



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERÍA AMBIENTAL – AGUA

PRODUCCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE MICROALGAS
EMPLEANDO DIFERENTES CALIDADES DE AGUA

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA:
MANUEL SACRISTÁN DE ALVA

TUTOR PRINCIPAL
Dr. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO, FACULTAD DE QUÍMICA
COMITÉ TUTOR
Dr. JAVIER MODESTO CRUZ GÓMEZ, FACULTAD DE QUÍMICA
Dr. PANDIYAN THANGARASU SARASVATHI, FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D. F. AGOSTO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Javier Modesto Cruz Gómez
Secretario: Dra. Gabriela Eleonora Moeller Chávez
Vocal: Dr. Víctor Manuel Luna Pabello
1^{er} Suplente: Dr. Pandiyan Thangarasu
2^{do} Suplente: Dra. María Teresa Orta Ledesma

Lugar o lugares donde se realizó la tesis: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA EXPERIMENTAL, DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

TUTOR DE TESIS:

Dr. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO

FIRMA

Reconocimientos

Se agradece el apoyo, brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), como becario (número 421332) durante la realización de este trabajo.

Se reconoce el apoyo para la realización del presente trabajo a través de los proyectos DGAPA PAPIIT-IN107209 y PAPIIT-IT103312-3, así como al PAIP 4194-14 (VMLP 2011-2013) otorgado por la Facultad de Química-UNAM.

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Víctor Manuel Luna Pabello por la oportunidad de realizar este trabajo.

Se reconoce el apoyo técnico brindado por el Dr. Javier Modesto Cruz Gómez de la Facultad de Química de la UNAM para la producción del biodiesel.

Agradezco el apoyo y la donación de las cepas de microalgas realizada por el Dr. Alejandro Alva Martínez de la UAM Xochimilco.

Agradezco la donación de la cianobacteria, hecha por el Dr. Eberto Novelo Maldonado del Laboratorio de algas continentales de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Se reconoce el apoyo técnico brindado, para la realización de este trabajo a la M. en C. Guadalupe Tsuzuki Reyes y al M. en C. Luciano Hernández Gómez.

Agradecimientos

A mis padres por el apoyo que me brindaron durante la realización de este posgrado.

A Ayerim por estar a mi lado y por su apoyo.

A toda mi familia.

A mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Experimental: Ana, Citlaly, Tere, Jazmín, Edgar, Jorge, Rafa, Sergio, Benja, Erasmo.

A mis profesores del posgrado por sus consejos y sus enseñanzas.

Índice

Resumen	1
Abstract	2
1 Introducción	3
2 Objetivos e hipótesis	7
2.1 Objetivo general.....	7
2.2 Objetivos específicos.....	7
2.3 Hipótesis	7
3 Marco teórico	9
3.1 Problemática de los combustibles fósiles.....	9
3.2 Problemática de la producción de biocombustibles	9
3.3 Problemática de la contaminación del agua.....	11
3.4 Microalgas para tratamiento de agua residual	12
3.5 Microalgas estudiadas para el tratamiento de aguas residuales.....	15
3.6 Producción de biocombustibles a partir de microalgas	17
3.7 Ventajas e inconvenientes de la producción de biocombustibles con microalgas...19	
3.8 Biodiesel.....	20
4 Metodología	24
4.1 Primera etapa.....	24
4.2 Segunda etapa.....	25
4.3 Calidades de agua.....	26
4.4 Selección de las especies de microalgas.....	26
4.5 Aclimatación de las microalgas al agua residual	27
4.6 Cultivo de las microalgas	27
4.7 Determinaciones de las propiedades fisicoquímicas a las calidades de agua ..	28
4.8 Determinación del crecimiento de las microalgas	28
4.9 Separación de las microalgas del medio de cultivo.....	29
4.10 Extracción de los lípidos de las microalgas	29
4.11 Determinaciones al aceite	30
4.12 Obtención de biodiesel.....	30
4.13 Determinaciones al biodiesel.....	30
4.14 Diseño estadístico	31
5 Resultados y discusión	33
5.1 Cultivo de las microalgas	33
5.1.1 Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i>	33

5.1.2	Cultivo de <i>Scenedesmus acutus</i>	43
5.1.3	Cultivo de <i>Arthrospira maxima</i>	53
5.2	Comparación de las tres especies	61
5.3	Segunda etapa.....	64
5.3.1	Cultivos de <i>S. acutus</i> con adición y sin adición de CO ₂	64
5.3.2	Determinación de nutrientes en el agua residual.	73
5.3.3	Pruebas de coagulación con quitosano.	79
5.3.4	Cultivo de <i>S. acutus</i> a pequeña escala	84
5.3.5	Separación de la biomasa	87
5.3.6	Determinaciones a los lípidos.....	88
5.3.7	Producción de biodiesel y determinaciones analíticas.	91
6	Conclusiones	96
7	Referencias	99
8	Anexos	104
8.1	Anexo A. Cálculos para la producción del biodiesel.	104
8.2	Anexo B. Fórmula y estructura de los ésteres metílicos de los ácidos grasos presentes en el biodiesel.	105

Índice de tablas

Tabla 1. Variación del oxígeno disuelto durante el cultivo de <i>C. vulgaris</i> -----	34
Tabla 2. Variación del pH en los cultivos de <i>C. vulgaris</i> -----	35
Tabla 3. Crecimiento de <i>C. vulgaris</i> en las tres calidades de agua medido por espectrofotometría. -----	36
Tabla 4. Contenido de biomasa seca de <i>C. vulgaris</i> en los cultivos en las 3 calidades de agua. -----	37
Tabla 5. Contenido de biomasa seca en g/L en los diferentes cultivos de <i>C. vulgaris</i> -----	38
Tabla 6. Análisis de varianza de la biomasa seca de <i>C. vulgaris</i> -----	39
Tabla 7. Prueba de Tukey para la biomasa seca en los cultivos de <i>C. vulgaris</i> -----	39
Tabla 8. Porcentaje de lípidos en la biomasa seca de <i>C. vulgaris</i> -----	39
Tabla 9. Análisis de varianza del contenido de lípidos de <i>C. vulgaris</i> -----	40
Tabla 10. Prueba de Tukey para el contenido de lípidos de <i>C. vulgaris</i> -----	40
Tabla 11. Contenido de nutrientes en las tres calidades de agua antes y después del cultivo. -----	41
Tabla 12. Porcentaje de remoción de nutrientes en los cultivos de <i>C. vulgaris</i> -----	42
Tabla 13. Variación del oxígeno disuelto en los cultivos de <i>S. acutus</i> -----	44
Tabla 14. Variación de pH en los cultivos de <i>S. acutus</i> -----	45
Tabla 15. Determinación del crecimiento de <i>S. acutus</i> mediante espectrofotometría. -----	46
Tabla 16. Contenido de biomasa seca de <i>S. acutus</i> en las 3 calidades de agua. -----	47
Tabla 17. Contenido de biomasa seca en g/L en los cultivos de <i>S. acutus</i> -----	48
Tabla 18. Análisis de varianza para la biomasa seca en los cultivos de <i>S. acutus</i> . -----	49
Tabla 19. Prueba de Tukey para la biomasa seca de <i>S. acutus</i> .-----	49
Tabla 20. Porcentaje de lípidos de <i>S. acutus</i> cultivada en las 3 calidades de agua. -----	50
Tabla 21. Análisis de varianza del contenido de lípidos de <i>S. acutus</i> -----	50
Tabla 22. Prueba de Tukey para el contenido de lípidos de <i>S. acutus</i> -----	51
Tabla 23. Contenido de nutrientes en las 3 calidades de agua antes y después del cultivo de <i>S. acutus</i> -----	51
Tabla 24. Porcentajes de remoción de nutrientes en las 3 calidades de agua. -----	52
Tabla 25. Oxígeno disuelto en los cultivos de <i>A. maxima</i> .-----	54
Tabla 26. Variación de pH en los cultivos de <i>A. maxima</i> en las 3 calidades de agua. -----	54
Tabla 27. Crecimiento de <i>A. maxima</i> medido por espectrofotometría en las 3 calidades de agua. -----	55
Tabla 28. Crecimiento de <i>A. maxima</i> cultivada en fertilizante medido como concentración de biomasa seca. -----	56
Tabla 29. Contenido de biomasa seca en mg /L en los cultivos de <i>A. maxima</i> en las 3 calidades de agua. -----	57
Tabla 30. Análisis de varianza para el contenido de biomasa seca en los cultivos de <i>A. maxima</i> .-----	58
Tabla 31. Prueba de Tukey para el contenido de biomasa seca en los cultivos de <i>A. maxima</i> . -----	58
Tabla 32. Porcentaje de lípidos de <i>A. maxima</i> cultivada en las 3 calidades de agua. -----	58
Tabla 33. Análisis de varianza del contenido de lípidos de <i>A. maxima</i> . -----	59
Tabla 34. Prueba de Tukey para el contenido de lípidos de <i>A. maxima</i> . -----	59
Tabla 35. Contenido de nutrientes en las tres calidades de agua antes y después de los cultivos de <i>A. maxima</i> . -----	60
Tabla 36. Remoción de nutrientes en las 3 calidades de agua. -----	61
Tabla 37. Análisis de varianza de biomasa seca de las 3 especies de microalgas. -----	62
Tabla 38. Prueba de Tukey para la biomasa seca de las 3 especies de microalgas. -----	62
Tabla 39. Análisis de varianza de contenido de lípidos seca de las 3 especies de microalgas.-----	63
Tabla 40. Prueba de Tukey para el contenido de lípidos seca de las 3 especies de microalgas.-----	64
Tabla 41. Valores de pH para el cultivo de <i>S. acutus</i> en agua residual con y sin adición de CO ₂ . -----	65
Tabla 42. Concentración de oxígeno disuelto (mg/L) en los cultivos de <i>S. acutus</i> en agua residual con y sin adición de CO ₂ .-----	66
Tabla 43. Crecimiento de <i>S. acutus</i> medido por espectrofotometría, en los cultivos en agua residual. -----	66
Tabla 44. Contenido aproximado e biomasa seca en los cultivos de <i>S. acutus</i> en agua residual con y sin adición de CO ₂ .-----	68
Tabla 45. Análisis de varianza de los cultivos de <i>S. acutus</i> con y sin adición de CO ₂ . -----	69
Tabla 46. Variación de pH en los cultivos de <i>S. acutus</i> en agua con fertilizante con aire, con adición de CO ₂ y con trampa para CO ₂ .-----	70
Tabla 47. Crecimeinto de <i>S. acutus</i> en los cultivos en agua con fertilizante con aire, con adición de CO ₂ y con trampa para CO ₂ .-----	71

Tabla 48. Contenido de biomasa en los diferentes cultivos de <i>S. acutus</i> en agua con fertilizante.-----	72
Tabla 49. Análisis de varianza para los cultivos de <i>S. acutus</i> en fertilizante.-----	73
Tabla 50. Prueba de Tukey para los cultivos de <i>S. acutus</i> en fertilizante.-----	73
Tabla 51. Contenido de nitrógeno orgánico y amoniacal en los cultivos de <i>S. acutus</i> en agua residual con y sin adición de CO ₂ .-----	74
Tabla 52. Contenido de nitratos en los cultivos en agua residual de <i>S. acutus</i> con y sin adición de CO ₂ .-----	75
Tabla 53. Contenido de ortofosfatos en el agua residual durante el cultivo de <i>S. acutus</i> con y sin adición de CO ₂ .----	76
Tabla 54. Contenido de DQO en el agua residual durante el cultivo de <i>S. acutus</i> con y sin adición de CO ₂ .-----	77
Tabla 55. Análisis de varianza para el contenido de nitrógeno orgánico y amoniacal.-----	78
Tabla 56. Análisis de varianza para el contenido de ortofosfatos en ambos cultivos.-----	78
Tabla 57. Análisis de varianza para el contenido de nitratos.-----	78
Tabla 58. Análisis de varianza para la DQO.-----	79
Tabla 59. Eficiencia de remoción de la microalga a diferentes pH.-----	80
Tabla 60. Eficiencia de remoción de la microalga a diferentes pH.-----	81
Tabla 61. Eficiencia de remoción de las microalgas con diferentes dosis de quitosano.-----	82
Tabla 62. Crecimiento de <i>S. acutus</i> en agua residual medido por espectrofotometría.-----	85
Tabla 63. Variación de pH durante el crecimiento de <i>S. acutus</i> en agua residual.-----	86
Tabla 64. Contenido de nutrientes en el agua residual antes y después de los cultivos de <i>Scenedesmus</i> .-----	87
Tabla 65. Contenido de ésteres metílicos de ácidos grasos en el biodiesel.-----	94

Índice de figuras

Figura 1. Imagen de un cultivo de <i>C. vulgaris</i> -----	16
Figura 2. Imagen de un cultivo de <i>Scenedesmus</i> sp.-----	16
Figura 3. Imagen de un cultivo de <i>A. maxima</i> .-----	17
Figura 4. Primera etapa de la experimentación. -----	24
Figura 5. Segunda etapa de la experimentación. -----	25
Figura 6. Fotografías de la microalga <i>C. vulgaris</i> a través de un microscopio-----	33
Figura 7. Cultivos de <i>C. vulgaris</i> en las 3 calidades de agua. -----	34
Figura 8. Curvas de crecimiento de <i>C. vulgaris</i> en las 3 calidades de agua. -----	36
Figura 9. Curvas de crecimiento de <i>C. vulgaris</i> en las 3 calidades de agua en función de la biomasa seca. -----	38
Figura 10. Fotografías de la microalga <i>S. acutus</i> a través de un microscopio. -----	43
Figura 11. Cultivos de <i>S. acutus</i> en las 3 calidades de agua.-----	44
Figura 12. Curvas de crecimiento medido por espectrofotometría de <i>S. acutus</i> -----	46
Figura 13. Curvas de crecimiento medido como biomasa seca en los cultivos de <i>S. acutus</i> -----	48
Figura 14. Fotografías de la microalga <i>A. máxima</i> a través de un microscopio.-----	53
Figura 15. Cultivos de <i>A. maxima</i> en las 3 calidades de agua. -----	53
Figura 16. Curvas de crecimiento medido por espectrofotometría de <i>A. máxima</i> .-----	56
Figura 17. Curvas de crecimiento medido como biomasa seca de los cultivos de <i>A. maxima</i> . -----	57
Figura 18. Cultivos de <i>S. acutus</i> en agua residual. -----	65
Figura 19. Curva de crecimiento de los cultivos de <i>S. acutus</i> en agua residual con y sin adición de CO ₂ .-----	67
Figura 20. Relación entre absorbancia y biomasa seca en los cultivos de <i>S. acutus</i> .-----	68
Figura 21. Crecimiento de <i>S. acutus</i> en agua con fertilizante con adición de CO ₂ , con aire y con trampa para CO ₂ .-----	72
Figura 22. Curva de contenido de nitrógeno orgánico y amoniacal en los cultivos de <i>S. acutus</i> en agua residual con y sin adición de CO ₂ .-----	74
Figura 23. Curva de contenido de nitratos en los cultivos de <i>S. acutus</i> en agua residual con y sin adición de CO ₂ .-----	75
Figura 24. Curva de contenido de ortofosfatos en los cultivos de <i>S. acutus</i> en agua residual con y sin adición de CO ₂ .-----	76
Figura 25. Curva de contenido de DQO en los cultivos de <i>S. acutus</i> en agua residual con y sin adición de CO ₂ .-----	77
Figura 26. Remoción de absorbancia a diferentes pH.-----	80
Figura 27. Prueba de jarras a diferentes pH que son: A) 1.87, B) 2.95, C) 4.85, D) 7.13, E) 8.87 y F) 10.37. -----	81
Figura 28. Remoción de la absorbancia a diferentes pH.-----	81
Figura 29. Prueba de jarras a diferentes pH, los cuales son: A) 5.11, B) 5.73, C) 6.13, D) 6.41 y E) 6.77.-----	82
Figura 30. Remoción de la absorbancia a diferentes dosis de quitosano. -----	83
Figura 31. Apariencia de los flóculos de la microalga <i>S. acutus</i> después de la coagulación. -----	83
Figura 32. Reactores para los cultivos de <i>S. acutus</i> en un volumen mayor. -----	84
Figura 33. Curva de crecimiento de <i>S. acutus</i> en agua residual a pequeña escala. -----	85
Figura 34. Biomasa seca de <i>S. acutus</i> -----	88
Figura 35. Espectro de infrarrojo del aceite extraído.-----	89
Figura 36. Biodiesel obtenido de los lípidos extraídos de <i>S. acutus</i> -----	91
Figura 37. Cromatograma del biodiesel. -----	93
Figura 38. Detalle del cromatograma del biodiesel.-----	93

Resumen

En este trabajo se realizó el cultivo de 3 especies de microalgas, *Chlorella vulgaris*, *S. acutus* y *A. maxima*, utilizando 3 diferentes calidades de agua con las siguientes características: agua residual después de un tratamiento de cribado y sedimentación, agua tratada mediante un tratamiento de lodos activados y ultrafiltración y agua destilada con la adición de un fertilizante con 20 % de nitrógeno, 20 % de fósforo y 20 % de potasio, para comparar los resultados obtenidos en cuanto a producción de biomasa y acumulación de lípidos en un medio enriquecido y en dos distintas calidades de agua residual.

