/10.1007/s12155-022-10456-8>

Callegari, A., Bolognesi, S., Cecconet, D., & Capodaglio, A. G. (2020). Production technologies, current role, and future prospects of biofuels feedstocks: A state-of-the-art review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 50(4), 384–436. <https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1629801>

Callejo-López, J. A., Ramírez, M., Cantero, D., & Bolívar, J. (2020). Versatile method to obtain protein- and/or amino acid-enriched extracts from fresh biomass of recalcitrant microalgae without mechanical pretreatment. *Algal Research*, 50.

<https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102010>

- Canizales, S., Castro, C., Saldarriaga, J., & Molina, F. (2013). Evaluation of mature landfill leachates Treatment systems: the case of the landfill Curva de Rodas (Medellín-Colombia). *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, 69, 300–316. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-62302013000400024&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-62302013000400024&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
- Cao, T. N.-D., Mukhtar, H., Le, L.-T., Tran, D. P.-H., Ngo, M. T. T., Pham, M.-D.-T., Nguyen, T.-B., Vo, T.-K.-Q., & Bui, X.-T. (2023). Roles of microalgae-based biofertilizer in sustainability of green agriculture and food-water-energy security nexus. *Science of The Total Environment*, 870, 161927. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161927>
- Cardeña, R., Valdez-Vazquez, I., & Buitrón, G. (2017). Effect of volatile fatty acids mixtures on the simultaneous photofermentative production of hydrogen and polyhydroxybutyrate. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(2), 231–239. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1691-9>
- Casazza, A. A., & Rovatti, M. (2018). Reduction of nitrogen content in landfill leachate using microalga. *Desalination and Water Treatment*, 127, 71–74. <https://doi.org/10.5004/dwt.2018.22537>
- Chang, H, Feng, H., Wang, R., Zhang, X., Wang, J., Li, C., Zhang, Y., Li, L., & Ho, S.-H. (2023). Enhanced energy recovery from landfill leachate by linking light and dark bio-reactions: Underlying synergistic effects of dual microalgal interaction. *Water Research*, 231. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.119578>
- Chang, H, Fu, Q., Zhong, N., Yang, X., Quan, X., Li, S., Fu, J., & Xiao, C. (2019). Microalgal

- lipids production and nutrients recovery from landfill leachate using membrane photobioreactor. *Bioresource Technology*, 277, 18–26.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.027>
- Chang, Haixing, Quan, X., Zhong, N., Zhang, Z., Lu, C., Li, G., Cheng, Z., & Yang, L. (2018). High-efficiency nutrients reclamation from landfill leachate by microalgae *Chlorella vulgaris* in membrane photobioreactor for bio-lipid production. *Bioresource Technology*, 266, 374–381. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.077>
- Chang, W., Li, Y., Qu, Y., Liu, Y., Zhang, G., Zhao, Y., & Liu, S. (2022). Mixotrophic cultivation of microalgae to enhance the biomass and lipid production with synergistic effect of red light and phytohormone IAA. *Renewable Energy*, 187, 819–828.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.renene.2022.01.108>
- Cheah, W. Y., Ling, T. C., Show, P. L., Juan, J. C., Chang, J.-S., & Lee, D.-J. (2016). Cultivation in wastewaters for energy: A microalgae platform. *Applied Energy*, 179, 609–625.  
<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.07.015>
- Cheung, K. C., Chu, L. M., & Wong, M. H. (1993). Toxic effect of landfill leachate on microalgae. *Water, Air, & Soil Pollution*, 69(3–4), 337–349.  
<https://doi.org/10.1007/BF00478169>
- Chia, S. R., Ong, H. C., Chew, K. W., Show, P. L., Phang, S.-M., Ling, T. C., Nagarajan, D., Lee, D.-J., & Chang, J.-S. (2018). Sustainable approaches for algae utilisation in bioenergy production. *Renewable Energy*, 129, 838–852.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.04.001>
- Christenson, L., & Sims, R. (2011). Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advances*, 29(6), 686–702.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.015>

Costa, S. S., Miranda, A. L., de Moraes, M. G., Costa, J. A. V., & Druzian, J. I. (2019).

Microalgae as source of polyhydroxyalkanoates (PHAs) — A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *131*, 536–547.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.099>

Dang, B.-T., Bui, X.-T., Tran, D. P. H., Hao Ngo, H., Nghiem, L. D., Hoang, T.-K.-D., Nguyen,

P.-T., Nguyen, H. H., Vo, T.-K.-Q., Lin, C., Yi Andrew Lin, K., & Varjani, S. (2022).

