

Remoción de gasoil por un consorcio microalgal proveniente de Isla de Toas, municipio Almirante Padilla, estado Zulia

Díaz-Borrego Laugeny¹, Durán Osorio Cinthia Katherin², Sanguino Vega Isis Angélica², Albugued Desireé¹ y Morales Ever¹.

¹Universidad del Zulia, Facultad Experimental de Ciencias, Departamento de Biología, Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos.

²Universidad Rafael Urdaneta. Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería Química. Maracaibo, estado Zulia, Venezuela.

Correo electrónico: laugenydiaz221172@gmail.com, cynthyha_25@hotmail.com, isasave2002@hotmail.com, albugued@hotmail.com y Darevmo52@yahoo.com

Recibido: 19-0-2021

Aceptado: 12-04-2021

Resumen

Se determinó la capacidad de remoción de gasoil por un consorcio microalgal (*Chlorella* sp. y *Oocystis* sp.) proveniente de la Isla de Toas, municipio Almirante Padilla, estado Zulia. Se escaló el consorcio, empleando un medio de cultivo compuesto por Algal 8 mM (16 mL/L) y Nitrofoska (0,5 mL/L), renovados aproximadamente cada 10 días y en condiciones fisicoquímicas óptimas para el crecimiento microbiano: fotoperíodo luz: oscuridad 12:12 h (4klux), agitación manual diaria y temperatura de 30 ± 2 °C. Luego se diluyó la biomasa en el medio de cultivo hasta obtener una densidad celular (dc) de 2×10^6 cel/mL para un volumen de 7200 mL, que fue distribuido en fiolas de vidrio con capacidad de 500 mL para los tratamientos con 0% (control) 0,25%, 0,5% y 1% de gasoil durante 30 días. Se evaluó el efecto del gasoil en el crecimiento del consorcio microalgal mediante seguimiento del pH, recuento de bacterias asociadas, producción de pigmentos (clorofila total y carotenoides totales) y composición bioquímica (carbohidratos totales, lípidos totales y proteínas totales) mediante técnicas estandarizadas de laboratorio. Finalmente, se cuantificó el porcentaje de remoción de hidrocarburos totales del gasoil por el consorcio microalgal empleando el método gravimétrico. Se obtuvo el siguiente orden de remoción de hidrocarburos: al 0,25% ($71,85 \pm 0,26$ %), 0,5% ($68,91 \pm 1,38$ %) y 1% ($62,58 \pm 2,06$ %). También se evidenció que el gasoil afectó el crecimiento, producción de pigmentos y de biomoléculas del consorcio. Se concluye que el consorcio microalgal fue capaz de remover más del 60% del gasoil, recomendando su uso en experimentos de biorremediación.

Palabras clave: Consorcio microalgal, gasoil, biorremediación.

Diesel oil removal by a microalgal consortium from Isla de Toas, municipio Almirante Padilla, estado Zulia

Abstract

The diesel removal capacity was determined by a microalgal consortium (*Chlorella* sp. and *Oocystis* sp.) from Isla de Toas, municipio Almirante Padilla, estado Zulia. The consortium was scaled up, using a culture medium composed of 8 mM Algal (16 mL / L) and Nitrofoska (0.5 mL / L), renewed approximately every 10 days and under optimal physicochemical conditions for microbial growth: light photoperiod: darkness 12:12 h (4klux), daily manual shaking and temperature of 30 ± 2 °C. Then the biomass was diluted in the culture medium until obtaining a cell density (dc) of 2×10^6 cells / mL for a volume of 7200 mL. It was distributed in glass flasks with a capacity of 500 mL for the treatments with 0% (control) 0.25%, 0.5% and 1% diesel for 30 days. The effect of diesel oil on the growth of the microalgal consortium was evaluated by monitoring the pH, count of associated bacteria, pigment production (total chlorophyll and total carotenoids) and biochemical composition (total carbohydrates, total lipids and total proteins) in the laboratory. Finally, the percentage of removal of total hydrocarbons from diesel oil by the microalgal consortium was quantified using the gravimetric method. The following order of hydrocarbon removal was obtained: at 0.25% (71.85 ± 0.26 %), 0.5% (68.91 ± 1.38 %) and 1% ($62.58 \pm 2, 06$ %). There was also evidence of an effect of diesel on the growth, production of pigments and biomolecules of the consortium. It is concluded

that the microalgal consortium was able to remove more than 60% of the diesel, recommending its use in bioremediation experiments.

Key Words: Microalgal consortium, diesel, bioremediation.