Se pudo observar que la especie *C. vulgaris* cultivada en agua residual presentó el mayor contenido de biomasa seca (1.15 g/L) y de lípidos (22.4 %). El resultado más desfavorable se encontró en el cultivo en agua residual tratada en donde se obtuvo un contenido de biomasa seca de 0.65 g/L, con un contenido de lípidos de apenas 12.3 %. Respecto al cultivo de esta especie en el agua con fertilizante, el contenido de biomasa seca fue de 0.90 g/L, mostrando una acumulación de lípidos de 16.6 %.

En cuanto a los cultivos de *S. acutus*, el mayor contenido de biomasa y de lípidos se obtuvo en el cultivo en agua residual obteniéndose 1.28 g/L y 28.34 %, respectivamente. Nuevamente en el agua tratada se obtuvieron los resultados más desfavorables con una cantidad de biomasa seca de 0.77 g/L y un contenido de lípidos de 12.72 %. En el cultivo en fertilizante se obtuvo un contenido de biomasa seca de 0.91 g/L, con un contenido de lípidos de 21.8 %.

Para los cultivos de la especie *A. maxima* se obtuvieron resultados muy similares en cuanto a biomasa seca los cultivos en agua con fertilizante y en agua residual, obteniéndose 0.96 mg/L y 0.93 g/L respectivamente. Sin embargo el contenido de lípidos en los cultivos en agua residual (13.78 %) fue mayor que en los cultivos en agua con fertilizante (11.36 %). En el cultivo en agua tratada se obtuvieron los resultados más desfavorables con un contenido de 0.69 g/L de biomasa seca y un contenido de lípidos de 7.52 %.

De los resultados obtenidos se determinó que la microalga *S. acutus* fue la que tuvo el mayor contenido de lípidos en el cultivo en agua residual. Esta microalga se cultivó a mayor escala con un total de 123.1 L de agua residual, extrayendo la biomasa mediante un proceso de coagulación-floculación con quitosano, obteniéndose 113.69 g de biomasa seca. Se obtuvo una concentración de biomasa seca de 923.6 mg/L y un contenido de lípidos de 30.4 %. Se extrajeron 32.69 g de lípidos que fueron utilizados para la producción de biodiesel, del cual se obtuvieron 30.73 g, equivalente a una concentración de biodiesel de 249.6 mg/L. El rendimiento de la reacción de transesterificación fue de 87.7 %.

Abstract

In this study three microalga species (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus acutus* and *Arthrospira maxima*) were cultured in three different water qualities with the following characteristics: wastewater after screening and settling operations, treated wastewater by an activated sludge and ultrafiltration treatments and distilled water with addition of a fertilizer with 20 % of nitrogen, 20 % of phosphorous and 20 % of potassium, to compare the results obtained for biomass production and lipid accumulation in an enriched medium and two different wastewater qualities.

It can be observed that the species *C. vulgaris* cultured in wastewater achieved the major dry biomass (1.15 g/L) and lipids (22.4 %) contents. The most unfavorable result was found in the culture in treated wastewater, where the content of dry biomass was 0.65 g/L with a lipid content of 12.3 %. With respect to the culture of this species in the fertilizer, the content of biomass was 0.90 g/L, showing a lipid accumulation of 16.6 %.

Regarding to the cultures of *S. acutus*, the best results of biomass content and lipid accumulation were found in the wastewater, being 1.28 g/L and 28.34 %, respectively. Again the worst results were obtained in the treated wastewater cultures with a biomass content of .77 g/L and a lipid accumulation of 12.72 %. In the fertilizer culture the biomass content was 0.91 g/L with a lipid accumulation of 21.8 %.

For the species *A. maxima*, similar results were obtained for biomass content in the cultures in wastewater and fertilizer, achieving 0.93 mg/L and 0.96 g/L respectively. Nevertheless the lipid content in the cultures in wastewater (13.78 %) was higher than in the cultures in fertilizer (11.36 %). Once more in the cultures in treated wastewater the worst results were found with a biomass content of 0.69 g/L and a lipid content of 7.52 %.

From the results obtained it was determined that the microalga *S. acutus* had the greater lipid content in the cultures in wastewater. This microalga was cultured in small scale with a total of 123.1 L of wastewater; harvesting the biomass with a coagulation-flocculation process with chitosan, obtaining 113.269 g of dry biomass. A dry biomass concentration of 923.6 mg/L and a lipid content of 30.4 % was achieved. From the biomass 32.69 g of lipids were extracted, from which 30.73 g of biodiesel were obtained, equivalent to a concentration of 249.6 mg/l of biodiesel. The transesterification reaction efficiency was 87.7 %.

Capítulo 1

Introducción

1 Introducción

En la actualidad existe una escasez de combustibles fósiles, además de los problemas generados por su uso como es la acumulación de gases de efecto invernadero, por lo cual en los últimos años se ha hecho presente la búsqueda de soluciones alternativas a este problema (Wang *et al.*, 2010). El biodiesel es una alternativa al petrodiesel ya que está hecho a partir de fuentes biológicas renovables, es biodegradable, no tóxico y tiene bajos perfiles de emisión por lo que es más benéfico ambientalmente que el petrodiesel (Ma y Hanna, 1999).

Recientemente la principal materia prima utilizada para la producción de biocombustibles son granos como la soya y el maíz entre otros, esta práctica ha puesto una gran presión sobre los alimentos y el uso de los campos de cultivo. Una alternativa viable al uso de granos para producir biodiesel es la utilización de algas unicelulares que tienen las ventajas sobre estos como de no requerir del uso de tierras para su producción (Kong *et al.*, 2010), tasas de crecimiento más altas, cortos tiempos de generación, mayores rendimientos de producción, alto contenido de lípidos y no se requiere del uso de herbicidas ni pesticidas para su cultivo. No obstante lo anterior, también existen algunos inconvenientes en la producción de los biocombustibles a base de microalgas, que tienen que ver con la dificultad de recolectar biomasa del medio de cultivo y la extracción de lípidos de la biomasa (Rawat *et al.*, 2010).

Otra problemática que existe actualmente es que las descargas de aguas residuales ricas en nitratos y fosfatos sin ningún tratamiento previo, al drenaje o directamente a cuerpos de agua produce la eutrofización de los mismos, lo cual conduce a la pérdida del ecosistema (Aslan y Kapdan, 2006). Debido a esto se requieren sistemas de tratamiento de aguas residuales que sean económicamente viables, para lo cual se requiere que sean de bajo consumo energético y bajos requerimientos tecnológicos (Safonova *et al.*, 2004). En el caso de la producción de biocombustibles, se requiere de una gran cantidad de agua tanto para riego durante la siembra de granos, como para la fabricación de los medios de cultivo para el crecimiento de algas (Chinnasamy *et al.*, 2010). Es por esta razón que el cultivo industrial de microalgas enfrenta un problema de viabilidad, además de los altos costos de los insumos requeridos para la producción de medios de cultivo artificiales y la baja producción de biomasa. Debido a que las algas han sido utilizadas para tratamiento de aguas residuales durante muchos años, es factible reemplazar los medios de cultivo inorgánicos por agua residual para el cultivo de las microalgas, lo que reduciría en gran medida los costos de producción de los biocombustibles (Sydney *et al.*, 2010).

Muchos de los sistemas de tratamiento de aguas residuales basados en un tratamiento biológico tienen bajas remociones de nitrógeno y de fósforo, este último por lo general se remueve mediante una

precipitación química lo que hace que no sea reciclable (Aslan y Kapdan, 2006). Las microalgas han probado ser un medio atractivo en cuanto al tratamiento de aguas residuales de bajo costo, mediante los estudios de remoción de nutrientes tanto a pequeña escala como a escala piloto. Estos estudios han demostrado la eficacia de remoción de nitrógeno, fósforo y metales pesados del agua residual. La remoción de fósforo es especialmente competitiva en cuanto a costo beneficio cuando se compara con técnicas de remoción químicas (Patel *et al.*, 2012). En un inicio el tratamiento de aguas residuales con microalgas se utilizaba como un tratamiento terciario, un tratamiento de pulimento para los efluentes ya tratados. Sin embargo se ha visto que las microalgas pueden alcanzar eficiencias de remoción más altas que, por ejemplo, que un sistema de lodos activados, además de ser un método más económico (Wang *et al.*, 2010). Otras de las ventajas de tratar el agua con microalgas es que además de la remoción de nutrientes, también se remueven metales pesados por adsorción y se pueden eliminar algunos patógenos debido al aumento del pH que se da durante la fotosíntesis (Muñoz y Guieysse, 2006). Para evitar problemas con las descargas, después del tratamiento se debe remover la biomasa del agua y al hacerlo se descargan efluentes oxigenados debido al oxígeno producido durante la fotosíntesis (Aslan y Kapdan, 2006).

El cultivo de microalgas para la producción de biocombustibles se ha hecho por lo general a pequeña escala bajo condiciones controladas de laboratorio y en medios de cultivo con nutrientes esenciales, los cultivos también se han hecho en fotobioreactores cerrados donde se pueden controlar las condiciones de cultivo. Existen pocos estudios en donde los cultivos se hayan hecho en reactores abiertos. Se ha visto que las algas acumulan una mayor cantidad de lípidos bajo condiciones de estrés como mediante la limitación de nutrientes, sin embargo esto también provoca una menor concentración de biomasa (Chen *et al.*, 2011).

Por todas las razones expuestas se dice que los sistemas de producción de algas más convincentes serán aquellos que combinen un proceso de tratamiento de aguas residuales basados en algas con un sistema de producción de biocombustibles (Patel *et al.*, 2012).

Varios autores señalan que las microalgas son una fuente prometedora para la producción de biocombustibles, tomando en cuenta la crisis actual del petróleo y el problema de los gases de efecto invernadero. En la actualidad existen pocos estudios sobre la producción de biodiesel a partir de microalgas cultivadas en agua residual. Los trabajos revisados sobre el tema por lo general se enfocan a una sola especie de microalga (Kong *et al.*, 2010; Mandal y Mallick, 2009; Órpez *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2010) o a un consorcio de microalgas (Woertz *et al.*, 2009) y se enfocan en la determinación del contenido de lípidos en la biomasa, pero dejan de lado la producción del biodiesel (Kong *et al.*, 2010; Woertz *et al.*, 2009). En los pocos estudios donde se utiliza más de una especie de microalga se cultiva en una sola calidad de agua (Sydney *et al.*, 2010). Debido a que el principal objetivo de los estudios es la producción de biodiesel, pocas

veces se evalúa la remoción de nutrientes (Wang *et al.*, 2010) y cuando se hace únicamente se determinan nitrógeno y fósforo (Sydney *et al.*, 2010). La mayor parte de los estudios han sido realizados a escala laboratorio bajo condiciones controladas. Sin embargo con la revisión bibliográfica realizada no queda claro si se obtiene una mayor productividad de biomasa y lípidos cultivando las microalgas en aguas residuales o en un medio de cultivo, lo cual es de gran importancia para la producción del biodiesel. Debido a que se requieren elementos que evidencien la factibilidad de obtener biodiesel a partir de microalgas se propone cultivar tres diferentes especies de microalgas en agua residual y en agua tratada, utilizando como medio de cultivo con nutrientes básicos, agua con fertilizante, para determinar en qué medio se obtiene la mayor productividad de lípidos. Con esto se hará una comparación de las microalgas para elegir la que tenga la mayor productividad de lípidos y cultivarla a una mayor escala sin un control tan estricto de las condiciones de cultivo para determinar si los resultados obtenidos a escala laboratorio son comparables con los obtenidos a pequeña escala. También se evaluará la remoción de nitrógeno (nitratos, amoniacal y orgánico), fosfatos y demanda química de oxígeno de las tres calidades de agua. Con los resultados obtenidos se determinará si es factible combinar un sistema de tratamiento de aguas residuales con microalgas que permita obtener cantidades de biomasa en donde haya una acumulación de lípidos suficiente para la producción de biodiesel.

Capítulo 2

Objetivos e hipótesis

2 Objetivos e hipótesis

2.1 Objetivo general

Determinar el potencial que tienen diferentes especies de microalgas para remover el nitrógeno y el fósforo en diferentes calidades de agua, pudiendo generar biomasa en la cual se acumulen lípidos que posteriormente sean utilizados para la producción de biodiesel.

2.2 Objetivos específicos

Evaluar la eficiencia de remoción de los nutrientes contenidos en tres distintas calidades de agua (agua residual después de un tratamiento de cribado y sedimentación, agua residual tratada mediante lodos activados y agua con un fertilizante comercial), empleando por separado tres especies de microalgas (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus acutus* y *Arthrospira maxima*).

Determinar cuál de las especies de microalgas estudiadas es la que contiene la mayor cantidad de lípidos útiles en la producción de biodiesel.

Determinar la producción de biodiesel empleando la especie de microalga seleccionada cultivada en agua procedente del efluente secundario de un tratamiento de agua residual doméstica.