Current application of algae derivatives for bioplastic production: A review. *Bioresource Technology*, *347*, 126698. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126698>

de Farias Silva, C. E., & Sforza, E. (2016). Carbohydrate productivity in continuous reactor

under nitrogen limitation: Effect of light and residence time on nutrient uptake in *Chlorella vulgaris*. *Process Biochemistry*, *51*(12), 2112–2118.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.09.015>

de Souza, L., Lima, A. S., Matos, Â. P., Wheeler, R. M., Bork, J. A., Vieira Cubas, A. L., &

Moecke, E. H. S. (2021). Biopolishing sanitary landfill leachate via cultivation of lipid-rich *Scenedesmus* microalgae. *Journal of Cleaner Production*, *303*, 127094.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127094>

Deng, Y., Chen, N., Hu, W., Wang, H., Kuang, P., Chen, F., & Feng, C. (2021). Treatment of old

landfill leachate by persulfate enhanced electro-coagulation system: Improving organic matters removal and precipitates settling performance. *Chemical Engineering Journal*, *424*,

130262. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.130262>

Díaz, V., Leyva-Díaz, J. C., Almécija, M. C., Poyatos, J. M., del Mar Muñío, M., & Martín-

Pascual, J. (2022). Microalgae bioreactor for nutrient removal and resource recovery from

wastewater in the paradigm of circular economy. *Bioresource Technology*, 363, 127968.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127968>

Dogaris, I., Loya, B., Cox, J., & Philippidis, G. (2019). Study of landfill leachate as a sustainable source of water and nutrients for algal biofuels and bioproducts using the microalga *Picochlorum oculatum* in a novel scalable bioreactor. *Bioresource Technology*, 282, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.003>

Donneys-Victoria, D., Marriaga-Cabrales, N., Camargo-Amado, R. J., Machuca-Martínez, F., Peralta-Hernández, J. M., & Martínez-Huitile, C. A. (2018). Treatment of landfill leachate by a combined process: Iron electrodisolution, iron oxidation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and chemical flocculation. *Sustainable Environment Research*, 28(1), 12–19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.serj.2017.07.003>

Draaisma, R. B., Wijffels, R. H., (Ellen) Slegers, P. M., Brentner, L. B., Roy, A., & Barbosa, M. J. (2013). Food commodities from microalgae. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(2), 169–177. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.09.012>

Edmundson, S. J., & Wilkie, A. C. (2013). Landfill leachate – a water and nutrient resource for algae-based biofuels. *Environmental Technology*, 34(13–14), 1849–1857. <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.826256>

El-Saadony, M. T., Saad, A. M., El-Wafai, N. A., Abou-Aly, H. E., Salem, H. M., Soliman, S. M., Abd El-Mageed, T. A., Elrys, A. S., Selim, S., Abd El-Hack, M. E., Kappachery, S., El-Tarabily, K. A., & AbuQamar, S. F. (2023). Hazardous wastes and management strategies of landfill leachates: A comprehensive review. *Environmental Technology & Innovation*, 31, 103150. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103150>

El Ouaer, M., Kallel, A., Kasmi, M., Hassen, A., & Trabelsi, I. (2017). Tunisian landfill leachate

- treatment using *Chlorella* sp.: effective factors and microalgae strain performance. *Arabian Journal of Geosciences*, *10*(20). <https://doi.org/10.1007/s12517-017-3241-4>
- Elmaadawy, K., Hu, J., Guo, S., Hou, H., Xu, J., Wang, D., Liang, T., Yang, J., liang, S., Xiao, K., & Liu, B. (2020). Enhanced treatment of landfill leachate with cathodic algal biofilm and oxygen-consuming unit in a hybrid microbial fuel cell system. *Bioresource Technology*, *310*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123420>
- Emalya, N., Mairiza, L., Bilqis, P. Z., Suhendrayatna, S., Munawar, E., & Yunardi, Y. (2023). Removal of Organic and Nitrogen Compounds from Domestic Landfill Leachate by Microalgae. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, *13*(2), 131. <https://doi.org/https://doi.org/10.33263/BRIAC132.131>
- Evans, L., Hennige, S. J., Willoughby, N., Adeloye, A. J., Skroblin, M., & Gutierrez, T. (2017). Effect of organic carbon enrichment on the treatment efficiency of primary settled wastewater by *Chlorella vulgaris*. *Algal Research*, *24*, 368–377. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.011>
- Fan, Z., Qin, L., Zheng, W., Meng, Q., Shen, C., & Zhang, G. (2018). Oscillating membrane photoreactor combined with salt-tolerated *Chlorella pyrenoidosa* for landfill leachates treatment. *Bioresource Technology*, *269*, 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.093>
- Fazal, T., Rehman, M. S. U., Javed, F., Akhtar, M., Mushtaq, A., Hafeez, A., Alaud Din, A., Iqbal, J., Rashid, N., & Rehman, F. (2021). Integrating bioremediation of textile wastewater with biodiesel production using microalgae (*Chlorella vulgaris*). *Chemosphere*, *281*, 130758. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130758>
- Fei, Q., Fu, R., Shang, L., Brigham, C. J., & Chang, H. N. (2015). Lipid production by