Introducción

La Isla de Toas se encuentra localizada al sur del Golfo de Venezuela, se considera como la segunda isla de mayor tamaño del municipio Almirante Padilla del estado Zulia. La comunidad ha venido experimentando un notable incremento en la actividad pesquera y desarrollo turístico-costero. Las embarcaciones constituyen el medio de transporte utilizado como conexión entre la Isla y otras localidades, las cuales tienen al Puerto de Lanchas como espacio destinado y orientado al flujo de mercancía y pasajeros. En esta área, frecuentemente se presentan derrames del combustible gasoil debido a los motores fuera de borda empleados en las embarcaciones. Estas acciones antropogénicas afectan directamente a las especies de dicha localidad puesto que contaminan el ecosistema lacustre causando daños a los organismos que habitan en la zona, lo que puede afectar la salud de los pobladores y turistas que visitan la isla.

En los últimos años ha comenzado a implementarse el uso de microalgas como agentes de biorremoción de contaminantes petrolizados, debido a que se ha documentado que los hidrocarburos en los ambientes naturales y artificiales pueden ser atacados para su biodegradación y biotransformación por diversas microalgas y cianobacterias; además éstas proveen de oxígeno y nutrientes a otros microorganismos para potenciar la degradación de materia orgánica. Muñoz y Guieyys [1] y Ghasemi *et al.* [2]. No obstante, las investigaciones sobre este tópico en Venezuela son escasas, es por ello que este trabajo plantea evaluar la remoción de gasoil por acción de un consorcio microalgal autóctono de Isla de Toas y valorar su potencial en la biorremediación de las aguas costeras.

Parte Experimental

Escalado del consorcio microalgal.

Las microalgas empleadas en este trabajo provinieron de aguas costeras contaminadas con combustible, del puerto de lanchas de Isla de Toas y se encuentran depositadas en el cepario del Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos de la Universidad del Zulia. Una vez realizada la siembra de las microalgas en los tubos de ensayo, se procedió al traspaso en fiolas de 250 mL (aproximadamente de 2 a 3 tubos por fiola), a su vez, se añadió periódicamente el medio de cultivo para aumentar el volumen, al tornarse el cultivo de color verde oscuro (lo cual era indicativo del crecimiento celular), se traspasó nuevamente a fiolas de 500 mL (previamente esterilizadas) y se suministró medio de cultivo nuevo cada 10 días.

El medio de cultivo utilizado para el escalado del consorcio microalgal estaba conformado por una solución de Nitrofoska® (0,5mL/L) y Algal 8 mM (16mL/L) en agua destilada. Se mantuvieron condiciones de: temperatura ambiente $\pm 30^{\circ}$ C, fotoperíodo luz: oscuridad 12 h: 12h a 4 Klux y agitación manual diaria. Para asegurar un crecimiento próspero, se tomaron muestras representativas de cada fiola y se examinaron bajo el microscopio con un aumento de 400X.

Evaluación de la biomasa e identificación taxonómica del consorcio.

Para conocer la densidad celular presente en el cultivo, se realizó un conteo celular del mismo, según lo descrito por Romo[3] empleando una cámara Neubauer. La identificación de las microalgas que conforman el consorcio se realizó mediante observaciones de las muestra en fresco y fijadas con

lugol, siguiendo las indicaciones descritas en manuales de identificación de acuerdo a Nazih *et al.*[4], Borowitzka[5] y Novelo[6].

Efecto del gasoil en el crecimiento, producción de pigmentos y composición bioquímica del consorcio microalgal.

Se procedió a diluir la biomasa hasta obtener una densidad celular aproximada de 2×10^6 para un volumen de 7200 mL, que fue distribuido en fioles de vidrio con capacidad de 500 mL para los tratamientos de 0%, 0,25%, 0,5% y 1% de gasoil por volumen de biomasa, realizando triplicados de cada uno (excepto para los análisis de DQO y los HCT que se realizaron por duplicado). El período de duración del ensayo fue de 30 días bajo las mismas condiciones que se indicaron en la fase de escalado. El crecimiento celular de las microalgas fue contabilizado mediante la determinación de densidad celular por medio de la cámara de Neubauer cada tres días. Mientras que, para el conteo de las bacterias asociadas al consorcio microalgal se empleó la técnica de recuento en placas, al inicio, mitad y final del ensayo APHA *et al.* [7].