2.3 Hipótesis

Las concentraciones de biomasa obtenidas a partir del cultivo en fertilizante serán similares a las obtenidas después del cultivo en el agua residual y tendrán concentraciones de lípidos similares a las obtenidas con el cultivo en el agua residual. La eficiencia de remoción de nutrientes en el agua permitirá obtener un agua con bajas concentraciones de nitrógeno y fósforo.

Que sea factible obtener altas concentraciones de biomasa con alto contenido de lípidos con los nutrientes contenidos en el agua residual para poder producir biodiesel.

Capítulo 3

Marco teórico

3 Marco teórico

3.1 Problemática de los combustibles fósiles

Actualmente hay una crisis ambiental y energética. La crisis ambiental es debida al calentamiento global, que en gran parte se debe al uso de combustibles fósiles. Por esta razón se requiere remplazar los combustibles fósiles con biomasa para reducir las emisiones de dióxidos de carbono. La crisis energética se ha producido por el incremento de los precios del petróleo lo cual tiene un impacto en la sociedad. Para resolver esta situación se requieren desarrollar fuentes de energía renovable (Amin, 2009).

El uso de combustibles fósiles es una práctica no sostenible debido al agotamiento de los recursos y la acumulación de gases de efecto invernadero que ha llegado a niveles peligrosos. La mayoría de las energías renovables están enfocadas a la producción de electricidad, siendo que los combustibles tienen una mayor demanda global energética, cerca del 66 %. El desarrollo de combustibles CO₂ neutros es uno de los retos que enfrenta la sociedad actual. La producción de biocombustibles a partir de granos se estima que es un proceso que podría ser carbono neutro ya que la mayor parte del carbono utilizado por las plantas es atmosférico. Sin embargo si regiones de bosque o selva deben ser taladas para poder sembrar, entonces el balance de emisiones de CO₂ está lejos de ser neutro (Schenk *et al.*, 2008).

En la actualidad existe una escasez de los combustibles fósiles que continuará si no se encuentran otras fuentes energéticas. El uso de este tipo de combustibles produce un incremento de emisiones de CO₂, por estas razones se ha aumentado el desarrollo de la producción de biocombustibles renovables (Wang *et al.*, 2010). El crecimiento acelerado en la industria de los biocombustibles ha puesto recientemente una gran presión sobre los alimentos y el uso de los campos de cultivo. Para que la industria de los biocombustibles sea sustentable y continúe creciendo se deben buscar alternativas para la producción de biocombustibles con fuentes que no estén basadas en alimentos. El contenido de aceite y la producción de biomasa de las algas es bastante superior a la de plantas como la soya y el maíz, ya que estas viven en un ambiente acuático, además de que tienen un mayor acceso al CO₂, minerales y nutrientes comparadas con las plantas terrestres (Kong *et al.*, 2010).

3.2 Problemática de la producción de biocombustibles

Los aceites de vegetales o de semillas son caros y constituyen entre el 70% y el 85% del costo para la producción de biodiesel (Kargbo, 2010). El biodiesel derivado de plantas, el aceite de cocina de desecho y la grasa animal son una potencial alternativa de combustibles renovables, desafortunadamente con estas

fuentes no se podría satisfacer la demanda de biocombustibles (Abou Shanab *et al.*, 2010). Para producir biocombustibles para un país se requerirían de áreas de cultivo muy extensas aun cultivando únicamente palma que es la planta que tiene mayores rendimientos de aceite. Por esta razón se puede determinar que las cosechas de plantas oleaginosas no pueden contribuir en gran medida al remplazo de combustibles fósiles por biocombustibles en el futuro. Esto podría cambiar mediante la utilización de microalgas, con lo cual se reduciría enormemente el área requerida para el cultivo de estos microorganismos en relación al área para cultivo de plantas (Chisti, 2007). Las algas, sobre todo las algas verdes unicelulares han sido propuestas como una fuente potencial de combustibles renovables, ya que como materia prima pueden ser utilizadas directamente o procesadas en combustibles líquidos y gas por una gran variedad de procesos bioquímicos o termoquímicos (Griffiths y Harrison, 2009). Las microalgas parecen ser la única fuente de combustibles renovables capaces de satisfacer la demanda mundial de combustibles para transporte, ya que como las plantas, utilizan la energía solar para producir aceites pero lo hacen de manera más eficiente que las plantas (Abou Shanab *et al.*, 2010). Estos microorganismos representan una materia prima no alimentaria que se caracteriza por tener una alta tasa fotosintética, es decir que son de rápido crecimiento, tener adaptabilidad ambiental (Wu *et al.*, 2013), producciones mayores de biomasa y tasas de crecimiento superiores comparadas con las plantas oleaginosas (Lee *et al.*, 2013). Otras ventajas son que las microalgas no compiten por tierras cultivables, pueden fijar CO₂, reduciendo las emisiones de gases de efecto invernadero y mejorando la calidad del aire y los productos de desecho después de la extracción de lípidos pueden ser usados como fertilizantes (Cai *et al.*, 2013). Por estas razones son una fuente interesante para la producción de biocombustibles.

Teóricamente las microalgas pueden producir de 10 a 100 veces más aceite por área que las plantas oleaginosas. Sin embargo esta capacidad de producción no ha sido validada a gran escala, debido a que es un proceso que requeriría una gran cantidad de nutrientes. Esta demanda de nutrientes puede llevar a la generación de un proceso poco sustentable ya que la producción de fertilizantes requiere la fijación de nitrógeno del aire, que es un proceso que requiere un alto consumo de energía y además las reservas globales de fósforo están disminuyendo en calidad y cantidad y se cree que la extracción de fósforo va a llegar a su máximo en alrededor de 50 a 100 años y después caerá cuando las reservas comiencen a agotarse. Por esta razón un suplemento sustentable de nutrientes para la producción de biocombustibles a partir de microalgas es requerido en términos económicos y ambientales (Abou-Shanab *et al.*, 2013).

La reducción en las reservas de agua ha puesto la viabilidad de los biocombustibles en duda, ya que se estima que para el 2030 la producción de granos para biocombustibles requerirá 180 km³ de agua. Las algas son una alternativa para remplazar los granos comestibles debido a que no ocupan tierras cultivables para su

producción, sin embargo requieren de 11,000,000 a 13,000,000 L/ha año de agua para su cultivo en estanques abiertos (Chinnasamy *et al.*, 2010). Las microalgas requieren grandes volúmenes de medios de cultivo para su crecimiento a gran escala, lo que conlleva mayores costos de operación asociados al suplemento de nutrientes. Para generar 1 kg de microalgas se requieren aproximadamente 1.8 kg de CO₂, 3.7 kg de agua, 0.33 kg de nitrógeno y 0.71 kg de fosfatos, si se usa agua fresca sin reciclaje, este consumo de agua y recursos hace que el cultivo de algas sea muy costoso (Lee *et al.*, 2013). Pero si las aguas residuales que contienen nutrientes como nitrógeno amoniacal, nitratos y fosfatos se pudieran usar como fuente de nitrógeno y fósforo, la producción en masa de microalgas sería más factible económicamente (Wu *et al.*, 2013). La implementación de una estrategia eficiente para combinar el tratamiento de aguas residuales con la producción de biomasa de microalgas como materia prima para biocombustibles permitirá minimizar el uso de agua fresca que es un recurso muy preciado actualmente (Rawat *et al.*, 2010).

3.3 Problemática de la contaminación del agua

Las actividades humanas han tenido un gran efecto en los ciclos bioquímicos alrededor del mundo debido al incremento de nitrógeno y fósforo, entre otros contaminantes, producidos por la agricultura, ganadería, urbanización, industrialización y otras alteraciones. El enriquecimiento nutricional de ecosistemas acuáticos conlleva a la eutrofización teniendo como consecuencia la pérdida de especies naturales y de la función de un ecosistema. Debido a esto se ha hecho una amplia investigación en cuanto a la remoción de nitrógeno y fosforo de aguas residuales (Aslan y Kapdan, 2006). Los impactos ecológicos adversos causados por la eutrofización son principalmente la reducción de la biodiversidad y remplazo de las especies dominantes, incremento de la toxicidad del agua e incremento de la turbidez y decrecimiento de la vida de los cuerpos de agua (Cai *et al.*, 2013). Para evitar la eutrofización de ecosistemas de agua dulce se requiere darle un tratamiento terciario a las aguas residuales, por lo general estos tratamientos son físicos o químicos y resultan costosos, razón por la cual no se implementan. Una solución a esto sería la utilización de un tratamiento a base de microalgas (Lee *et al.*, 2013).

Existen tres principales formas de realizar una remediación del ambiente, que son mediante métodos físicos, químicos o biológicos, de los tres la bioremediación es la más apropiada en términos de seguridad, eficiencia y costo (Safonova *et al.*, 2004). Un tratamiento de aguas residuales a base de algas es más ambientalmente sustentable que algunas otras formas de tratamiento ya que este no genera contaminantes adicionales, si se hace uso de la biomasa generada (Pittman *et al.*, 2011).

3.4 Microalgas para tratamiento de agua residual

Los tratamientos de aguas basados en microalgas se han estudiado desde hace mucho tiempo debido a que podrían ofrecer ventajas sobre los tratamientos con lodos activados, tecnología que requiere de un alto consumo de energía para la aireación y el procesamiento de los lodos después del tratamiento. El éxito de los sistemas basados en microalgas depende de la habilidad de estas para asimilar el carbono orgánico, así como los nutrientes inorgánicos del agua residual para su crecimiento sin la necesidad de crear y mantener un ambiente aerobio (Wang *et al.*, 2010). Las ventajas de la utilización de algas para el tratamiento de aguas residuales incluyen los bajos costos de operación, la posibilidad de reciclar el nitrógeno y fósforo asimilados en la biomasa de algas como fertilizantes y la descarga de efluentes oxigenados en los cuerpos de agua. Además el proceso no requiere fuentes de carbono orgánico para la remoción del nitrógeno y el fósforo, lo que lo hace atractivo para el tratamiento secundario de agua residual (Aslan y Kapdan, 2006).

Las primeras aplicaciones de sistemas de tratamiento de aguas con algas se dieron a finales de los ochentas usando lagunas de alta velocidad que son una modificación de las lagunas de estabilización. Las lagunas de alta velocidad son fotobioreactores abiertos diseñados para el crecimiento de microalgas y la producción de oxígeno, cuentan con una profundidad de entre 10 y 30 cm, están construidas en forma de canales y pueden alcanzar hasta 5000 m² en aplicaciones a gran escala (Godos *et al.*, 2009). Se ha visto que estos sistemas son por mucho los reactores con una mayor relación entre costo y efectividad en cuanto al tratamiento de aguas residuales y la captación de energía solar. En estos sistemas las microalgas coexisten con bacterias heterótrofas (Rawat *et al.*, 2010). La investigación en cuanto al uso de algas para llevar a cabo un proceso de tratamiento de aguas residuales inició en la década de 1970, el propósito inicial de introducir una laguna de algas era para un tratamiento terciario del efluente para prevenir la eutrofización de cuerpos de agua. Se vio que el tratamiento con algas removía más eficientemente los nutrientes de un agua de alcantarillado doméstico sometida a una sedimentación previa que el proceso de lodos activados, sugiriendo que sería más económico y deseable emplear un sistema de algas como el proceso secundario, más que como el proceso terciario de tratamiento. (Wang *et al.*, 2010).

Un sistema que consista de un consorcio de microorganismos es preferible para llevar a cabo una bioremediación debido a que es casi imposible encontrar un microorganismo que sea capaz de degradar una mezcla de contaminantes completamente solo (Safonova *et al.*, 2004). Las microalgas juegan un papel importante durante el tratamiento terciario de aguas residuales domésticas en las lagunas de maduración y las lagunas aerobias o facultativas de las plantas de tratamiento de aguas municipales, removiendo nutrientes, metales pesados y algunos patógenos mediante la elevación del pH. (Muñoz y Guieysse, 2006). Algunas algas y cianobacterias son capaces de remover xenobióticos del ambiente por absorción,

transformación y degradación, por lo cual un conjunto de microorganismos heterótrofos y autótrofos puede potenciar la capacidad de degradación del consorcio (Safonova *et al.*, 2004). La ficoremediación (remediación mediante la utilización de algas) utilizando lagunas de algas podría reemplazar efectivamente el tratamiento terciario convencional usado para remoción de nutrientes. Las ventajas son que las microalgas liberan oxígeno durante la fotosíntesis por lo que no se requeriría lagunas con aireación, solamente se requeriría de un mezclado moderado, con esto los microorganismos heterótrofos obtendrían el oxígeno necesario para degradar la materia orgánica produciendo CO₂ que sería utilizado por las algas. Se ha visto que las microalgas pueden ser utilizadas para un tratamiento de aguas residuales de bajo costo y amigable con el ambiente comparado con otros tratamientos más comúnmente utilizados (Rawat *et al.*, 2010).

Por lo general, en los sistemas de tratamiento de agua, los compuestos nitrogenados son removidos con cierta facilidad, sin embargo la remoción de fósforo que es el segundo contaminante más importante en las aguas residuales domésticas es removido con muy bajas eficiencias. Rara vez es posible la remoción completa del fósforo mediante procesos biológicos, generalmente solo se remueve una pequeña fracción de los compuestos que contienen fósforo (Hernández *et al.*, 2006). En muchos casos el fósforo es precipitado de los efluentes con el uso de sustancias químicas o es incorporado a los lodos activados por la actividad microbiana, pero al recuperar el fósforo de esta forma este no es completamente reciclable y es enterrado o tratado para generar fertilizantes. Muchos estudios han demostrado que las microalgas tienen un gran potencial en la remoción de nitrógeno y fósforo (Aslan y Kapdan, 2006), los tratamientos a base de algas son igual de eficientes en la remoción de fósforo de aguas residuales que los tratamientos químicos (Pittman *et al.*, 2011). Muchas especies de algas verdes y cianobacterias pueden asimilar el nitrógeno y los fosfatos en su biomasa al igual que el carbono inorgánico para la fotosíntesis. Un sistema de tratamiento a base de microalgas puede ser empleado como una alternativa de tratamiento secundario o postratamiento secundario para remover nitrógeno y fósforo del agua residual, especialmente cuando quedan grandes cantidades de estos nutrientes después de la reducción de materia orgánica llevada a cabo por los métodos biológicos tradicionales (Park *et al.*, 2010). Se ha visto que una aireación moderada durante el tratamiento con algas es benéfico para la remoción de nitrógeno amoniacal, debido a que el amonio se volatiliza, pero también es benéfico debido a que disminuye la concentración de oxígeno en el agua, el cual es un inhibidor de la fotosíntesis (Park *et al.*, 2010).

La contaminación del ambiente con metales pesados es un fenómeno mundial y debido a su toxicidad hay regulaciones que requieren reducir sus niveles en el ambiente a concentraciones tan bajas como partes por billón e incluso menores. Existen tecnologías para remover metales, pero por lo general son inefectivas o muy costosas al usarlas para llegar a concentraciones muy bajas de iones metálicos, por esta razón se

requieren nuevas tecnologías como la bioremediación que tiene el potencial de remover los metales de aguas contaminadas alcanzando mayores eficiencias a un menor costo que los tratamientos convencionales. La superioridad de las microalgas sobre las bacterias o los hongos en lo que se refiere a bioremediación no se ha establecido, ya que existen pocos estudios comparativos, sin embargo hay muchos estudios sobre la acumulación de metales pesados por microalgas particularmente a bajas concentraciones (Wilde y Benemann, 1993). La habilidad de las microalgas para crecer en ambientes ricos en nutrientes y acumular metales del agua residual, las hace atractivas para tratamientos de agua sostenibles y de bajo costo (Pittman *et al.*, 2011).