- microalgae *Chlorella protothecoides* with volatile fatty acids (VFAs) as carbon sources in heterotrophic cultivation and its economic assessment. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38(4), 691–700. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1308-0>
- Feng, H., Sun, C., Zhang, C., Chang, H., Zhong, N., Wu, W., Wu, H., Tan, X., Zhang, M., & Ho, S.-H. (2022). Bioconversion of mature landfill leachate into biohydrogen and volatile fatty acids via microalgal photosynthesis together with dark fermentation. *Energy Conversion and Management*, 252, 115035. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enconman.2021.115035>
- Ferre-Guell, A., & Winterburn, J. (2017). Production of the copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with varied composition using different nitrogen sources with *Haloferax mediterranei*. *Extremophiles*, 21(6), 1037–1047. <https://doi.org/10.1007/s00792-017-0964-9>
- Ferreira, A., Melkonyan, L., Carapinha, S., Ribeiro, B., Figueiredo, D., Avetisova, G., & Gouveia, L. (2021). Biostimulant and biopesticide potential of microalgae growing in piggery wastewater. *Environmental Advances*, 4, 100062. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envadv.2021.100062>
- Franco-Morgado, M., Amador-Espejo, G. G., Pérez-Cortés, M., & Gutiérrez-Urbe, J. A. (2023). Microalgae and cyanobacteria polysaccharides: Important link for nutrient recycling and revalorization of agro-industrial wastewater. *Applied Food Research*, 3(1), 100296. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.afres.2023.100296>
- Gao, F., Yang, H.-L., Li, C., Peng, Y.-Y., Lu, M.-M., Jin, W.-H., Bao, J.-J., & Guo, Y.-M. (2019). Effect of organic carbon to nitrogen ratio in wastewater on growth, nutrient uptake and lipid accumulation of a mixotrophic microalgae *Chlorella* sp. *Bioresource Technology*,

282, 118–124. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.011>

García, G., Sosa-Hernández, J. E., Rodas-Zuluaga, L. I., Castillo-Zacarías, C., Iqbal, H., & Parra-Saldívar, R. (2021). Accumulation of PHA in the Microalgae *Scenedesmus* sp. under Nutrient-Deficient Conditions. *Polymers*, *13*(1). <https://doi.org/10.3390/polym13010131>

García, P. F. (2019). *Manejo y Tratamiento de Lixiviados en Rellenos Sanitarios: Revisión bibliográfica y Experiencia en Planta de Tratamiento de Lixiviados de Navarra* (pp. 1–15). Especialización en Gerencia Ambiental y Desarrollo Sostenible Empresarial, Universidad Santiago de Cali.

Ghosh, P., Thakur, I. S., & Kaushik, A. (2017). Bioassays for toxicological risk assessment of landfill leachate: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *141*, 259–270. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.023>

Gobierno de la Republica de Colombia. (2019). *Estrategia nacional de economía circular. Cierre de ciclos de materiales, innovación tecnológica, colaboración y nuevos modelos de negocio*. Presidencia de la República; Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible; Ministerio de Comercio, Industria y Turismo. ISBN : 978-958-5551-16-9.

Gomez, A. M., Yannarell, A. C., Sims, G. K., Cadavid-Restrepo, G., & Moreno Herrera, C. X. (2011). Characterization of bacterial diversity at different depths in the Moravia Hill landfill site at Medellín, Colombia. *Soil Biology and Biochemistry*, *43*(6), 1275–1284. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.02.018>

Hariz, H. B., Takriff, M. S., Mohd Yasin, N. H., Ba-Abbad, M. M., & Mohd Hakimi, N. I. N. (2019). Potential of the microalgae-based integrated wastewater treatment and CO<sub>2</sub> fixation system to treat Palm Oil Mill Effluent (POME) by indigenous microalgae; *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. *Journal of Water Process Engineering*, *32*, 100907.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.100907>

Hernández-García, A, Velásquez-Orta, S. B., Novelo, E., Yáñez-Noguez, I., Monje-Ramírez, I., & Orta Ledesma, M. T. (2019). Wastewater-leachate treatment by microalgae: Biomass, carbohydrate and lipid production. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *174*, 435–444.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.052>

Ho, S.-H., Huang, S.-W., Chen, C.-Y., Hasunuma, T., Kondo, A., & Chang, J.-S. (2013). Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Bioresource Technology*, *135*, 191–198.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.015>

Hu, D., Zhang, J., Chu, R., Yin, Z., Hu, J., Kristianto Nugroho, Y., Li, Z., & Zhu, L. (2021). Microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus* co-cultivation with landfill leachate for pollutant removal and lipid production. *Bioresource Technology*, *342*, 126003.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126003>

Hu, J., Nagarajan, D., Zhang, Q., Chang, J.-S., & Lee, D.-J. (2018). Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. *Biotechnology Advances*, *36*(1), 54–67.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.09.009>

Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. *Plant Journal*, *54*(4), 621–639. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x>

Izadpanah, M., Gheshlaghi, R., Mahdavi, M. A., & Elkamel, A. (2018). Effect of light spectrum on isolation of microalgae from urban wastewater and growth characteristics of subsequent cultivation of the isolated species. *Algal Research*, *29*, 154–158.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.029>