El contenido de clorofila total (clorofila *a* + clorofila *b*) y carotenoides totales fue determinado a partir de cultivos frescos de cada réplica de los diferentes tratamientos. Los pigmentos se extrajeron según el método descrito por Marker *et al.* [8]. El análisis de carbohidratos totales se basó en el método fenol-sulfúrico propuesto por Dubois *et al.* [9], modificado por Kochert [10]. Los lípidos totales de la biomasa se analizaron según el método de carbonización simple descrito por Marsh y Weinstein[11], mientras que, el procedimiento de extracción de lípidos se realizó de acuerdo al método de Bligh y Dyer [12]. La determinación de proteínas totales se hizo según el método de Lowry *et al.*[13], con las modificaciones realizadas por Herbert *et al.*[14].

Remoción de hidrocarburos totales del petróleo (HCT) por el consorcio microalgal.

Con esta finalidad se empleó la metodología descrita en APHA *et al.*[7] empleando el método gravimétrico, realizando extracciones de la muestra con cloroformo en una relación 1:1. Para tener un parámetro de comparación de la remoción de materia orgánica, se determinó la Demanda Química de Oxígeno (DQO), siguiendo el procedimiento descrito por Keith [15].

Análisis estadístico.

Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), aplicando la prueba de Tukey a un nivel de significancia (*p*) de 0,05 para estimar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos aplicados. Asimismo, se realizó un análisis de correlación lineal entre las variables utilizando el coeficiente de correlación de Pearson.

Resultados y discusión.

Composición del consorcio microalgal.

Al realizar el análisis microscópico de los cultivos, se evidenció que el consorcio microalgal estaba conformado principalmente por dos géneros de microalgas: *Chlorella* sp., y *Oocystis* sp., pertenecientes a la División *Chlorophyta* [4] que se encontraban en una proporción 5:1 y en asociación con bacterias acompañantes.

Efecto del gasoil sobre el crecimiento del consorcio microalgal.

En la figura 1 se apreció al realizar los recuentos celulares de los cultivos, una fase de adaptación comprendida entre el día 0 y el día 3, con poca variación de la densidad celular en el control y en los tratamientos de 0,25% y 0,5% con gasoil, en comparación con el tratamiento con 1% de gasoil.

A partir del sexto día se evidenció el inicio de una corta fase exponencial, presentando fluctuaciones en la densidad celular tanto para los tratamientos como el control, obteniéndose los mayores recuentos para el tratamiento al 1% de gasoil en relación al resto de los tratamientos y el control. Se infiere que las mayores concentraciones de gasoil parecen estimular el crecimiento microalgal tal como lo reportaron Briceño *et al.* [16] al encontrar que la fracción soluble de petróleo estimuló el crecimiento de las cianobacterias *Synechocystis minuscula* y *Limnothrix sp.*, y El-Sheek *et al.* [17] al obtener un mayor crecimiento de las microalgas *Scenedesmus obliquus* en presencia de petróleo crudo al 0,5% y de *Chlorella vulgaris* al 2% de crudo.

El análisis estadístico reveló las diferencias significativas entre la densidad celular del control con respecto a los tratamientos ($p < 0,05$); no obstante, entre los tratamientos con gasoil no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la densidad celular total.

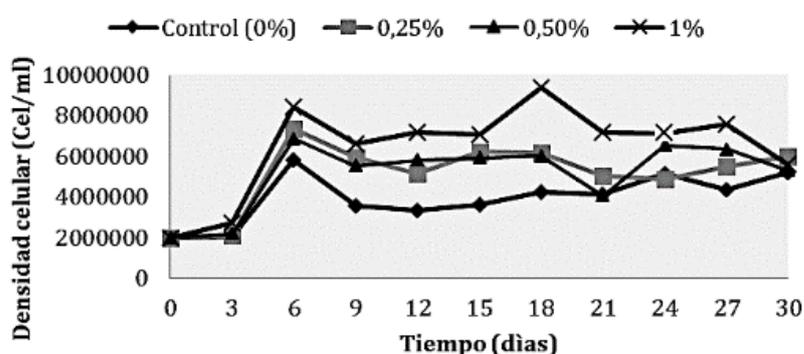


Figura 1. Efecto de la fracción de gasoil (0,25%, 0,5%, 1%) sobre la densidad celular (cel/mL) del consorcio microalgal.

Comportamiento del pH de los cultivos.

Hacia los primeros tres días el pH de los cultivos se mantuvo neutro (pH 7,0), hacia el sexto día se registró un ligero cambio a básico (pH 7,5), para luego mantenerse constante en este rango hasta el final del ensayo. Dicho comportamiento fue presentado por todos los tratamientos y por el control (datos no mostrados).

El análisis estadístico correspondiente, no mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los registros de pH de los distintos tratamientos y control. Richmond [18] sostiene que las microalgas muestran una clara dependencia respecto al pH del cultivo y diferentes especies varían ampliamente en su respuesta al mismo. Un descenso del pH puede ser letal, en cambio suelen soportar mejor el incremento del pH, hasta cierto límite.