El crecimiento eficiente de microalgas en aguas residuales depende de una gran variedad de factores, como son el pH, la temperatura del medio de cultivo, la disponibilidad de luz, CO₂ y O₂ y la concentración de nutrientes esenciales en el medio de cultivo como el nitrógeno, fósforo y carbono orgánico, además de la relación entre estos nutrientes (Pittman *et al.*, 2011). Los factores ambientales más importantes que influyen la tasa de crecimiento de las algas y su contenido lipídico son la intensidad de luz, la temperatura y la concentración de nutrientes (Wu *et al.*, 2013). La eficiencia de los tratamientos de agua basados en microalgas por lo general decrece a bajas temperaturas, con altas concentraciones de oxígeno disuelto debido a que se produce un daño foto-oxidativo en las células y con bajas o muy altas intensidades de luz solar (Wang *et al.*, 2010). La fotoinhibición puede producirse durante días soleados o con bajas concentraciones de algas ya que la intensidad de la luz no es reducida por las células que están en la superficie. Se ha determinado mediante la realización de experimentos al aire libre con agua residual doméstica que el factor principal que limita el crecimiento de las algas es la luz (Ip *et al.*, 1982). Las microalgas por lo general son sensibles a contaminantes tóxicos y en ocasiones son utilizadas como microorganismos de prueba para medir toxicidad aguda, también son sensibles a altas concentraciones de amoníaco y pH elevado. El amoníaco es tóxico para las microalgas debido a que desacopla el transporte de electrones en el fotosistema II y compite con el agua en las reacciones de oxidación que producen oxígeno (Muñoz y Guieysse, 2006). La relación óptima entre nitrógeno y fósforo para el crecimiento de algas de agua dulce debe estar en un rango de entre 6.8 y 10 (Wang *et al.*, 2010), la relación entre carbono y nitrógeno debe ser de alrededor de C:N 6:1 y la de carbono y fósforo de C:P 48:1 (Woertz *et al.*, 2009). Cargas orgánicas altas y la presencia de algunas sustancias antimicrobianas o bioestáticas como fenoles y lípidos, pH bajo, baja actividad de agua y una composición no balanceada de nutrientes pueden presentar dificultades para obtener procesos biológicos óptimos (Rawat *et al.*, 2010). Algunos factores bióticos que podrían afectar negativamente el crecimiento de las algas son bacterias patógenas o zooplancton que actúa como predador,

la competencia por los nutrientes esenciales con otros microorganismos y además la densidad inicial de las algas en el agua residual es un factor crítico para el crecimiento de la población (Pittman *et al.*, 2011).

El cultivo heterótrofo de microalgas ofrece ventajas sobre el cultivo autótrofo, como con la eliminación de requerimientos de luz, no existe el problema de limitación de luz por alta densidad celular o la fotoinhibición, mejor control del proceso de cultivo y menores costos de extracción de biomasa debido a las mayores densidades celulares obtenidas. Además las microalgas crecidas de forma heterótrofa acumulan una mayor cantidad de lípidos que las cultivadas de manera autótrofa (Sakthivel *et al.*, 2011).

Muchas de las microalgas utilizadas para el tratamiento de aguas residuales son especies mixótrofas, las cuales son eficientes reduciendo los niveles de demanda química de oxígeno y pueden eliminar el nitrógeno y el fósforo del agua. El crecimiento mixótrofo ocurre cuando el CO₂ y el carbono orgánico se asimilan en las células simultáneamente. El cultivo de microalgas bajo condiciones mixótrofas puede prevenir la limitación de luz que se da en cultivos autótrofos puros. Esto ofrece la posibilidad de incrementar la densidad celular y la productividad de lípidos eliminando los requerimientos de luz (Wang *et al.*, 2012).

3.5 Microalgas estudiadas para el tratamiento de aguas residuales.

Las algas que han sido más estudiadas en el tratamiento de aguas residuales pertenecen a los géneros *Anabaena*, *Phormidium*, *Spirulina*, *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Scenedesmus* (Hoffmann, 1998), *Botryococcus* y *Chlamydomonas* y debido a los resultados obtenidos se ve que la eficacia de este método es prometedora (Rawat *et al.*, 2010). Las especies de algas del género *Chlorella* han sido ampliamente utilizadas para el tratamiento de aguas residuales y han probado tener altos porcentajes de remoción de nitrógeno, fósforo y demanda química de oxígeno con diferentes tiempos de retención que van de 10 h hasta 42 días, en un consorcio con bacterias o por ellas mismas, demostrando así que existe potencial para remplazar los sistemas de lodos activados en el proceso secundario o terciario para la reducción del contenido de nutrientes en un agua residual con la producción de biomasa. En un estudio realizado por Wang *et al.*, (2010) se cultivó una especie de alga del género *Chlorella* en agua residual antes y después de la sedimentación primaria, en agua proveniente del sistema de lodos activados y en agua obtenida del secado de lodos, determinándose que el crecimiento fue mejor en esta última calidad de agua debido a su mayor contenido de nitrógeno, fósforo y demanda química de oxígeno que las demás aguas, aun teniendo una relación de nitrógeno y fósforo bastante desbalanceada.

En la Figura 1 se muestran algas de la especie *Chlorella*, algunas especies de esta alga son heterótrofas o mixótrofas y pueden consumir carbono orgánico además de nutrientes inorgánicos como parte de su proceso metabólico (Cai *et al.*, 2013).

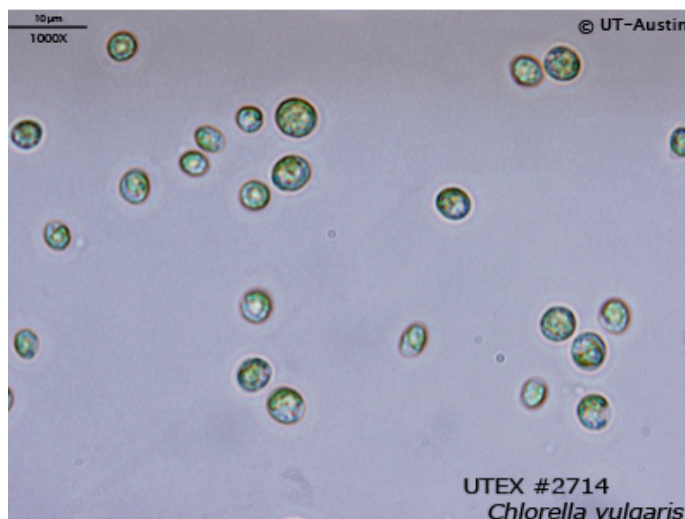


Figura 1. Imagen de un cultivo de *C. vulgaris*

En la Figura 2 se muestra la microalga *Scenedesmus* que es una microalga pequeña no móvil, que está equipada con espinas y un tipo de cerdas que permiten un incremento en la absorción de luz y nutriente, mientras que evitan la predación en el agua (Abou-Shanab *et al.*, 2013).



Figura 2. Imagen de un cultivo de *Scenedesmus* sp.

En la Figura 3 se muestra una fotografía de la cianobacteria *Arthrospira maxima*. Su forma filamentosa promueve la autofloculación, lo que facilita su extracción de los medios de cultivo. Se ha utilizado efluentes de digestores anaerobios como una fuente de nutrientes para esta microalga (Olguín *et al.*, 1994).



Figura 3. Imagen de un cultivo de *A. maxima*.

Las microalgas representan un grupo de microorganismos excepcionalmente diverso, pero altamente especializado, adaptado a varios hábitats (Abou-Shanab *et al.*, 2013). Un gran número de estudios han argumentado que la producción de biocombustibles a partir de algas, particularmente la producción de biodiesel es sustentable tanto económica como ambientalmente. El uso de recursos como el agua residual es una forma viable de aumentar la sustentabilidad de la producción de biocombustibles a partir de algas ya que provee de un medio de cultivo efectivo para el crecimiento de algas, así como un aporte de nutrientes como nitrógeno y fósforo (Pittman *et al.*, 2011).

3.6 Producción de biocombustibles a partir de microalgas

Las microalgas son microorganismos que tienen un mayor rendimiento en cuanto a combustible y menor demanda de agua que las plantas oleaginosas. Muchas algas eucarióticas tienen la habilidad de almacenar cantidades significativas de compuestos ricos en energía como son triacilgliceroles y almidón que después pueden ser utilizados para la producción de biocombustibles como biodiesel y bioetanol (Abou-Shanab *et al.*, 2013).

La biomasa de las algas o los extractos lipídicos pueden ser convertidos en diferentes formas de combustibles como biogás, biodiesel, queroseno, bioetanol o biohidrógeno a través de la implementación de procesos tecnológicos como la digestión anaerobia, la pirolisis, la gasificación, rompimiento catalítico o la transesterificación ya sea química o enzimática. Los biocombustibles de algas podrían ser combustibles CO₂ neutros si se acopla la producción al secuestro de CO₂ de otras industrias (Singh y Olsen, 2011).

El agua residual doméstica es un residuo de interés para la producción de biocombustibles a partir de microalgas. La producción de agua residual se da en todo el mundo y el continuo incremento de la población mundial hace que sea un recurso inagotable como medio de cultivo para las microalgas. Debido a que la

biomasa generada en estas aguas no se puede usar como alimento por los problemas toxicológicos que presentaría, en la actualidad se realizan estudios para promover la acumulación de lípidos en las microalgas que puedan utilizarse para producir biodiesel a partir de la biomasa obtenida después del tratamiento (Sydney *et al.*, 2010).

La investigación para producir materia prima para biodiesel a partir de algas se ha llevado a cabo por lo menos durante 50 años, más recientemente se determinó que la producción de biodiesel se podía hacer acoplado un sistema de tratamiento de aguas a base de algas con la producción de biodiesel a partir de la biomasa generada asumiendo que esta tendría un contenido suficiente de ácidos grasos para competir con otras materias primas para biodiesel, sin embargo en la actualidad hay pocos reportes del potencial que tienen las algas cultivadas en aguas residuales para producir biocombustibles (Mulbry *et al.*, 2008). Algunos estudios a nivel laboratorio han reportado una acumulación de lípidos en microalgas crecidas en aguas residuales que van desde el 10 % hasta el 30 % de contenido de lípidos en base seca en la biomasa (Pittman *et al.*, 2011). La biomasa generada en microalgas cultivadas en agua residual tiene altas cantidades de ácidos grasos libres, triacilgliceroles, fosfolípidos y glicolípidos que son la materia prima ideal para la producción de biodiesel. En tratamientos de aguas residuales provenientes de ranchos de ganado porcino se han alcanzado productividades de 7 a 33 g/m²d de biomasa con la reducción simultánea en el agua de la demanda química de oxígeno, el nitrógeno y el fósforo (Wang *et al.*, 2010).

Por lo general las mayores concentraciones de lípidos reportadas que se han obtenido, se logran con crecimiento de microalgas en fotobioreactores o cultivos en lotes a nivel laboratorio, mientras que esas concentraciones de lípidos por lo general no se observan en microalgas que han crecido en lagunas abiertas. Estas altas concentraciones de lípidos generalmente están aunadas a una baja cantidad de biomasa, sobre todo cuando el cultivo se hace bajo condiciones de estrés como mediante la limitación de nitrógeno o fósforo. Debido a esto hay un gran interés en la determinación de productividad de lípidos en condiciones de cultivo que produzcan grandes cantidades de biomasa como el crecimiento de microalgas en aguas residuales (Pittman *et al.*, 2011). Se ha sugerido que el crecimiento de las algas se debe enfocar en la producción de biomasa más que en la producción de lípidos que es el enfoque que el sector de los biocombustibles ha preferido. Una gran cantidad de biomasa aumenta la viabilidad de convertir la biomasa no solamente en biodiesel, sino también en otros biocombustibles alternativos (Rawat *et al.*, 2010).

La selección de las especies de microalgas más adecuadas para la producción de biodiesel debe tomar en cuenta, además de altas productividades de lípidos, otros factores como la habilidad de la obtención de nutrientes y el crecimiento bajo condiciones ambientales específicas. El perfil de ácidos grasos también es

relevante, debido a que algunas características del biodiesel dependen de la composición de ácidos grasos del mismo (Amaro *et al.*, 2010).

Los biocombustibles basados en algas pueden ser utilizados particularmente para el desarrollo de instalaciones de producción a pequeña escala para proveer las necesidades energéticas de comunidades rurales o poblaciones que residan en áreas que no estén localizadas cerca de grandes regiones en donde la actividad principal sea la agricultura (Grayburn *et al.*, 2013).

Las principales ventajas de usar microalgas como una fuente de biomasa para la producción de biodiesel son las altas tasas de crecimiento y los cortos tiempos de generación, mínimo requerimiento de tierras para el cultivo, alto contenido de lípidos, el uso de agua residual como fuente de nutrientes sin la necesidad de la utilización de herbicidas o pesticidas (Muñoz y Guieysse, 2006).

3.7 Ventajas e inconvenientes de la producción de biocombustibles con microalgas.

El biodiesel obtenido de microalgas es el que se espera que pueda reemplazar las fuentes de energía basadas en petróleo gracias a su alta productividad por área y contenido de lípidos debido a su alta productividad energética, la cual es de 7 a 31 veces mayor que la de la palma y decenas a centenas mayor que otras plantas oleosas como el maíz, la soya, la canola, la jatropha y el coco. Sin embargo se deben hacer progresos en el cultivo a gran escala de microalgas para que los costos del biodiesel compitan con los de la producción de energía de otras fuentes, sobre todo de combustibles basados en petróleo. La diferencia de costos de la bioenergía producida de microalga y de la energía fósil es lo que limita la industrialización de la bioenergía de las algas (Cho *et al.*, 2013).

La producción de aceite de algas se ha estimado en 29,930 a 136,560 L/ha año, una productividad 130 veces mayor que la de la soya. Sin embargo esta estimación ha sido calculada generalmente en cultivos a escala laboratorio bajo condiciones controladas de crecimiento, en contraste todos los cultivos en masa de microalgas tienen rendimientos de 10 a 20 veces menores que los esperados (Sturm y Lamer, 2011).

Las principales desventajas en la producción de biocombustibles a partir de microalgas son que las algas unicelulares se encuentran en suspensión en los medios de cultivo y son difíciles de recolectar y que la extracción de lípidos es compleja y todavía se encuentra en una etapa de desarrollo (Rawat *et al.*, 2010).