- Jacob-Lopes, E., Scoparo, C. H. G., Lacerda, L. M. C. F., & Franco, T. T. (2009). Effect of light cycles (night/day) on CO<sub>2</sub> fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48(1), 306–310. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cep.2008.04.007>
- Jaiswal, K. K., Dutta, S., Banerjee, I., Pohrmen, C. B., & Kumar, V. (2021). Photosynthetic microalgae-based carbon sequestration and generation of biomass in biorefinery approach for renewable biofuels for a cleaner environment. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01504-y>
- Juneja, A., Ceballos, R. M., & Murthy, G. S. (2013). Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review. In *Energies* (Vol. 6, Issue 9, pp. 4607–4638). <https://doi.org/10.3390/en6094607>
- Kanyatrakul, A., Prakhongsak, A., Honda, R., Phanwilai, S., Treesubsuntorn, C., & Boonnorat, J. (2020). Effect of leachate effluent from activated sludge and membrane bioreactor systems with acclimatized sludge on plant seed germination. *Science of The Total Environment*, 724, 138275. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138275>
- Kaparapu, J. (2018). *Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production by Genetically Engineered Microalgae: A Review*.
- Kazamia, E., Riseley, A. S., Howe, C. J., & Smith, A. G. (2014). An Engineered Community Approach for Industrial Cultivation of Microalgae. *Industrial Biotechnology*, 10(3), 184–190. <https://doi.org/10.1089/ind.2013.0041>
- Khanzada, Z. T., & Övez, S. (2017). Microalgae as a sustainable biological system for improving leachate quality. *Energy*, 140, 757–765. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2017.08.112>

- Kim, S. M., Kim, J. Y., Park, J., Bae, E. H., Kang, J.-S., Kim, K. Y., & Choi, Y.-E. (2023). Volatile fatty acid-treated mixotrophic cultivation of lipid/carbohydrate-rich cyanobacterial species, *Pseudanabaena mucicola* GO0704, for the enhancement of biofuel production. *Bioresource Technology*, 367, 128066. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128066>
- Kumar, Vinay, Sharma, N., Umesh, M., Chakraborty, P., Kaur, K., Duhan, L., Sarojini, S., Thazeem, B., Pasrija, R., Vangnai, A. S., & Maitra, S. S. (2023). Micropollutants characteristics, fate, and sustainable removal technologies for landfill leachate: A technical perspective. *Journal of Water Process Engineering*, 53, 103649. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2023.103649>
- Kumar, Vinod, Arora, N., Nanda, M., & Pruthi, V. (2019). *Different Cell Disruption and Lipid Extraction Methods from Microalgae for Biodiesel Production BT - Microalgae Biotechnology for Development of Biofuel and Wastewater Treatment* (M. A. Alam & Z. Wang (eds.); pp. 265–292). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-2264-8\\_12](https://doi.org/10.1007/978-981-13-2264-8_12)
- Kumari, M., Ghosh, P., & Thakur, I. S. (2016). Landfill leachate treatment using bacto-algal co-culture: An integrated approach using chemical analyses and toxicological assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 128, 44–51. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.02.009>
- Kurniawan, T. A., Othman, M. H. D., Liang, X., Goh, H. H., & Chew, K. W. (2023). From liquid waste to mineral fertilizer: Recovery, recycle and reuse of high-value macro-nutrients from landfill leachate to contribute to circular economy, food security, and carbon neutrality. *Process Safety and Environmental Protection*, 170, 791–807.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.psep.2022.12.068>

Kurniawan, T. A., Singh, D., Avtar, R., Othman, M. H. D., Hwang, G. H., Albadarin, A. B., Rezakazemi, M., Setiadi, T., & Shirazian, S. (2021). Resource recovery from landfill leachate: An experimental investigation and perspectives. *Chemosphere*, 274, 129986. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129986>

Lambolez, L., Vasseur, P., Ferard, J. F., & Gisbert, T. (1994). The environmental risks of industrial waste disposal: An experimental approach including acute and chronic toxicity studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 28(3), 317–328. <https://doi.org/10.1006/eesa.1994.1056>

Leal Medina, G. I., Abril Bonett, J. E., Martínez Gélvez, S. J., Muñoz Peñaloza, Y. A., Peñaranda Lizarazo, E. M., & Urbina Suárez, N. A. (2017). Producción de Ácidos Grasos Poliinsaturados a partir de Biomasa Microalgal en un Cultivo Heterotrófico . In *Revista ION* (Vol. 30, pp. 91–103). scieloco .

Lee, H., Coulon, F., & Wagland, S. T. (2022). Influence of pH, depth and humic acid on metal and metalloids recovery from municipal solid waste landfills. *Science of the Total Environment*, 806. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150332>

León-Gómez, H. de, Cruz-Vega, C. R., Dávila-Pórcel, R. A., Velasco-Tapia, F., & Chapa-Guerrero, J. R. (2015). Impacto del lixiviado generado en el relleno sanitario municipal de Linares (Nuevo León) sobre la calidad del agua superficial y subterránea . In *Revista mexicana de ciencias geológicas* (Vol. 32, pp. 514–526). scielomx .