Recuento de bacterias asociadas al consorcio microalgal.

En la Tabla 1 se muestran los valores de los recuentos de las poblaciones bacterianas asociadas a las microalgas. Contrastando el reporte de la densidad celular y los recuentos bacterianos, se infiere que son directamente proporcionales, es decir, que al aumentar la densidad celular aumentan los recuentos de las bacterias asociadas y viceversa. El análisis estadístico (ANOVA) no mostró diferencias significativas entre los tratamientos y el control ($p > 0,05$) con respecto a los recuentos bacterianos.

Se ha documentado que tras el contacto de las bacterias con el sustrato, las enzimas extracelulares producidas por éstas actúan degradando el sustrato a compuestos cada vez más simples, que son aprovechados por las microalgas y utilizados para sus funciones fotosintéticas Garza [19].

Tabla 1. Bacterias asociadas $\times 10^8$ (UFC/ml) al consorcio microalgal

Tiempo	Control	0,25%	0,5%	1%
To	0,035 \pm 0,001	0,033 \pm 1,532	0,032 \pm 0,456	0,022 \pm 0,087
Tm	4,500 \pm 0,784	0,059 \pm 0,235	0,278 \pm 0,997	7,900 \pm 0,234
Tf	0,765 \pm 0,089	0,131 \pm 0,377	1,510 \pm 0,462	0,207 \pm 0,127

To: tiempo cero, Tm: tiempo medio a los 15 días, Tf: tiempo final a los 30 días.

El porcentaje (%) indica la concentración del gasoil.

Efecto del gasoil sobre la producción de pigmentos del consorcio microalgal.

La figura 2, evidencia el efecto de la fracción de gasoil sobre la concentración de clorofila total del consorcio microalgal, apreciándose que las concentraciones de clorofila total para todos los tratamientos superaron a las encontradas en el control los primeros 21 días, pero a partir del día 24 la concentración de clorofila total disminuyó en los tratamientos con 0,25% y 0,5% de gasoil con respecto al control, lo que puede deberse a que los hidrocarburos son capaces de atrofiar la morfología de los cloroplastos y la inhibición de la biosíntesis de clorofila, Morales y Goutx [20]. De igual forma, Velásquez [21] encontró una disminución de la eficiencia fotosintética de tres microalgas marinas expuestas a diferentes concentraciones del hidrocarburo benzo [a]pireno, afectando la producción de clorofila *a* y la pared celular de las microalgas.

El análisis estadístico reveló las diferencias significativas en la producción de clorofila total entre los tratamientos con gasoil ($p > 0,05$), pero sí con relación al control sin gasoil ($p < 0,05$). Así mismo, se estableció una correlación lineal positiva significativa entre la densidad celular del consorcio y la producción de clorofila total ($r = 0,848$ $p < 0,01$), lo que indica que la producción de clorofila incrementa con la densidad celular microalgal. Comportamiento similar al descrito por Ruiz [22] quien observó un aumento en la clorofila total conforme avanzaba la edad del cultivo y aumentaba la biomasa del consorcio fotosintéticamente activo.

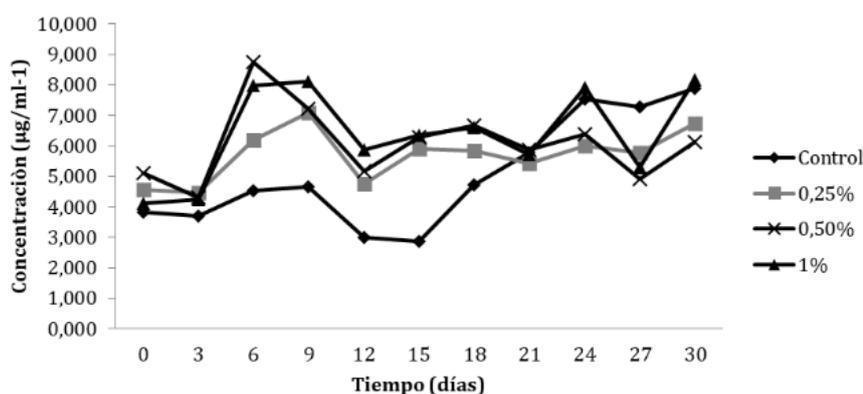


Figura 2. Efecto de la fracción de gasoil (0,25%, 0,5%, 1%) sobre la concentración de clorofila total ($\mu\text{g/mL}$) del consorcio microalgal.