La recuperación de las algas del medio de cultivo sigue siendo uno de los mayores desafíos para los sistemas de producción de biocombustibles a gran escala. En este proceso deben utilizarse tecnologías baratas y de bajo consumo energético para poder tratar volúmenes grandes con altas eficiencias de recuperación. Se

requieren varios procesos para una separación adecuada de las algas y no existe un método que funcione para todos los casos, en cada caso particular la selección adecuada de las operaciones unitarias es crítica para la recuperación de la biomasa. El proceso de la recuperación de la biomasa de las microalgas contribuye de un 20 a un 30 % del costo del producto final. Aunque la biomasa puede ser recuperada utilizando varias operaciones unitarias, la opción más prometedora es la floculación seguida de una sedimentación y de filtrado. Las células de las microalgas tienen un tamaño menor a los 30 μm y su densidad es similar a la del agua, por lo que tienen velocidades de sedimentación de 10^{-6} m/s, para aumentar su velocidad de sedimentación a 10^{-4} m/s es necesario formar agregados mediante la adición de floculantes (Granados *et al.*, 2012). La adición de floculantes como la cal, el alumbre o el sulfato poliférrico es eficiente y confiable, sin embargo los floculantes químicos son caros y aumentan los sólidos disueltos del efluente (Muñoz y Guieysse, 2006). Otro inconveniente que existe al usar sales es que se requieren altas dosis y el sobrenadante se contamina con el exceso de sales, como alternativa se pueden utilizar polielectrolitos para la floculación (Granados *et al.*, 2012).

La extracción de lípidos de la biomasa de microalgas es un proceso central para la producción de biodiesel y se realiza mediante métodos químicos o físicos o una combinación de ambos. Los métodos de extracción deben ser rápidos, efectivos, no deben dañar los lípidos y deben ser fácilmente escalados a procesos industriales. Si la extracción se hace por métodos químicos mediante la extracción con disolventes, estos deben ser de bajo costo, volátiles, no tóxicos, no polares y deben extraer en cantidades mínimas otros componentes celulares. Es necesario identificar los lípidos ya que la fracción lipídica indica las propiedades del biodiesel producido (Rawat *et al.*, 2010).

La extracción de lípidos mediante disolventes y la transesterificación directa son técnicas que son inhibidas cuando se realizan en presencia de una fase acuosa, sin embargo el secado de las algas es costoso y requiere de una gran cantidad de energía (Sathish y Sims, 2012).

3.8 Biodiesel

El biodiesel es único entre los biocombustibles ya que no es un único compuesto definido sino una mezcla variable. Los triglicéridos en cualquier aceite son una mezcla de ácidos grasos saturados e insaturados esterificados a una molécula de glicerol. El biodiesel se hace mediante la esterificación de los ácidos grasos liberando el glicerol que es un coproducto que puede ser comercializado (Mousdale, 2008).

El biodiesel tiene algunas ventajas en comparación con el petrodiesel, como son que el biodiesel proviene de fuentes renovables, es biodegradable, reduce muchas de las emisiones reguladas (excepto los óxidos de

nitrógeno), tiene un más alto punto de ignición por lo que es más seguro de manipular y almacenar y excelente lubricidad (Knothe *et al.*, 2010). La utilización de biodiesel en motores diésel convencionales reduce sustancialmente las emisiones de hidrocarburos, CO, partículas, sulfatos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (Balat y Balat, 2010). La agencia de protección ambiental (EPA por sus siglas en inglés) hizo un estudio de impacto de las emisiones del biodiesel. Según el reporte el biodiesel existe una reducción de 10 % en partículas totales, de 21 % en hidrocarburos y de 11 % en monóxido de carbono. Sin embargo hay un incremento del 2 % en emisiones de óxidos de nitrógeno. El biodiesel reduce las emisiones de dióxido de carbono cuando se usa en lugar del petrodiesel y la reducción en el sector transporte alcanza un 80 %. Estos datos se hicieron en un estudio basado en el ciclo de vida del biodiesel y el petrodiesel, tomando en cuenta las emisiones en todos los pasos desde la producción hasta el uso de ambos combustibles. (EPA, 2002).

Las propiedades del biodiesel están determinadas en su mayor parte por la estructura de los ácidos grasos que lo componen. Las características más importantes son: la calidad de ignición determinada por el número de cetanos, la propiedad de fluidez en frío y estabilidad oxidativa. Las características estructurales de los ésteres de ácidos grasos que influyen en las propiedades del combustible son la longitud de la cadena, el grado de insaturación, la presencia de cadenas secundarias. Las propiedades del biodiesel influenciadas por el perfil de ácidos grasos son: el número de cetanos, las emisiones, el calor de combustión, el flujo a bajas temperaturas, la estabilidad oxidativa, la viscosidad y la lubricidad (Knothe, 2005). Aunque el perfil de ácidos grasos parece no tener un impacto en la producción de biodiesel por el proceso de transesterificación, si afecta las propiedades del biodiesel. Los ácidos grasos saturados producen un biodiesel con una estabilidad oxidativa superior y un mayor número de cetanos, pero disminuyendo las propiedades del biodiesel a bajas temperaturas. Los ácidos grasos poliinsaturados producen buenas propiedades de fluidez en frío, pero son susceptibles a oxidación produciendo inestabilidad durante el almacenamiento (Hu *et al.*, 2008). El perfil de ácidos grasos de las microalgas es adecuado para la síntesis de biodiesel, el mayor interés que se tiene en el aceite de las microalgas se debe a la gran capacidad que tienen estas de producir aceites, la cual es mucho mayor que el de cualquier semilla o planta oleaginosa. Sin embargo la producción en masa de microalgas enfrenta dificultades técnicas que impiden el desarrollo de la industria de las algas debido a problemas económicos. Además es necesario desarrollar tecnologías efectivas y de bajo costo que permitan separar las microalgas del medio de cultivo y extraer sus aceites de manera eficiente. Para obtener una mayor cantidad de lípidos se ha limitado el nitrógeno disponible en el medio de cultivo o la disponibilidad de algún otro nutriente, con lo cual se lograron obtener altas producciones de lípidos pero una muy baja producción de biomasa. Por esta razón se ha determinado que debe considerarse simultáneamente tanto la producción de lípidos como la de biomasa, con lo cual se determinará si una microalga es indicada para la producción de

biodiesel dependiendo de su contenido de lípidos y la producción de biomasa de la misma (Chen *et al.*, 2011).

La principal razón por la cual los aceites se transesterifican a ésteres de alquilo para la producción del biodiesel es para alcanzar una viscosidad cinemática similar a la del petrodiesel. La alta viscosidad de los aceites conlleva a problemas operacionales en los motores diésel como depósitos en varias partes del motor (Knothe *et al.*, 2010).

Los aceites crudos pueden dar bajas eficiencias en la reacción de transesterificación debido a sus altos contenidos de ácidos grasos libres, ya que si se utiliza un catalizador básico, los ácidos grasos se saponifican en lugar de esterificarse. Por esta razón se realiza una preesterificación con un catalizador ácido y posteriormente se hace la esterificación mediante una catálisis básica (Mousdale, 2008).

Capítulo 4

Metodología

4 Metodología

4.1 Primera etapa

En la Figura 4 se muestra la primera etapa experimental donde se cultivó cada especie de microalgas por separado en cada una de las tres calidades de agua, se determinó el contenido de nutrientes antes y después del cultivo para determinar la calidad de agua y la remoción de los nutrientes. Una vez finalizados los cultivos se separó la microalga por centrifugación y se secó para realizar la extracción de lípidos. Se seleccionó la microalga que tuvo el mayor contenido de lípidos para realizar la segunda etapa experimental.

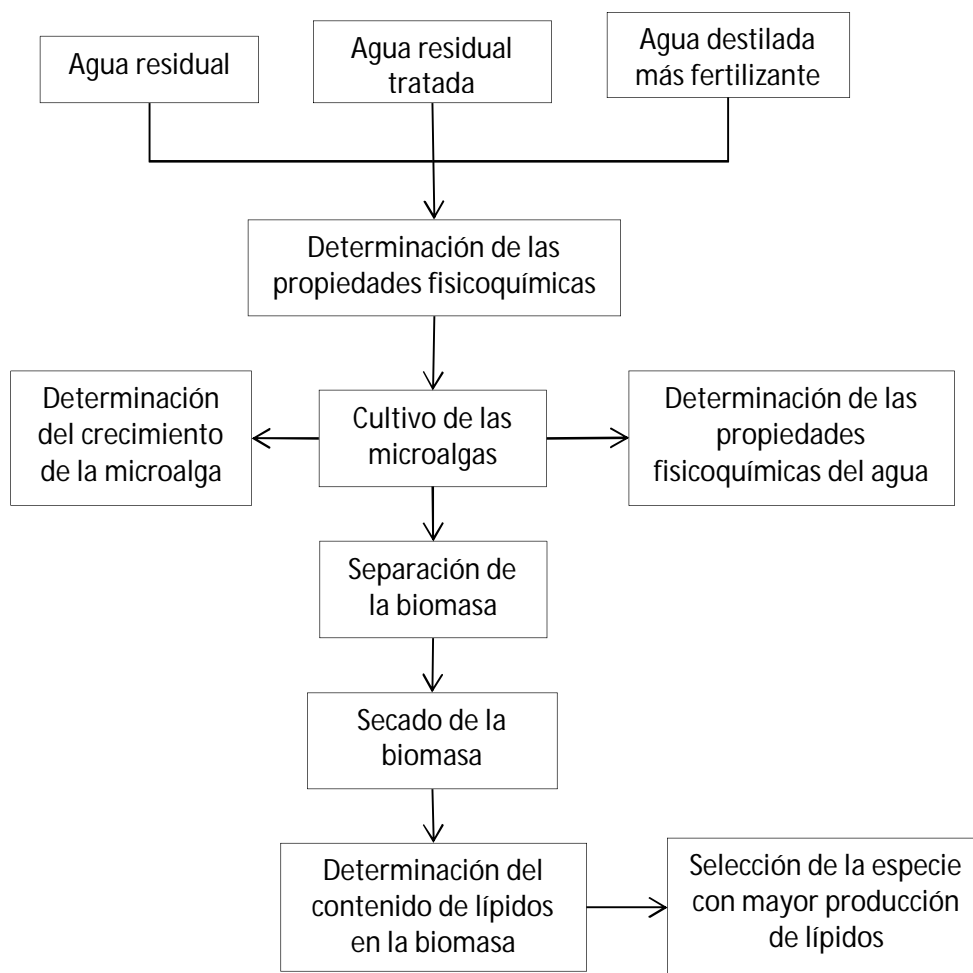


Figura 4. Primera etapa de la experimentación.

4.2 Segunda etapa

En la Figura 5 se muestra la segunda etapa experimental en la cual se cultivó la especie de microalga seleccionada en la primera etapa y se cultivó únicamente en agua residual. En esta etapa se hicieron cultivos con y sin adición de CO₂ para ver si esto tenía efecto en el crecimiento de la microalga. Nuevamente se hicieron las determinaciones de nutrientes en el agua. Una vez finalizados los cultivos se extrajo la biomasa por coagulación-floculación. Se secó la biomasa y se realizó la extracción de los lípidos con los cuales se obtuvo el biodiesel.

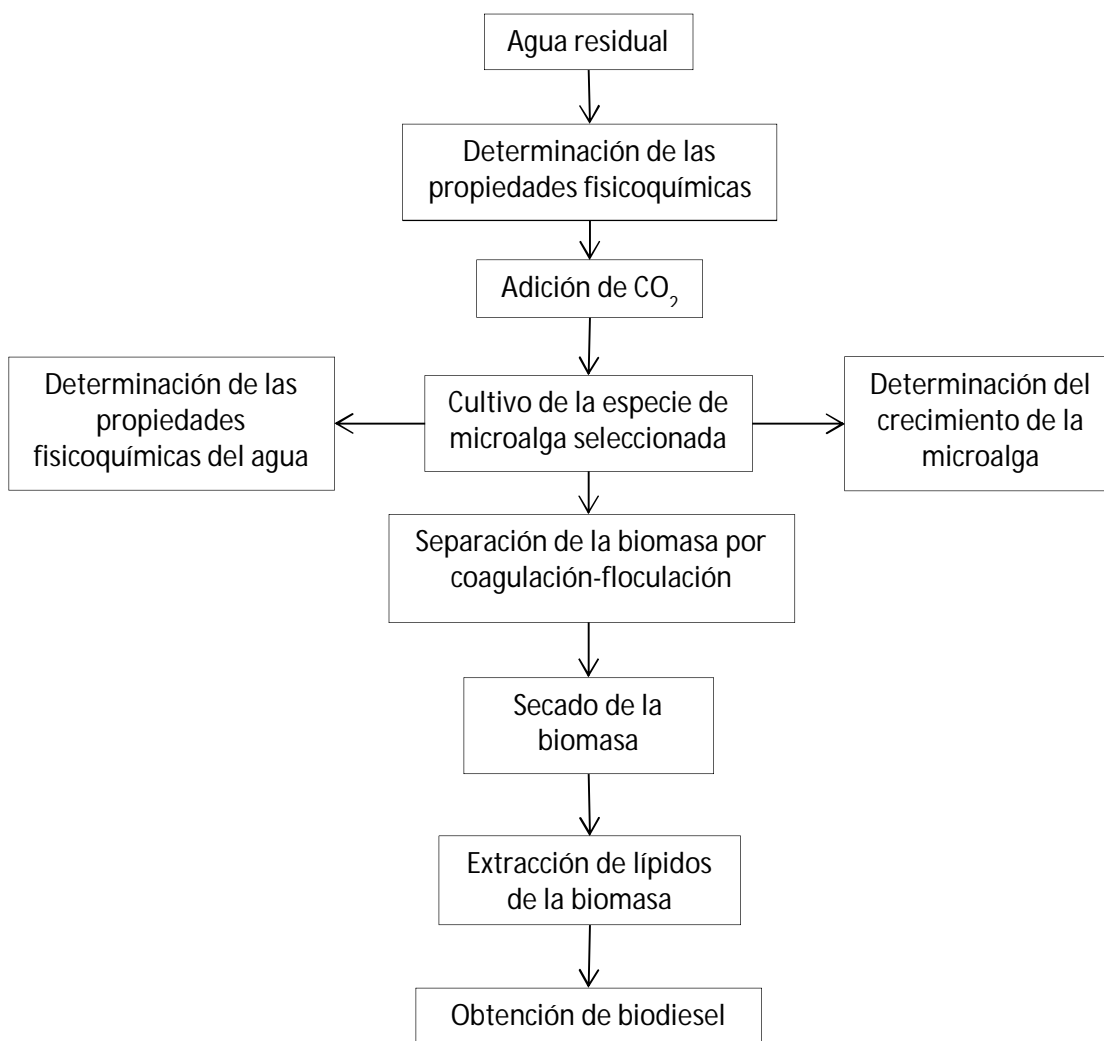


Figura 5. Segunda etapa de la experimentación.

4.3 Calidades de agua

Para el cultivo de las microalgas se utilizaron 3 calidades de agua, dos de las cuales fueron agua residual proveniente de un tratamiento de cribado y sedimentación (agua residual) y agua residual proveniente de un tratamiento de lodos activados (agua tratada). Estas dos calidades de agua fueron obtenidas de la planta de tratamiento de aguas residuales de Ciudad Universitaria. El agua se esterilizó y se almacenó a 4° C para prevenir que se alteraran demasiado sus características fisicoquímicas.