Leong, W. H., Saman, N. A. M., Kiatkittipong, W., Assabumrungrat, S., Najdanovic-Visak, V., Wang, J., Khoo, K. S., Lam, M. K., Mohamad, M., & Lim, J. W. (2022). Photoperiod-induced mixotrophic metabolism in *Chlorella vulgaris* for high biomass and lipid to

- biodiesel productions using municipal wastewater medium. *Fuel*, 313, 123052.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.123052>
- Li, J., Bin, H., Lin, J., Chen, F., & Miao, X. (2016). Effects of light-emitting diodes under capped daily energy consumption with combinations of electric power and photoperiod on cultivation of *Chlorella pyrenoidosa*. *Bioresource Technology*, 205, 126–132.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.041>
- Li, K., Liu, Q., Fang, F., Luo, R., Lu, Q., Zhou, W., Huo, S., Cheng, P., Liu, J., Addy, M., Chen, P., Chen, D., & Ruan, R. (2019). Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: A review. *Bioresource Technology*, 291, 121934.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121934>
- Lian, J., Wijffels, R. H., Smidt, H., & Sipkema, D. (2018). The effect of the algal microbiome on industrial production of microalgae. *Microbial Biotechnology*, 11(5), 806–818.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1751-7915.13296>
- Liao, Q., Chang, H.-X., Fu, Q., Huang, Y., Xia, A., Zhu, X., & Zhong, N. (2018). Physiological-phased kinetic characteristics of microalgae *Chlorella vulgaris* growth and lipid synthesis considering synergistic effects of light, carbon and nutrients. *Bioresource Technology*, 250, 583–590. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.086>
- Lin, L., Chan, G. Y. S., Jiang, B. L., & Lan, C. Y. (2007). Use of ammoniacal nitrogen tolerant microalgae in landfill leachate treatment. *Waste Management*, 27(10), 1376–1382.  
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2006.09.001>
- Liu, J., Yin, J., Ge, Y., Han, H., Liu, M., & Gao, F. (2021). Improved lipid productivity of *Scenedesmus obliquus* with high nutrient removal efficiency by mixotrophic cultivation in actual municipal wastewater. *Chemosphere*, 285, 131475.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131475>

Liu, R., Li, S., Tu, Y., Hao, X., & Qiu, F. (2022). Recovery of value-added products by mining microalgae. *Journal of Environmental Management*, 307, 114512.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.114512>

Luo, H., Zeng, Y., Cheng, Y., He, D., & Pan, X. (2020). Recent advances in municipal landfill leachate: A review focusing on its characteristics, treatment, and toxicity assessment. *Science of The Total Environment*, 703, 135468.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135468>

Lutzu, G. A., Ciurli, A., Chiellini, C., Di Caprio, F., Concas, A., & Dunford, N. T. (2021). Latest developments in wastewater treatment and biopolymer production by microalgae. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(1), 104926.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104926>

Madera-Parra, C. A., Peña-Salamanca, E. J., Peña, M. R., Rousseau, D. P. L., & Lens, P. N. L. (2015). Phytoremediation of Landfill Leachate with *Colocasia esculenta*, *Gynerum sagittatum* and *Heliconia psittacorum* in Constructed Wetlands. *International Journal of Phytoremediation*, 17(1), 16–24. <https://doi.org/10.1080/15226514.2013.828014>

Mahapatra, D. M., Chanakya, H. N., & Ramachandra, T. V. (2014). Bioremediation and lipid synthesis through mixotrophic algal consortia in municipal wastewater. *Bioresource Technology*, 168, 142–150. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.130>

Martínez-Ruiz, M., Molina-Vázquez, A., Santiesteban-Romero, B., Reyes-Pardo, H., Villaseñor-Zepeda, K. R., Meléndez-Sánchez, E. R., Araújo, R. G., Sosa-Hernández, J. E., Bilal, M., Iqbal, H. M. N., & Parra-Saldivar, R. (2022). Micro-algae assisted green bioremediation of water pollutants rich leachate and source products recovery. *Environmental Pollution*, 306,

119422. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119422>

- Mehariya, S., Plöhn, M., Jablonski, P., Stagge, S., Jönsson, L. J., & Funk, C. (2023). Biopolymer production from biomass produced by Nordic microalgae grown in wastewater. *Bioresource Technology*, *376*, 128901. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128901>
- Mennaa, F. Z., Arbib, Z., & Perales, J. A. (2015). Urban wastewater treatment by seven species of microalgae and analgal bloom: Biomass production, N and P removal kinetics and harvestability. *Water Research*, *83*, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.06.007>
- Mishra, S. K., Suh, W. I., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M. S., & Yang, J.-W. (2014). Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource Technology*, *155*, 330–333. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.077>
- Morais Junior, W. G., Gorgich, M., Corrêa, P. S., Martins, A. A., Mata, T. M., & Caetano, N. S. (2020). Microalgae for biotechnological applications: Cultivation, harvesting and biomass processing. *Aquaculture*, *528*, 735562. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735562>
- Mukherjee, S., Mukhopadhyay, S., Hashim, M. A., & Sen Gupta, B. (2015). Contemporary Environmental Issues of Landfill Leachate: Assessment and Remedies. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, *45*(5), 472–590. <https://doi.org/10.1080/10643389.2013.876524>
- Mustafa, E.-M., Phang, S.-M., & Chu, W.-L. (2012). Use of an algal consortium of five algae in the treatment of landfill leachate using the high-rate algal pond system. *Journal of Applied Phycology*, *24*(4), 953–963. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9716-x>
- Narindri Rara Winayu, B., Tung Lai, K., Ta Hsueh, H., & Chu, H. (2021). Production of