En la figura 3 se aprecia el efecto de la fracción de gasoil sobre la concentración de carotenoides totales. Desde el inicio hasta el final del ensayo, la concentración de carotenoides totales de los tratamientos con 0,25% y 1% de gasoil, no superaron al control. La concentración del pigmento para el tratamiento con 0,5% de gasoil presentó un comportamiento diferente al de todos los tratamientos y control, donde se observó una concentración mayor al resto, desde el inicio hasta el día 21. A su vez, el análisis estadístico demostró diferencias significativas entre cada uno de los tratamientos con respecto al control ($p < 0,05$). En concordancia con Piña [23] quien trabajó con la cianobacteria *Anabaena sp*, la concentración de carotenoides totales en todos los tratamientos fue menor a la de la clorofila total.

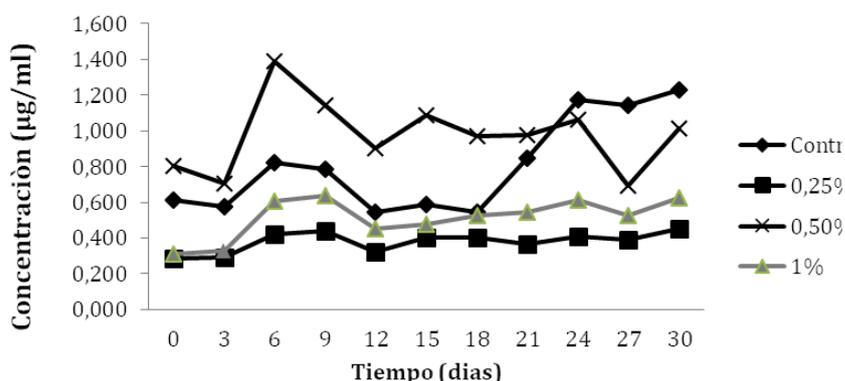


Figura 3. Efecto de la fracción de gasoil (0,25%, 0,5%, 1% de gasoil) sobre la concentración de carotenoides totales (µg/mL) del consorcio microalgal.

Efecto del gasoil sobre la composición bioquímica del consorcio microalgal.

Contrastando todos los tratamientos con el control, se observó en la figura 4, un incremento en la concentración de carbohidratos totales por efecto del gasoil hacia la fase estacionaria del cultivo. El análisis estadístico correspondiente, no mostró diferencias significativas entre el control y los tratamientos con 0,25% y 1% de gasoil ($p > 0,05$), sin embargo el control presentó diferencias significativas con el tratamiento de 0,5% de gasoil ($p < 0,05$). Soto *et al.* [24] encontraron que el contenido de carbohidratos de *Chlamydomonas angulosa* incrementó considerablemente cuando fue expuesta a naftaleno y exactos acuosos de crudo, debido a una respuesta adaptativa al sustrato, con el fin de obtener energía a partir del hidrocarburo.

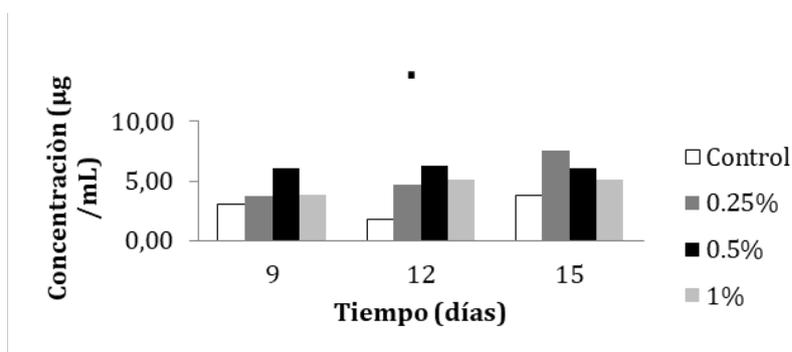


Figura 4. Efecto de la fracción de gasoil (0,25%, 0,5%, 1% de gasoil) sobre la concentración de carbohidratos totales (µg/mL) del consorcio microalgal.

Por otra parte, al comparar el control con los tratamientos (figura 5), se constató un incremento considerable en la concentración de lípidos totales por efecto del gasoil durante la fase estacionaria para el tratamiento con 1% de gasoil, caso contrario al de los demás tratamientos, donde la concentración fue en descenso; por lo que es posible que los hidrocarburos sean asimilados e incorporados a estructuras celulares de naturaleza hidrofóbica de las células microalgales, lo que ocasiona un aumento en la producción de los lípidos totales. Del mismo modo, Blanco [25] realizó estudios donde la microalga *Tetraselmis* sp, expuesta a altas concentraciones de aceite automotriz, exhibió un aumento en la concentración de lípidos totales. El análisis estadístico realizado, señaló que el control presentó diferencias significativas con todos los tratamientos ($p < 0,05$). A la vez que los tratamientos con 0,25% y 1% de gasoil también mostraron diferencias significativas entre ellos ($p < 0,05$).