La tercera calidad de agua utilizada fue agua destilada a la cual se le adicionó el fertilizante comercial hidrosoluble marca Peters (fertilizante) con un contenido de 20% de nitrógeno (4% nitrógeno amoniacal, 6% de nitratos y 10% de urea), 20% de fosfatos (P_2O_5) y 20% de potasio (K_2O) y trazas de magnesio, boro, cobre, hierro, manganeso, molibdeno y zinc. El fertilizante fue utilizado en una concentración de 1.5 g/L.

4.4 Selección de las especies de microalgas

Se seleccionaron tres especies diferentes de microalgas escogidas a partir de una revisión bibliográfica.

El género de microalgas que predomina en una laguna de tratamiento de aguas residuales parece estar en función de la carga orgánica superficial, al aumentar esta la diversidad de especies decrece. El género *Chlorella* es probablemente el más persistente y está presente en un alto rango de cargas orgánicas, aunque prefiere bajas cargas orgánicas como las microalgas pertenecientes al género *Scenedesmus* (Mara y Horan, 2003).

El género de microalgas *Chlorella* ha sido usado para tratamiento de aguas residuales y ha probado tener habilidad para la remoción de nitrógeno, fósforo y demanda química de oxígeno con diferentes tiempos de retención que van de 10 h a 42 días, ya sea en cultivos con bacterias o sin ellas (Wang *et al.*, 2010). La especie *C. vulgaris* es conocida como una de las microalgas de más rápido crecimiento y por lo general tiene un contenido de entre 14 y 22% de lípidos. Ha sido reportado que es capaz de obtener nitrógeno del amonio y el amoníaco y de obtener fósforo del agua residual a través de su membrana (Kim *et al.*, 2010). Se eligió la especie de microalgas *Chlorella vulgaris* debido a que esta especie ha sido aislada de sistemas de tratamiento de agua y tiene un contenido de lípidos de entre 40 y 56 % en peso seco (Satyanarayana *et al.*, 2011) y una productividad de 11 a 40 mg/L d de lípidos (Amaro *et al.*, 2010).

La microalga verde *Scenedesmus obliquus* ha demostrado crecer bastante bien en aguas residuales urbanas, registrando tasas de crecimiento similares a las reportadas cuando se cultiva en un medio sintético. Esta especie tolera un amplio rango de temperatura y pH, haciéndola versátil para la purificación de agua residual

(Martínez *et al.*, 2010). Se seleccionó la microalga *Scenedesmus* sp. debido a que tiene un contenido de lípidos de entre 20 y 21% y su productividad de lípidos es de 41 a 54 mg/L d (Gong y Jiang, 2011), teniendo una productividad de biomasa de 0.21 1 026 g/L d (Rodolfi *et al.*, 2009). Además ha sido cultivada en distintos tipos de aguas residuales como el agua proveniente de un molino de aceite, agua residual de la industria del papel, efluentes provenientes de un tratamiento de digestión anaerobia (Rawat *et al.*, 2010).

La microalga *Spirulina*, también conocida como *Arthrospira*, fue seleccionada debido a que ha sido utilizada para el tratamiento de agua residual doméstica (Rawat *et al.*, 2010), teniendo un contenido de lípidos de 6 a 16 % (Mata *et al.*, 2010) y una productividad de biomasa de 0.21 g/L d (Chen *et al.*, 2011).

De acuerdo a lo comentado anteriormente, las especies de microalgas que se utilizaron fueron *C. vulgaris*, *S. acutus* y *A. maxima*.

4.5 Aclimatación de las microalgas al agua residual

Las microalgas fueron cultivadas primero en un medio de cultivo que contenía 75 % de agua destilada más fertilizante (1.5 g/L) y 25 % de agua residual o agua tratada. Después de este cultivo se tomó un inóculo para hacer crecer las microalgas en un medio que contenía 50 % de agua destilada más fertilizante (1.5 g/L) y 50% de agua residual o agua tratada. Esto se repitió para un medio que contenía 25 % de agua destilada más fertilizante (1.5 g/L) y 75 % de agua residual o agua tratada y por último para agua residual o tratada ya sin el fertilizante. Cada uno de los cultivos se mantuvo durante una semana.

4.6 Cultivo de las microalgas

En la primera etapa experimental se realizó el cultivo de las microalgas en las tres diferentes calidades de agua. Este se hizo en matraces Erlenmeyer de 2 L, a los cuales se adicionó 1 L de alguna de las tres calidades de agua y se inoculó con 100 mL del cultivo realizado en agua residual (con un contenido de biomasa seca de 700 mg/L). Los cultivos se mantuvieron con aireación constante y con 12 h de luz y 12 h de oscuridad. La iluminación se realizó utilizando lámparas fluorescentes T8 marca Phillipis de 32 Watt, con una iluminancia de 37 klux.

Los cultivos se detuvieron una vez alcanzada la fase estacionaria en el agua residual y el agua tratada debido a que se quería comparar el contenido de lípidos obtenido para los mismos tiempos de cultivo en cada una de las 3 calidades de agua.

En la segunda etapa experimental los cultivos se hicieron en reactores con una capacidad de entre 17 y 19 L, en este caso se mantuvieron aireación constante pero sin controlar la iluminación, se utilizó la luz solar dentro de un invernadero como fuente de iluminación.

4.7 Determinaciones de las propiedades fisicoquímicas a las calidades de agua

Estas determinaciones analíticas se realizaron para determinar la calidad de agua y la remoción de nutrientes. En la primera etapa experimental se tomaron muestras únicamente antes del cultivo y al finalizar el cultivo, en la segunda etapa experimental se tomaron muestras cada 2 ó 3 días, tomándose alrededor de 100 mL de muestra.

Se determinó el nitrógeno en forma de nitratos por espectrofotometría de ultravioleta (APHA, 1998) y el nitrógeno orgánico y amoniacal por el método de Kjeldahl (APHA, 1998) con los equipos Büchi Digestion Unit K-435, Büchi Scrubber B-414 y Büchi Distillation Unit K-350.

Se determinó el fósforo total por el método colorimétrico del ácido vanadomolibdofosfórico (APHA, 1998).

El pH y el oxígeno disuelto del agua se determinaron mediante electrodos con el equipo Thermo Orion Electron Corporation Orion 5 Star.

Se determinó la DQO por el método colorimétrico con reflujo cerrado (APHA, 1998) utilizando un digestor Hanna HI 839 800 COD Reactor.

El espectrofotómetro utilizado para la determinación de nitratos, fosfatos y DQO fue un Pharmacia Biotech Ultrospec 3000.

4.8 Determinación del crecimiento de las microalgas

El crecimiento se determinó midiendo la densidad óptica del medio de cultivo a 680 nm, con lo cual se obtiene la concentración de clorofila en el medio que sirve como un indicador de la densidad de algas (Wang *et al.*, 2010) con un espectrofotómetro Pharmacia Biotech Ultrospec 3000, sin embargo, debido a que este es un método de indirecto para determinar el contenido de biomasa, se midió el crecimiento mediante la cuantificación de biomasa seca que es un método directo (APHA, 1998). La biomasa seca se cuantificó filtrando la muestra para separar la biomasa del medio de cultivo, la cual se secó para determinar el peso seco por gravimetría. Se tomaron muestras de 10 mL para hacer estas determinaciones diariamente.

Se realizó una curva de calibración mediante la relación entre la densidad óptica y el peso seco.

4.9 Separación de las microalgas del medio de cultivo

En la primera etapa experimental mostrada en la Figura 4, la separación de la biomasa del agua residual se realizó mediante centrifugación a 3500 rpm por 9 min, con una centrifuga Labnet Hermile Z400.

En la segunda etapa, la cual se muestra en la Figura 5, la separación de las microalgas del medio de cultivo se realizó mediante una coagulación-floculación con quitosano en una prueba de jarras, probando diferentes concentraciones de este coagulante a diferentes pH para determinar la dosis y el pH que logren la mayor remoción de microalgas del medio de cultivo (Divakaran y Pillai, 2002). El cultivo se agitó a 150 rpm durante 1 min, posteriormente se disminuyó la velocidad de agitación a 30 rpm, continuando la agitación por 15 min por último se paró la agitación para dejar sedimentar los flóculos durante 10 min. El equipo utilizado para la prueba de jarras fue un equipo Phipps & Bird PB-700 Jar tester.

Se utilizó quitosano como coagulante debido a que con la revisión bibliográfica realizada, se seleccionó como la mejor opción debido a que es un polímero orgánico, es económico y no es tóxico, además es eficiente para la remoción de microalgas de agua dulce. Las eficiencias de remoción de la biomasa alcanzan un 90%, mediante la adición de 15 mg de quitosano por litro de agua. (Muñoz y Guieysse, 2006).

Después de la coagulación-floculación se llevó a cabo una filtración para separar la biomasa del medio de cultivo.

4.10 Extracción de los lípidos de las microalgas

Se llevó a cabo el secado de la biomasa en una estufa a 60° C hasta tener un peso constante (Chinnasamy *et al.*, 2010). Los lípidos fueron extraídos de la biomasa seca usando una mezcla de cloroformo:metanol (2:1) con sonicación a 25 W por 1 min con un sonicador Fisher Scientific 60 Sonic Dismembrator. Posteriormente se filtró la muestra mediante un filtro de fibra de vidrio. Al filtrado se le agregó una disolución de NaCl al 0.9% y se colectó la fase orgánica. La fase orgánica colectada se evaporó con ayuda de un rotavapor (Zhou *et al.*, 2012; Moazami *et al.*, 2011). Los remanentes luego de la evaporación del disolvente fueron reextraídos con hexano y filtrados con un filtro de fibra de vidrio. Nuevamente se evaporó el disolvente del filtrado mediante un rotavapor (Sathish y Slms, 2012). Se utilizó un rotavapor marca Büchi R-124 con un baño de agua caliente Büchi waterbath B-480.

El contenido de lípidos se determinó gravimétricamente.

4.11 Determinaciones al aceite

Se realizó una espectroscopía infrarrojo con un equipo Varian 800 FT-IR. Para este análisis se mezcló una gota de aceite con KBr, hasta que la mezcla tuvo una consistencia pastosa, con la mezcla se hizo una pastilla con la ayuda de una pastilladora y se colocó la pastilla en el espectroscopio. Esto se realizó para observar si en el espectro de infrarrojo se encuentran las bandas de los enlaces que debería tener un triglicérido.

Al aceite se le determinó el valor de acidez mediante el método AOCS Cd 3a-63 (AOCS, 1998) y el valor de saponificación con el método AOCS Cd 3-25 (AOCS, 1998). También se determinó su densidad mediante un picnómetro y la viscosidad mediante un viscosímetro por el método ASTM D445 (ASTM, 2000).

4.12 Obtención de biodiesel

Se realizó una pre-esterificación de los ácidos grasos libres presentes en el aceite llevando a cabo la reacción usando como catalizador ácido el H_2SO_4 a una concentración de 1.5 % en peso con relación al aceite (Cardeño *et al.*, 2010), una temperatura de 65° C y una relación molar de metanol:aceite de 5:1, dejando la reacción 1 h (Naik *et al.*, 2008). Posteriormente se realizó la transesterificación del resto del aceite con un catalizador alcalino. Se utilizó la misma relación molar de metanol:aceite, usando metóxido de sodio como catalizador.

4.13 Determinaciones al biodiesel

Al biodiesel se le determinó la densidad mediante un picnómetro y la viscosidad por medio de un viscosímetro por el método ASTM D445 (ASTM, 2000). Se le determinó el valor de acidez mediante el método ASTM D974 (ASTM, 2003) y el índice de yodo por el método EN 14111 (EN, 2003).

También se le determinó el perfil de ácidos grasos mediante una cromatografía de gases, en un cromatógrafo HP 6890 System GC Series, con una columna capilar de 30m×0.25mm×0.25mm y un detector de ionización de flama. El gas acarreador utilizado fue hidrógeno. Las temperaturas del detector y del inyector se programaron a 240° C. El biodiesel se inyectó diluido con n-hexano grado HPLC, la temperatura del horno se mantuvo 3 min a 150° C y posteriormente se usó una rampa de temperatura de 10° C/min hasta llegar a 220° C y se mantuvo esta temperatura por otros 3 min (Akbar *et al.*, 2009). El perfil de ácidos grasos se realizó en los laboratorios RIMSA (Estado de México, México).

4.14 Diseño estadístico

Con el objetivo de determinar si existían diferencias en los resultados de biomasa seca y contenido de lípidos una especie microalga en las 3 calidades de agua y posteriormente para identificar si existían diferencias e interacciones entre las diferentes especies de microalgas cultivadas en cada una de las 3 calidades de agua se realizó un análisis estadístico de los datos.

Para hacer el análisis estadístico de cada especie de microalga por separado se consideró un modelo completamente al azar, con un solo factor que corresponde a la calidad de agua, este factor contempla 3 niveles que son agua residual, agua tratada y fertilizante. Se tienen 9 tratamientos debido a que se realizó el cultivo por triplicado en cada diferente calidad de agua. Por lo tanto la hipótesis nula es que todos los tratamientos son iguales y la alternativa es que alguno de los tratamientos es diferente. Se utilizaron dos variables de respuesta, la concentración de biomasa seca y el contenido de lípidos de las microalgas

Por otro lado para comparar el crecimiento que tuvieron las 3 especies de microalgas en cada una de las 3 calidades de agua se tiene un modelo estadístico de 2 factores, uno es la especie de microalgas que tiene 3 niveles (*C. vulagris*, *S. acutus* y *A. maxima*) y el otro es la calidad de agua también con 3 niveles (agua residual, agua tratada y fertilizante). La variable de respuesta es el contenido de biomasa seca en los cultivos. En este caso se desean probar tres hipótesis nulas que son que no hay efecto de la interacción entre la calidad de agua y la especie de microalga, que los efectos de los tratamientos en cuanto a la calidad del agua son iguales y que los efectos de los tratamientos en cuanto a la especie de microalga son iguales. Las hipótesis alternativas serían que si hay efecto de la interacción entre la calidad de agua y la especie de microalga, que al menos alguno de los tratamientos respecto a la calidad del agua es diferente y que al menos uno de los tratamientos respecto a la especie de microalga es diferente. Se utilizó este mismo modelo estadístico para hacer la comparación de contenido de lípidos de las tres especies de microalgas, lo único que cambió fue la variable de respuesta que en este caso fue el porcentaje de lípidos.

En todos los casos se hicieron pruebas de Tukey para determinar la diferencia existente entre las medias de los tratamientos.

Se trabajó con un intervalo de confianza del 95 % ($\alpha=0.05$), tanto para los análisis de varianza como para las pruebas de Tukey.

Todos los análisis estadísticos se hicieron mediante el programa JMP versión 10.

Capítulo 5

Resultados y discusión

5 Resultados y discusión

5.1 Cultivo de las microalgas

Los cultivos de las microalgas se hicieron por separado para cada una de las 3 especies. Para cada especie se hizo un cultivo por triplicado para cada una de las 3 diferentes calidades de agua.