- phycobiliprotein and carotenoid by efficient extraction from *Thermosynechococcus* sp. CL-1 cultivation in swine wastewater. *Bioresource Technology*, 319, 124125. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124125>
- Nawaz, T., Rahman, A., Pan, S., Dixon, K., Petri, B., & Selvaratnam, T. (2020). A Review of Landfill Leachate Treatment by Microalgae: Current Status and Future Directions. *Processes*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/pr8040384>
- Nayak, M., Karemore, A., & Sen, R. (2016). Performance evaluation of microalgae for concomitant wastewater bioremediation, CO<sub>2</sub> biofixation and lipid biosynthesis for biodiesel application. *Algal Research*, 16, 216–223. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.020>
- Nguyen, H. T. H., & Min, B. (2020). Leachate treatment and electricity generation using an algae-cathode microbial fuel cell with continuous flow through the chambers in series. *Science of The Total Environment*, 723, 138054. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138054>
- Nguyen, H. T., Yoon, Y., Ngo, H. H., & Jang, A. (2021). The application of microalgae in removing organic micropollutants in wastewater. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 51(12), 1187–1220. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1753633>
- Nordin, N., Yusof, N., & Samsudin, S. (2017). Biomass Production of *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., and *Oscillatoria* sp. in Nitrified Landfill Leachate. *Waste and Biomass Valorization*, 8(7), 2301–2311. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9709-8>
- Okurowska, K., Karunakaran, E., Al-Farttoosy, A., Couto, N., & Pandhal, J. (2021). Adapting the algal microbiome for growth on domestic landfill leachate. *Bioresource Technology*,

319, 124246. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124246>

Omar, H., & Rohani, S. (2015). Treatment of landfill waste, leachate and landfill gas: A review.

*Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 9(1), 15–32.

<https://doi.org/10.1007/s11705-015-1501-y>

Ortiz Alvarez, M. D., Barajas Ferreira, C., García Martínez, J. B., Barajas Solano, A. F., &

Machuca Martínez, F. (2023). Análisis bibliométrico de cultivos de microalgas en lixiviados de relleno sanitario. *INGENIERÍA Y COMPETITIVIDAD*, 25(2 SE-Artículos de Revisión),

e-12444. <https://doi.org/10.25100/iyc.v25i2.12444>

Paiva, A. L. P., Gonçalves da Fonseca Silva, D., & Couto, E. (2021). Recycling of landfill

leachate nutrients from microalgae and potential applications for biomass valorization.

*Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(5).

<https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105952>

Paskuliakova, A., McGowan, T., Tonry, S., & Touzet, N. (2018a). Microalgal bioremediation of

nitrogenous compounds in landfill leachate – The importance of micronutrient balance in the treatment of leachates of variable composition. *Algal Research*, 32, 162–171.

<https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.03.010>

Paskuliakova, A., McGowan, T., Tonry, S., & Touzet, N. (2018b). Phycoremediation of landfill

leachate with the chlorophyte *Chlamydomonas* sp. SW15aRL and evaluation of toxicity pre and post treatment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147, 622–630.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.010>

Paskuliakova, A., Tonry, S., & Touzet, N. (2016). Phycoremediation of landfill leachate with

chlorophytes: Phosphate a limiting factor on ammonia nitrogen removal. *Water Research*,

99, 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.04.029>

- Patel, A., Krikigianni, E., Rova, U., Christakopoulos, P., & Matsakas, L. (2022). Bioprocessing of volatile fatty acids by oleaginous freshwater microalgae and their potential for biofuel and protein production. *Chemical Engineering Journal*, 438, 135529. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.135529>
- Patel, A., Sarkar, O., Rova, U., Christakopoulos, P., & Matsakas, L. (2021). Valorization of volatile fatty acids derived from low-cost organic waste for lipogenesis in oleaginous microorganisms-A review. *Bioresource Technology*, 321, 124457. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124457>
- Pereira, S. F. L., Gonçalves, A. L., Moreira, F. C., Silva, T. F. C. V., Vilar, V. J. P., & Pires, J. C. M. (2016). Nitrogen removal from landfill leachate by microalgae. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(11). <https://doi.org/10.3390/ijms17111926>
- Pinpatthanapong, K., Khetkorn, W., Honda, R., Phattarapattamawong, S., Treesubsuntorn, C., Panasan, N., Boonmawat, P., Tianthong, Y., Lipiloet, S., Sorn, S., Jutakanoke, R., Prachanurak, P., & Boonnorat, J. (2022). Effects of high-strength landfill leachate effluent on stress-induced microalgae lipid production and post-treatment micropollutant degradation. *Journal of Environmental Management*, 324, 116367. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116367>
- Porto, B., Gonçalves, A. L., Esteves, A. F., de Souza, S. M. A. G. U., de Souza, A. A. U., Vilar, V. J. P., & Pires, J. C. M. (2021). Assessing the potential of microalgae for nutrients removal from a landfill leachate using an innovative tubular photobioreactor. *Chemical Engineering Journal*, 413, 127546. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.127546>
- Quan, X., Hu, R., Chang, H., Tang, X., Huang, X., Cheng, C., Zhong, N., & Yang, L. (2020). Enhancing microalgae growth and landfill leachate treatment through ozonization. *Journal*