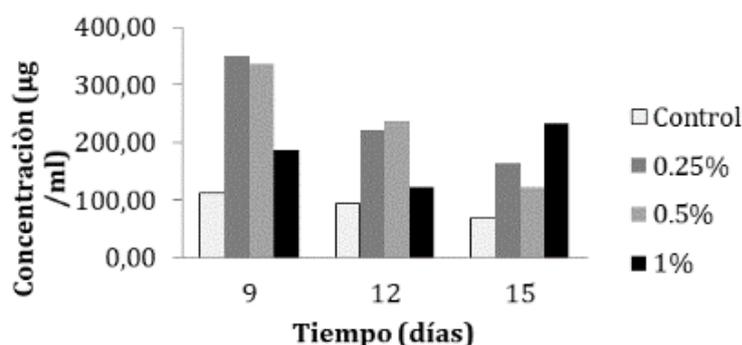


Figura 5. Influencia de la fracción de gasoil (0,25%, 0,5%, 1% de gasoil) sobre la concentración de lípidos totales (µg/mL) del consorcio microalgal.

En la figura 6 se mostró la concentración de proteínas totales (µg/ mL) a lo largo de la fase estacionaria (días 9 al 15) para los distintos tratamientos y control. Para el día 9, la mayor concentración de proteínas totales presentes, se observó en el tratamiento con 0,25%, seguido por 1% y 0,5% de gasoil sin superar al control. Así mismo, para el día 12 se observó un incremento significativo en los tratamientos con 0,5% y 1% de gasoil, superando al control, mientras que para el tratamiento con 0,25% se reportó una reducción en su concentración. Ya para el día 15, se obtuvo una disminución en la concentración de proteínas en todos los tratamientos en el siguiente orden decreciente: 1%>0,25%>0,5% sin superar al control. El análisis estadístico evidenció que el control presentó diferencias significativas con todos los tratamientos ($p < 0,05$), sin embargo, los tratamientos de 0,25%, 0,5% y 1% de gasoil no mostraron diferencias significativas entre ellos en cuanto a la producción de proteínas ($p > 0,05$).

Se observó que el gasoil afectó favorablemente la producción de proteínas totales a las mayores concentraciones de gasoil (0,5% y 1%), lo cual pudiera estar relacionado con el crecimiento de poblaciones bacterianas asociadas a las microalgas que aportan una importante fuente de proteínas, Abalde et al. [26] y por tanto, contribuyen a un aumento de éstas.

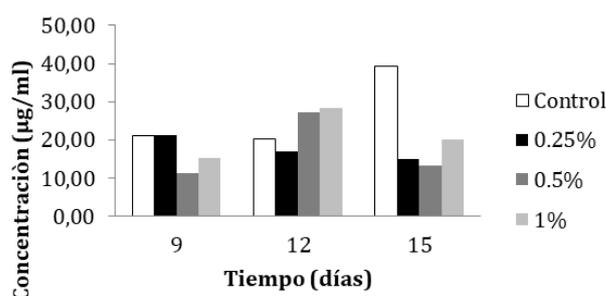


Figura 6. Influencia de la fracción de gasoil (0,25%, 0,5%, 1% de gasoil) sobre la concentración de proteínas totales (µg/mL) del consorcio microalgal.

Remoción de hidrocarburos totales del gasoil por el consorcio microalgal.

En la figura 7 se observó que el mayor porcentaje de remoción corresponde al realizado por el tratamiento con 0,25% de gasoil, alcanzando un $71,85 \pm 0,26$ % de remoción, seguido por el tratamiento con 0,5% con un $68,91 \pm 1,38$ % de remoción y del 1% con un porcentaje de remoción del $62,58 \pm 2,06$ %. Se puede inferir que el gasoil fue asimilado por el consorcio microalgal, disminuyendo su concentración en el medio de cultivo, especialmente a la menor concentración (tratamiento al 0,25%). No obstante, el análisis estadístico no demostró diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,05$) con relación a la remoción de gasoil.

Los resultados de remoción de gasoil fueron mayores a los obtenidos por Díaz *et al.* [27] al trabajar con un cultivo mixto microalgal expuesto al queroseno, conformado por las microalgas *Coenochloris* sp. y *Chlorococcum* provenientes de una fosa petrolera, que logró remover el queroseno entre el 42,71 y 56,73%. Kalhor *et al.* [28] también obtuvieron remociones elevadas al exponer a la microalga *Chlorella vulgaris* a diferentes concentraciones de fracciones de petróleo crudo, con remociones entre 88 y 94%.