5.1.1 Cultivo de *Chlorella vulgaris*

En la Figura 6 se muestra una fotografía tomada por medio de un microscopio de los cultivos de *C. vulgaris*

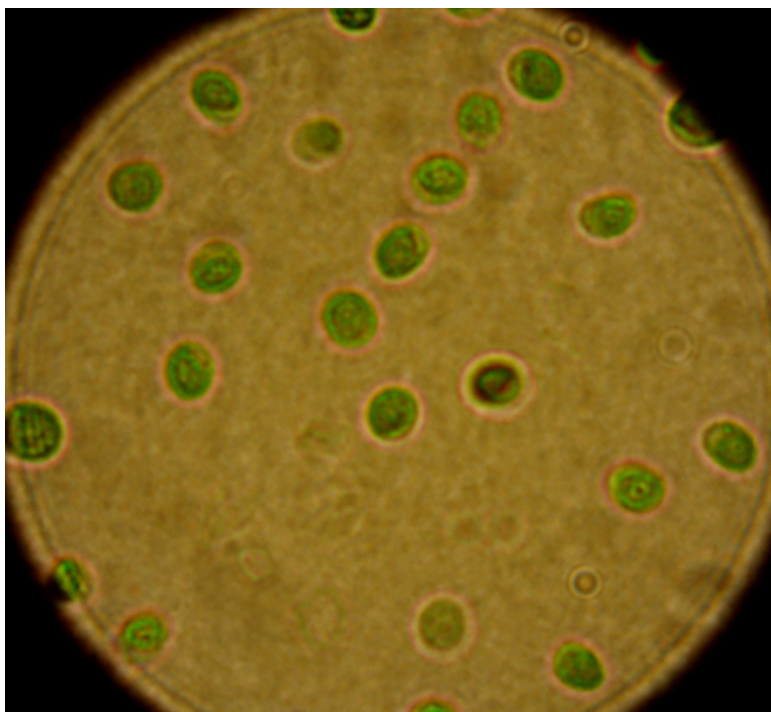


Figura 6. Fotografías de la microalga *C. vulgaris* a través de un microscopio

5.1.1.1 Crecimiento de *C. vulgaris*

La temperatura de los cultivos fue medida dos veces al día durante todos los días del cultivo, con un total de 18 mediciones, la temperatura promedio de los cultivos fue de $29.5 \pm 1.5^\circ \text{C}$.

En la Figura 7 se puede observar A) el cultivo en agua residual que es el que tiene el color más oscuro, B) el cultivo en fertilizante y C) el cultivo en agua tratada, el cual tiene el color más claro.

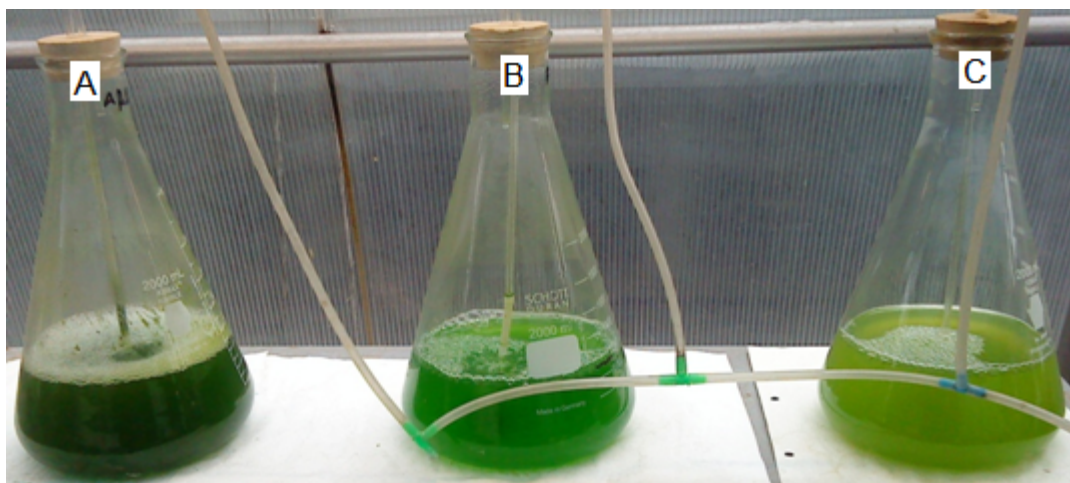


Figura 7. Cultivos de *C. vulgaris* en las 3 calidades de agua.

El oxígeno disuelto de cada uno de los cultivos fue medido diariamente y la variación de oxígeno disuelto en los cultivos se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Variación del oxígeno disuelto durante el cultivo de *C. vulgaris*

Día	Oxígeno disuelto (mg O ₂ /L)					
	Agua residual		Agua tratada		Fertilizante	
	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
0	4.61	0.22	5.19	0.05	5.19	0.06
1	5.55	0.32	5.10	0.03	5.10	0.03
2	5.96	0.16	5.81	0.08	5.81	0.08
3	6.45	0.21	6.00	0.20	6.00	0.20
6	6.47	0.30	6.31	0.39	6.31	0.40
7	6.81	0.14	6.66	0.11	6.66	0.12
8	7.38	0.08	7.04	0.07	7.04	0.08
9	6.11	0.08	7.58	0.08	7.58	0.08
13	5.93	0.08	6.32	0.30	6.32	0.30
15	-	-	-	-	5.96	0.07

En estos resultados se aprecia un aumento del oxígeno disuelto debido a la producción de oxígeno durante la fotosíntesis.

El pH de los cultivos fue medido diariamente, el pH inicial del agua con fertilizante fue de 6.53, el del agua residual fue de 8.63 y el del agua tratada de 8.69. La variación de pH durante los cultivos se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Variación del pH en los cultivos de *C. vulgaris*

Día	pH					
	Agua residual		Agua tratada		Fertilizante	
	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
0	8.57	0.01	8.70	0.01	6.48	0.01
1	8.56	0.05	8.70	0.07	6.75	0.20
2	8.74	0.07	8.56	0.11	6.84	0.07
3	8.44	0.06	8.85	0.13	7.05	0.04
6	8.65	0.09	9.06	0.06	7.19	0.04
7	9.15	0.08	9.15	0.05	7.17	0.15
8	9.38	0.20	8.85	0.09	7.46	0.24
9	8.96	0.06	8.63	0.09	6.74	0.14
13	8.71	0.14	8.44	0.10	5.95	0.09
15	-	-	-	-	5.93	0.04

Se puede observar que el pH de los cultivos tiende a subir hasta alcanzar un máximo alrededor del día 8 y posteriormente comienza a descender nuevamente. Esto puede deberse a que en el día 8 se alcanzó la fase estacionaria por lo cual las microalgas terminan su crecimiento exponencial y baja la actividad fotosintética con lo cual el pH ya no continúa elevándose.

Se mantuvieron los cultivos hasta que se llegó a la fase estacionaria de la curva de crecimiento tanto en el agua residual como en el agua tratada.

En la Tabla 3 se muestra el crecimiento de la microalga *C. vulgaris*, medido mediante espectrofotometría.

Tabla 3. Crecimiento de *C. vulgaris* en las tres calidades de agua medido por espectrofotometría.

Día	Absorbancia (680 nm)					
	Agua residual		Agua tratada		Fertilizante	
	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
0	0.149	0.022	0.232	0.020	0.277	0.011
1	0.361	0.027	0.482	0.021	0.469	0.024
2	0.575	0.080	0.540	0.045	0.584	0.024
3	0.982	0.041	0.681	0.005	0.737	0.033
6	1.672	0.065	0.806	0.033	1.730	0.077
7	1.803	0.039	0.854	0.021	1.778	0.081
8	2.037	0.050	1.045	0.031	1.879	0.042
9	2.064	0.073	1.056	0.014	1.909	0.054
13	1.890	0.313	1.012	0.004	2.357	0.060
15	-	-	-	-	2.746	0.053

Estos valores se graficaron para obtener la curva de crecimiento de *C. vulgaris* en las 3 calidades de agua.

En la Figura 8 puede observarse que a partir del día 10 se alcanza la fase estacionaria para esta microalga tanto en el cultivo en agua residual como en el cultivo en agua tratada, sin embargo en el cultivo en fertilizante el crecimiento continúa en la fase logarítmica debido a que había una mayor cantidad de nutrientes.

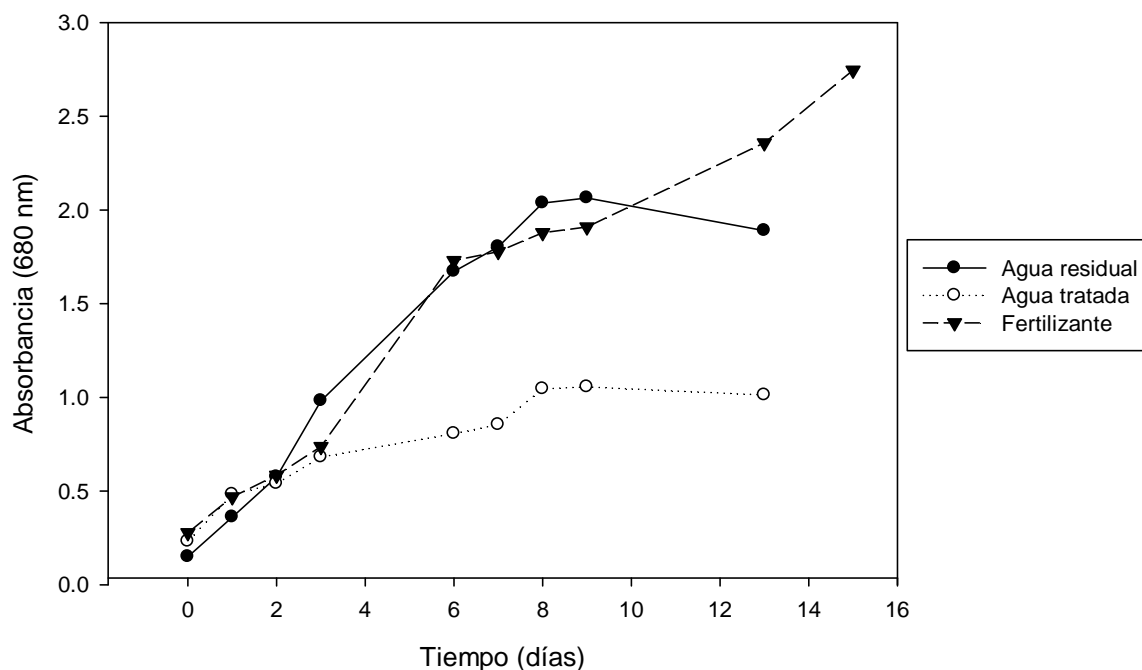


Figura 8. Curvas de crecimiento de *C. vulgaris* en las 3 calidades de agua.

El crecimiento también fue medido mediante la determinación del contenido de biomasa seca en los cultivos. En el caso del agua residual los resultados de biomasa seca tuvieron que corregirse debido a que esta agua contenía sólidos suspendidos. Se realizó la cuantificación de sólidos suspendidos por triplicado obteniéndose una concentración de 147.29 ± 2.98 mg/L. Las concentraciones de biomasa seca para las 3 calidades de agua se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Contenido de biomasa seca de *C. vulgaris* en los cultivos en las 3 calidades de agua.

Día	Biomasa seca (mg/L)					
	Agua residual		Agua tratada		Fertilizante	
	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
0	128.90	3.87	127.78	0.77	129.40	0.88
1	147.96	2.05	176.19	1.02	125.00	1.07
2	171.76	2.45	242.86	0.30	142.86	1.12
3	436.04	1.55	276.19	0.75	176.47	0.64
6	556.16	1.34	400.00	1.05	438.10	1.15
7	628.90	1.45	514.29	0.94	493.33	1.94
8	763.06	0.96	640.00	1.80	540.00	1.26
9	976.86	1.52	686.67	1.19	560.00	10.58
13	894.09	31.17	706.67	2.59	753.33	1.07

Los resultados obtenidos fueron graficados para obtener las curvas de crecimiento pero esta vez en función de la biomasa seca.

En la Figura 9 nuevamente se observa que al llegar la microalga a su fase estacionaria en las aguas residual y tratada, continúa su crecimiento en el agua con fertilizante debido a un mayor contenido de nutrientes.

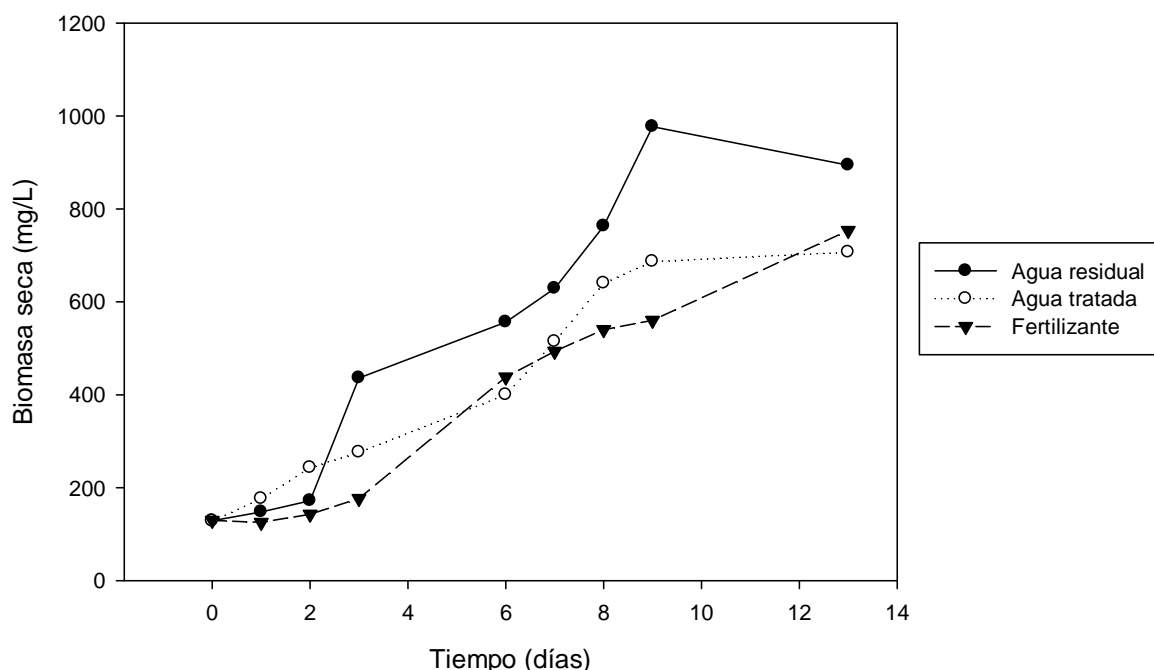


Figura 9. Curvas de crecimiento de *C. vulgaris* en las 3 calidades de agua en función de la biomasa seca.

Una vez que los cultivos se detuvieron se extrajo toda la biomasa presente por centrifugación obteniéndose los resultados mostrados en la Tabla 5.

Tabla 5. Contenido de biomasa seca en g/L en los diferentes cultivos de *C. vulgaris*

Calidad de agua	Promedio	Desviación estándar
Agua residual	1.149	0.006
Agua tratada	0.652	0.034
Fertilizante	0.904	0.030

Con los resultados obtenidos se puede ver que el cultivo de *C. vulgaris* en el agua residual produjo una cantidad de biomasa seca (1.149 g/L) mayor que en el fertilizante (0.904 g/L) y en el agua tratada (0.652 g/L), siendo en esta última donde se produjo la menor cantidad de biomasa seca debido al menor contenido de nutrientes. El mayor contenido de biomasa en el agua residual puede deberse a un crecimiento mixótrofo que no se da en el fertilizante por no haber una fuente de carbono orgánico (Sakthivel *et al.*, 2011).