- of Cleaner Production*, 248. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119182>
- Ray, A., Nayak, M., & Ghosh, A. (2022). A review on co-culturing of microalgae: A greener strategy towards sustainable biofuels production. *Science of The Total Environment*, 802, 149765. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149765>
- Razzak, Shaikh A, Lucky, R. A., Hossain, M. M., & deLasa, H. (2022). Valorization of Microalgae Biomass to Biofuel Production: A review. *Energy Nexus*, 7, 100139. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nexus.2022.100139>
- Razzak, Shaikh Abdur, Ali, S. A. M., Hossain, M. M., & deLasa, H. (2017). Biological CO2 fixation with production of microalgae in wastewater – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 76, 379–390. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.02.038>
- Rizwan, M., Mujtaba, G., Memon, S. A., Lee, K., & Rashid, N. (2018). Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 92, 394–404. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.034>
- Rubio Fernández, D., Barrera Flórez, N. A., Fonseca Buitrago, L. A., & Jaimes Baquero, C. E. (2017). Aspectos teóricos de la extracción de carotenoides a partir de microalgas. *Fundación Universidad de América. Semilleros Formación Investigativa*, 3(1), 35–48.
- Rueda, E., & García, J. (2021). Optimization of the phototrophic Cyanobacteria polyhydroxybutyrate (PHB) production by kinetic model simulation. *Science of The Total Environment*, 800, 149561. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149561>
- Saadat, E., Ghorbanzadeh, N., Farhangi, M. B., & Fazeli Sangani, M. (2023). Potential application of *Chlorella* sp. biomass cultivated in landfill leachate as agricultural fertilizer. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 69(8), 1193–1208.

<https://doi.org/10.1080/03650340.2022.2073351>

- Saldarriaga, L. F., Almenglo, F., Cantero, D., & Ramírez, M. (2021). Influence of leachate and nitrifying bacteria on photosynthetic biogas upgrading in a two-stage system. *Processes*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/pr9091503>
- Saldarriaga, L. F., Almenglo, F., Ramírez, M., & Cantero, D. (2020). Kinetic characterization and modeling of a microalgae consortium isolated from landfill leachate under a high CO<sub>2</sub> concentration in a bubble column photobioreactor. *Electronic Journal of Biotechnology*, 44, 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.01.006>
- Sallenave, R., & Fomin, A. (1997). Some advantages of the duckweed test to assess the toxicity of environmental samples. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 25(3), 135–140. <https://doi.org/10.1002/aheh.19970250304>
- Samadhiya, K., Ghosh, A., Nogueira, R., & Bala, K. (2022). Newly isolated native microalgal strains producing polyhydroxybutyrate and energy storage precursors simultaneously: Targeting microalgal biorefinery. *Algal Research*, 62, 102625. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102625>
- Sardi-Saavedra, A., Peña-Salamanca, E. J., Madera-Parra, C. A., & Cerón-Hernández, V. A. (2016). Diversity of algal communities associated with a photosynthetic high rate algal system for bioremediation landfill leachate. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44(1), 113–120. <https://doi.org/10.3856/vol44-issue1-fulltext-11>
- Sardi Saavedra, A., Madera Parra, C., Peña Salamanca, E. J., Cerón, V. A., & Mosquera, J. (2018). Grupos funcionales fitoplanctónicos en una laguna algal de alta tasa usada para la biorremediación de lixiviados de rellenos sanitarios. *Acta Biologica Colombiana*, 23(3), 295–303. <https://doi.org/10.15446/abc.v23n3.69537>

- Sforza, E., Khairallah Al Emara, M.-H., Sharif, A., & Bertucco, A. (2015). Exploitation of urban landfill leachate as nutrient source for microalgal biomass production. *Chemical Engineering Transactions*, *43*, 373–378. <https://doi.org/10.3303/CET1543063>
- Shaari, A. L., Sa, S. N. C., Surif, M., Zolkarnain, N., & Ghazali, R. (2021). Growth of marine microalgae in landfill leachate and their ability as pollutants removal. *Tropical Life Sciences Research*, *32*(2), 133–146. <https://doi.org/10.21315/tlsr2021.32.2.9>
- Shashirekha, V., Sridharan, M. R., & Swamy, M. (2011). Bioremediation of Tannery Effluents Using a Consortium of Blue-Green Algal Species. *Clean - Soil, Air, Water*, *39*(9), 863–873. <https://doi.org/10.1002/clen.201000548>
- Sniffen, K. D., Sales, C. M., & Olson, M. S. (2016). Nitrogen removal from raw landfill leachate by an algae-bacteria consortium. *Water Science and Technology*, *73*(3), 479–485. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.499>
- Song, Y., Wang, L., Qiang, X., Gu, W., Ma, Z., & Wang, G. (2022). The promising way to treat wastewater by microalgae: Approaches, mechanisms, applications and challenges. *Journal of Water Process Engineering*, *49*, 103012. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.103012>
- Su, Y. (2021). Revisiting carbon, nitrogen, and phosphorus metabolisms in microalgae for wastewater treatment. *Science of The Total Environment*, *762*, 144590. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144590>
- Sun, D., Zhang, Z., Zhang, Y., Cheng, K.-W., & Chen, F. (2019). Light induces carotenoids accumulation in a heterotrophic docosahexaenoic acid producing microalga, *Cryptocodinium* sp. SUN. *Bioresource Technology*, *276*, 177–182. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.093>