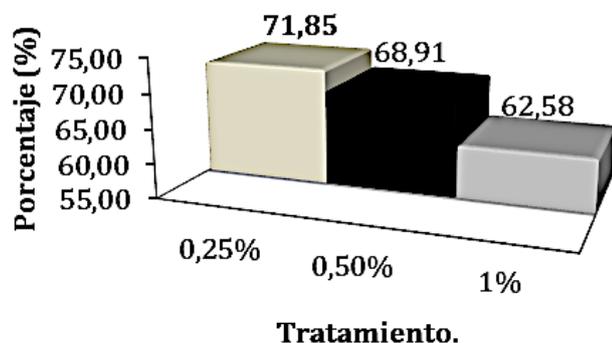


Figura 7. Remoción de hidrocarburos totales (HCT) realizado por el consorcio microalgal en cada tratamiento (0,25%, 0,50%, 1% de gasoil).

Con respecto a la DQO en la figura 8 se observó que el mayor porcentaje de remoción de materia orgánica correspondió al tratamiento con 0,25% de gasoil con una remoción del 62,18%, seguido por el tratamiento con 0,5% de gasoil con remoción del 49,91% y del tratamiento con 1% de gasoil que arrojó una remoción del 32,90%. Estos resultados, se corresponden con los porcentajes de remoción de HCT del gasoil, que pueden explicarse por el hecho de que en los cultivos microalgales prácticamente la única fuente de carbono disponible para los microorganismos son los hidrocarburos, y lo que se correspondió con la correlación lineal establecida entre la DQO y la remoción de los HCT por acción del consorcio microalgal, la cual fue positiva y significativa ($r=0,086$, $p<0,01$), indicando una relación directamente proporcional entre estos dos parámetros.

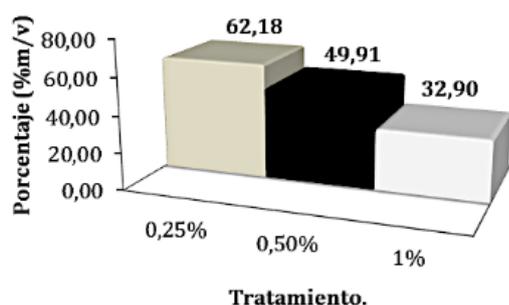


Figura 8. Porcentaje de Demanda Química de Oxígeno (DQO) por cada tratamiento (0,25%, 0,50%, 1% de gasoil).

Conclusiones

El gasoil a bajas concentraciones afectó positivamente el crecimiento, la producción de pigmentos (clorofila total y carotenoides) y de biomoléculas (carbohidratos, lípidos y proteínas totales) del consorcio microalgal y de sus bacterias asociadas en relación al control, por lo que se infiere que los hidrocarburos fueron asimilados por las microalgas para la construcción de sus estructuras celulares.

La remoción de gasoil se posicionó entre el 62,58 y el 71,85%, siendo mayor la remoción a la menor concentración del gasoil, por lo que se recomienda el uso del consorcio microalgal conformado

por las microalgas autóctonas *Chlorella* sp. y *Oocystis* sp. para la biorremediación de las aguas costeras de Isla de Toas contaminadas con combustible.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio del Poder Popular para la Educación Superior, Ciencia Tecnología e Innovación (Proyecto PEII Nro. 20110059) y al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de Universidad del Zulia (CONDES-LUZ) Proyecto Nro. CC-0592-14, por financiar parte de la investigación.

Referencias

- [1] Muñoz R., y Guieysse B., Algal-bacterial process for the treatment of hazardous contaminants. A Review, *Water Research*, Vol. 40, No. 15, (2006), 2799-2815.
- [2] Ghasemi Y., Rasoul-Amini S., Fotooh-Abadi E., The biotransformation, biodegradation and bioremediation of organic compounds by microalgae, *Journal of Phycology*, Vol. 47, No. 5, (2011), 969-980.
- [3] Romo A., Manual para el cultivo de microalgas, Tesis para optar al título de Biólogo Marino, Universidad Autónoma de Baja California del Sur, La Paz, México, (2002).
- [4] Nazih K., Shammass T., Wang L., Pereira N. y Hung Y., *Biological Treatment Processes: Volume* Springer Science & Business Media, (2009).
- [5] Borowitzka M., Microalgae as source of chemicals, *Microbiol. Sci.* Vol. 3, (1986), 372- 375.
- [6] Novelo E., (Editor), Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Primera edición, Universidad Nacional Autónoma de México Instituto de Biología, Departamento de Botánica, México, (2012).
- [7] APHA, AWWA, y WEF, American Public Health Association, Standard methods for examination of water and wastewater, 20th Edition, New York, (1998).
- [8] Marker A., Nusch, E., Rai H. y Riemann B. The Measurement of Photosynthetic Pigments in Freshwater and Standardization of Methods: Conclusions and Recommendations, *Arch. Hydrobiol. Egebn. Limnol.* Vol.14, (1980).
- [9] Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P. y Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Ann. Chem.*, Vol. 28, (1956), 350-356.
- [10] Kochert G., Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method. En: Hellebust J. y Craigie J. (eds.), *Handbook of Phycological Methods, Physiological and Biochemical Methods*, Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido, (1978).
- [11] Marsh J. y Weinstein D., Simple charring method for determination of lipids, *J. Lipid Res.*, Vol. 7, (1966), 574-576.
- [12] Bligh E. y Dyer J., A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.*, Vol. 37, (1959), 911-917.
- [13] Lowry O., Rosenbrough H., Farr A. y Randall R., Protein measurement with the folin-phenol reagent, *J. Biol. Biochem.*, Vol. 193, (1951), 265-275.
- [14] Herbert D., Phipps P. y Stronoe P., Chemical analysis of microbial cells, En: Norris J. y Ribbons D. (eds.), *Methods in Microbiology*, Academic Press (5B), (1971).

[15] Keith L. (Editor), *Compilation of EPA's sampling and analysis methods*. Lewis Publishers. 2nd ed. (1996).

[16] Briceño B., Jonte L., Ortega J., Rosales N., Morales E., Respuestas de las Cianobacterias Tropicales *Synechocystis minuscula* y *Limnothrix* sp. a derivados del petróleo, *Acta Biológica Venezolana*, Vol. 23, No. 4, 31-41.

[17] El-Sheek M. M., Hamouda R. A., Nizam A. A., Biodegradation of crude oil by *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris* growing under heterotrophic conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol. 82, (2013), 62-72.

[18] Richmond A., (Editor), *Cell response to environmental factors*, *Handbook of Microalgal Mass Culture*, CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, US, (1986).

[19] Garza R., Biorremediación de aguas contaminadas con hidrocarburos, Tesis para optar al grado de Magister en Ingeniería Ambiental, Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, México, (1998).

[20] Morales-Loo M. y Goutx M., Effects of water-soluble fraction of the Mexican crude oil "Isthmus Cactus" on growth, cellular content of chlorophyll *a* and lipid composition of planktonic microalgae, *Marine Biology*, Vol. 104, (1990), 503-509.

[21] Velásquez P, L. M., Evaluación del efecto de la exposición al hidrocarburo benzo[a]pireno sobre la eficiencia fotosintética de tres microalgas marinas, Tesis para el grado de maestro en Ciencias, Centro de Investigación Científica de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México, (2010).

[22] Ruiz A., Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente, Tesis de Máster Universitario en Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España, (2011).

[23] Piña J., Producción de la cianobacteria *Anabaena* sp. en función de las fuentes nitrogenadas urea, amonio y nitrato en cultivos discontinuos, Tesis de Licenciado en Biología, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela (2009).

[24] Soto C., Hellebust J., Hutchinson T y Sheath R., The effect of the hydrocarbon naphthalene on the morphology of the green flagellate *Chlamydomonas angulosa*. *Canadian Journal of Botany*, Vol 57, No. 24, (1979), 2729-2739.

[25] Blanco A., Efectos del aceite automotriz sobre parámetros poblacionales, contenido de pigmentos y composición bioquímica de la microalga *Tetraselmis* sp. (g1) del nororiente de Venezuela, Tesis de Licenciado en Biología, Universidad de Oriente, Cumaná. Venezuela, (2011).

[26] Abalde J., Cid A., Fidalgo P., Torres E. y Herrero C., *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones*. Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Da Coruña, Coruña, España, (1995).

[27] Díaz-Borrego L., Vera A., Marín J., Aiello-Mazzarri C., Briceño B., Morales E. Efecto del queroseno y de la concentración de nutrientes en el crecimiento de un cultivo mixto de microalgas (Chlorophyta), *Revista de la Universidad del Zulia*, Tercera época, Año 3 No. 6, (2012), 102-118.

[28] Kalhor X., Movafeghi A., Mohammadi-Nassab A. D., Abedi E., Bahrami A., Potential of green alga *Chlorella vulgaris* for biodegradation of crude oil hydrocarbons, *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 123, No. 1-2, 286-290.