- Tang, C., Gao, X., Hu, D., Dai, D., Qv, M., Liu, D., & Zhu, L. (2023). Nutrient removal and lipid production by the co-cultivation of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus* in landfill leachate diluted with recycled harvesting water. *Bioresource Technology*, *369*, 128496. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128496>
- Tighiri, H. O., & Erkurt, E. A. (2019). Biotreatment of landfill leachate by microalgae-bacteria consortium in sequencing batch mode and product utilization. *Bioresource Technology*, *286*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121396>
- van Eck, N. J., & Waltman, L. (2010). Software survey: VOSviewer, a computer program for bibliometric mapping. *Scientometrics*, *84*(2), 523–538. <https://doi.org/10.1007/s11192-009-0146-3>
- Viegas, C., Nobre, C., Mota, A., Vilarinho, C., Gouveia, L., & Gonçalves, M. (2021). A circular approach for landfill leachate treatment: Chemical precipitation with biomass ash followed by bioremediation through microalgae. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *9*(3). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105187>
- Wahidin, S., Idris, A., & Shaleh, S. R. M. (2013). The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioresource Technology*, *129*, 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.032>
- Wan, C., Alam, M. A., Zhao, X.-Q., Zhang, X.-Y., Guo, S.-L., Ho, S.-H., Chang, J.-S., & Bai, F.-W. (2015). Current progress and future prospect of microalgal biomass harvest using various flocculation technologies. *Bioresource Technology*, *184*, 251–257. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.081>
- Wang, C., Qi, M., Guo, J., Zhou, C., Yan, X., Ruan, R., & Cheng, P. (2022). The Active Phytohormone in Microalgae: The Characteristics, Efficient Detection, and Their Adversity

- Resistance Applications. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 1).  
<https://doi.org/10.3390/molecules27010046>
- Wang, H., Wu, B., Liu, J., Jiang, N., Zhou, H., Liu, J., Zhao, Y., Xu, J., & Wang, H. (2023). Simultaneous purification of anaerobic digestion slurry and enhancement in produced biogas using different microalgae-based technologies under a variety of mixed light wavelengths and photoperiods. *Energy*, 273, 127313.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.energy.2023.127313>
- Wang, Y., Guo, W., Yen, H.-W., Ho, S.-H., Lo, Y.-C., Cheng, C.-L., Ren, N., & Chang, J.-S. (2015). Cultivation of *Chlorella vulgaris* JSC-6 with swine wastewater for simultaneous nutrient/COD removal and carbohydrate production. *Bioresource Technology*, 198, 619–625. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.067>
- Wicker, R. J., Autio, H., Daneshvar, E., Sarkar, B., Bolan, N., Kumar, V., & Bhatnagar, A. (2022). The effects of light regime on carbon cycling, nutrient removal, biomass yield, and polyhydroxybutyrate (PHB) production by a constructed photosynthetic consortium. *Bioresource Technology*, 363, 127912.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127912>
- Wu, J.-Y., Lay, C.-H., Chiong, M.-C., Chew, K. W., Chen, C.-C., Wu, S.-Y., Zhou, D., Kumar, G., & Show, P. L. (2020). Immobilized *Chlorella* species mixotrophic cultivation at various textile wastewater concentrations. *Journal of Water Process Engineering*, 38, 101609.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101609>
- Yan, C., Zhu, L., & Wang, Y. (2016). Photosynthetic CO<sub>2</sub> uptake by microalgae for biogas upgrading and simultaneously biogas slurry decontamination by using of microalgae photobioreactor under various light wavelengths, light intensities, and photoperiods.

- Applied Energy*, 178, 9–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.06.012>
- Zapata, D., Arroyave, C., Cardona, L., Aristizábal, A., Poschenrieder, C., & Llugany, M. (2021). Phytohormone production and morphology of *Spirulina platensis* grown in dairy wastewaters. *Algal Research*, 59, 102469. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102469>
- Zhang, B., Li, W., Guo, Y., Zhang, Z., Shi, W., Cui, F., Lens, P. N. L., & Tay, J. H. (2020). Microalgal-bacterial consortia: From interspecies interactions to biotechnological applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 118, 109563. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109563>
- Zhao, X., Zhou, Y., Huang, S., Qiu, D., Schideman, L., Chai, X., & Zhao, Y. (2014). Characterization of microalgae-bacteria consortium cultured in landfill leachate for carbon fixation and lipid production. *Bioresource Technology*, 156, 322–328. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.112>
- Zhu, L., Wang, Z., Shu, Q., Takala, J., Hiltunen, E., Feng, P., & Yuan, Z. (2013). Nutrient removal and biodiesel production by integration of freshwater algae cultivation with piggery wastewater treatment. *Water Research*, 47(13), 4294–4302. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.05.004>
- Znad, H., Al Ketife, A. M. D., Judd, S., AlMomani, F., & Vuthaluru, H. B. (2018). Bioremediation and nutrient removal from wastewater by *Chlorella vulgaris*. *Ecological Engineering*, 110, 1–7. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.10.008>