A continuación se realizó un análisis de varianza del crecimiento de esta microalga en las tres calidades de agua comparando el contenido de biomasa seca en g/L obtenido en cada una de las tres calidades de agua. Los resultados del análisis de varianza se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Análisis de varianza de la biomasa seca de *C. vulgaris*

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada
Modelo	2	0.37053800	0.185269	265.0486
Error	6	0.00419100	0.000699	Probabilidad > F
Total	8	0.37473200		<.0001

Debido a que la probabilidad de que la F calculada sea mayor a la F de tablas es menor a 0.0001 y se tiene un nivel de significancia del 5%, entonces se rechaza la hipótesis nula, por lo que el crecimiento de la microalga no es igual en las 3 calidades de agua.

Se realizó una prueba de Tukey a las medias de los tratamientos obteniéndose los resultados mostrados en la Tabla 7.

Tabla 7. Prueba de Tukey para la biomasa seca en los cultivos de *C. vulgaris*

Nivel		Media
Agua residual	A	1.149
Fertilizante	B	0.904
Agua tratada	C	0.652

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes. ($\alpha=0.050$).

Como se puede ver en los resultados de la Tabla 7 todos los tratamientos son significativamente diferentes con un nivel de significancia del 5%.

5.1.1.2 Acumulación de lípidos en los cultivos de *C. vulgaris*

Una vez que la biomasa fue extraída de los medios de cultivo y fue secada se realizó la extracción de lípidos de la biomasa. En la Tabla 8 se muestran los resultados del contenido de lípidos contenidos en la biomasa de *C. vulgaris* obtenida en cada una de las tres calidades de agua.

Tabla 8. Porcentaje de lípidos en la biomasa seca de *C. vulgaris*

Calidad de agua	Promedio	Desviación estándar
Agua residual	22.38	1.16
Agua tratada	12.29	0.88
Fertilizante	16.55	0.90

En los resultados de la Tabla 8 se puede apreciar que la microalga tuvo un contenido de lípidos en el cultivo en agua residual de 22.4 %, el cual es mayor que en las otras dos calidades de agua, esto puede deberse a que el crecimiento de *C. vulgaris* en este cultivo fue heterótrofo por lo que acumuló un mayor contenido de lípidos. En el agua tratada se obtuvo un 12.3 % de lípidos, en este cultivo fue donde se obtuvo el menor contenido de lípidos, posiblemente debido a que se tenía un menor contenido de nutrientes.

En la bibliografía se reporta un contenido de lípidos para *C. vulgaris* de 18.4 a 19.2 % con una productividad de biomasa de 0.17 a 0.20 g/L d (Rodolfi *et al.*, 2009) y en otro estudio se reporta un contenido de lípidos de 42 % con una concentración de biomasa de 0.69 g/L (Feng *et al.*, 2011), en ambos se realizó el cultivo en reactores a nivel laboratorio con condiciones controladas, en el primero con un medio de cultivo enriquecido y en el segundo con agua residual artificial. En la primera referencia el contenido de lípidos es menor al obtenido en este trabajo en los cultivos en agua residual (22.4 %), sin embargo la productividad de biomasa es mucho mayor a la obtenida (0.09 g/L d). Aunque en el segundo estudio el contenido de lípidos obtenido es mucho mayor que el que se obtuvo en este trabajo, el contenido de biomasa es mucho menor que el que se obtuvo en el presente trabajo (1.149 g/L), con lo cual se obtiene un contenido muy similar de lípidos en ambos trabajos (alrededor de 0.27 g/L).

Se realizó un análisis de varianza del contenido de lípidos de esta microalga en las tres calidades de agua para ver si existía diferencia significativa. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Análisis de varianza del contenido de lípidos de *C. vulgaris*

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada
Modelo	2	154.23549	77.1177	80.2604
Error	6	5.76507	0.9608	Probabilidad > F
Total	8	160.00056		<.0001

Debido a que la probabilidad que la F calculada sea mayor a la F de tablas es menor a 0.0001, entonces el contenido de lípidos de *C. vulgaris* no es igual en los cultivos para las 3 diferentes calidades de agua.

Se realizó una prueba de Tukey a las medias de los tratamientos obteniéndose los resultados que se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10. Prueba de Tukey para el contenido de lípidos de *C. vulgaris*

Nivel	Media
Agua residual	A 22.38
Fertilizante	B 16.55
Agua tratada	C 12.28

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes. ($\alpha=0.05$).

Mediante el resultado obtenido en la Tabla 10 se determinó que el contenido de lípidos es significativamente diferente en los tres cultivos.

5.1.1.3 Determinaciones fisicoquímicas a las calidades de agua

Se determinó el contenido de nutrientes en las tres calidades de agua antes y después del cultivo, para determinar la remoción de los mismos, midiéndose ortofosfatos, nitrógeno como nitratos, nitrógeno amoniacal y materia carbonosa como DQO. Estos resultados se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Contenido de nutrientes en las tres calidades de agua antes y después del cultivo.

		Agua residual		Agua tratada		Fertilizante	
		Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
Ortofosfatos (mg/L)	Antes del cultivo	9.1	0.7	4.8	0.2	124.7	3.1
	Después del cultivo	2.0	0.1	2.5	0.2	82.3	1.4
Nitratos (mg/L)	Antes del cultivo	10.9	1.5	4.7	0.2	93.7	2.8
	Después del cultivo	3.7	0.4	2.0	0.2	75.3	2.0
Nitrógeno orgánico y amoniacal (mg/L)	Antes del cultivo	39.5	2.2	23.6	1.7	207.0	3.0
	Después del cultivo	3.3	0.7	1.7	0.4	117.9	3.4
DQO (mg O ₂ /L)	Antes del cultivo	568.9	10.7	235.6	7.0	253.1	3.5
	Después del cultivo	197.9	2.5	111.4	4.7	113.4	3.5

Con los resultados obtenidos en la Tabla 11 se calculó el porcentaje de remoción para cada uno de los nutrientes en cada una de las tres calidades de agua, los resultados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Porcentaje de remoción de nutrientes en los cultivos de *C. vulgaris*

	Porcentaje de remoción		
	Agua residual	Agua tratada	Fertilizante
Ortofosfatos (mg/L)	78.4	48.5	34.0
Nitratos (mg/L)	66.5	58.3	19.7
Nitrógeno orgánico y amoniacal (mg/L)	91.5	93.0	43.0
DQO (mg O₂/L)	65.2	52.7	55.2

En los cultivos en fertilizante siempre se tuvieron porcentajes de remoción inferiores a 50 % para fosfato, nitratos y nitrógeno orgánico y amoniacal, esto es debido a que los cultivos se interrumpieron cuando la microalga llegó a su fase estacionaria en los cultivos en agua residual y en agua tratada, pero seguía en fase logarítmica en el cultivo en fertilizante, esto se debió a que se quería hacer la comparación de la biomasa obtenida y el contenido de lípidos en las tres calidades de agua en el mismo tiempo de cultivo. Esto quiere decir que la microalga pudo haber seguido creciendo en el cultivo con fertilizante habiendo alcanzado remociones mayores de nutrientes.

En cuanto al fósforo, se alcanzó una remoción mayor en el agua residual debido a que tenía una mayor cantidad de carbono y creció más con lo cual consumió más fosfatos. Esto mismo ocurrió con la remoción de los nitratos, aunque la remoción en el agua residual no fue mucho mayor que en el agua tratada. Las remociones de nitrógeno orgánico y amoniacal en el agua residual y en el agua tratada fueron muy similares alcanzando una remoción superior al 90 % (Tabla 12)

El fertilizante no contiene materia carbonosa por lo que la DQO obtenida para este medio de cultivo es debida a los fosfatos y otras interferencias, por lo que la remoción de la DQO se debe a la remoción de otros nutrientes como los fosfatos y el nitrógeno. La remoción de la DQO en el agua residual fue ligeramente superior a la alcanzada en el agua tratada (Tabla 12).

5.1.2 Cultivo de *Scenedesmus acutus*

Se fotografiaron los cultivos de *S. acutus* mediante un microscopio, las fotografías se muestran en la Figura 10.

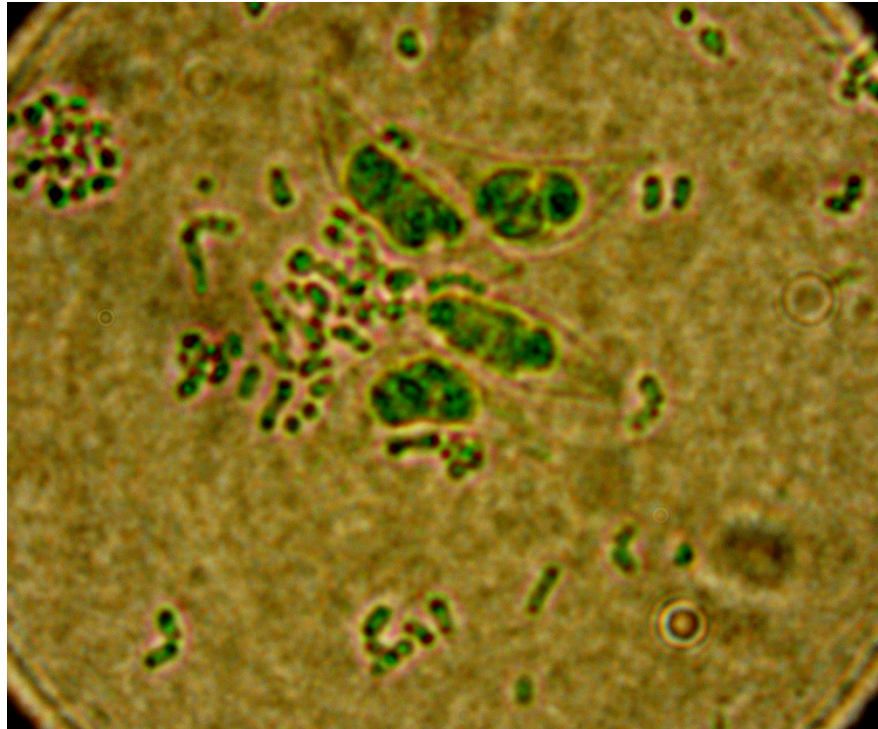


Figura 10. Fotografías de la microalga *S. acutus* a través de un microscopio.

5.1.2.1 Crecimiento de *S. acutus*

La temperatura de los cultivos se midió dos veces al día durante todos los días del cultivo, haciéndose un total de 26 mediciones, la temperatura promedio de los cultivos fue de $26.5 \pm 3.1^\circ \text{C}$.

En la Figura 11 puede observarse A) el cultivo en agua tratada, el cual tiene el color más claro B) el cultivo en fertilizante y C) el cultivo en agua residual, ambos cultivos con un color muy similar.

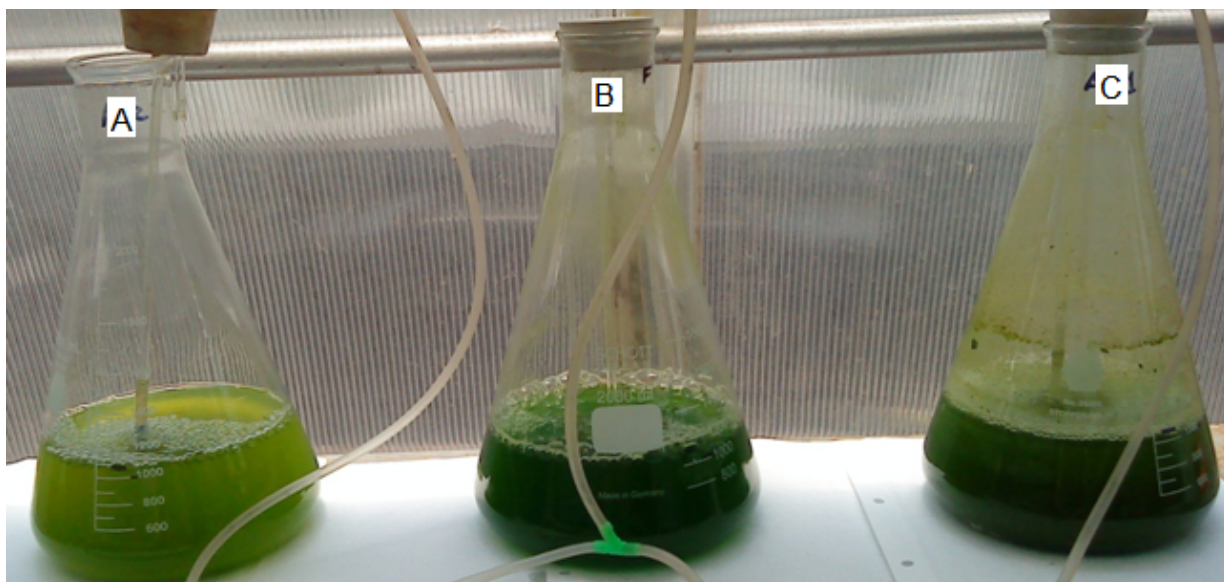


Figura 11. Cultivos de *S. acutus* en las 3 calidades de agua.

El oxígeno disuelto en los cultivos fue medido diariamente, en la Tabla 13 se muestra la variación del oxígeno disuelto en cada una de las 3 calidades de agua.

Tabla 13. Variación del oxígeno disuelto en los cultivos de *S. acutus*

Día	Oxígeno disuelto (mg O ₂ /L)					
	Agua residual		Agua tratada		Fertilizante	
	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
0	4.73	0.10	4.76	0.30	4.97	0.09
1	5.65	0.24	5.55	0.25	5.88	0.05
2	6.50	0.22	5.83	0.10	6.75	0.23
3	6.87	0.06	6.56	0.24	6.87	0.05
4	6.91	0.08	6.88	0.10	6.92	0.09
7	7.12	0.09	7.19	0.15	6.98	0.08
8	7.01	0.10	7.15	0.15	7.16	0.11
9	6.92	0.10	6.93	0.01	7.16	0.12
10	6.84	0.09	6.80	0.08	6.93	0.11
11	6.83	0.11	6.94	0.10	7.26	0.10
14	7.12	0.07	6.84	0.07	6.80	0.15
15	6.82	0.11	6.69	0.19	6.72	0.23
16	6.84	0.08	6.60	0.25	6.89	0.09

En los resultados de la Tabla 13 se muestra un aumento de la concentración de oxígeno disuelto debida a la producción de oxígeno durante la fotosíntesis.

El pH de los cultivos también se midió diariamente, el pH inicial del agua con fertilizante fue de 6.13, el pH inicial del agua residual fue de 8.33 y el pH inicial del agua tratada fue de 8.87. La variación de pH durante los cultivos se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14. Variación de pH en los cultivos de *S. acutus*

Día	pH					
	Agua residual		Agua tratada		Fertilizante	
	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
0	8.33	0.01	8.88	0.01	6.13	0.02
1	8.27	0.02	8.62	0.04	6.08	0.01
2	8.64	0.03	9.33	0.07	5.90	0.03
3	8.86	0.12	9.25	0.11	5.96	0.05
4	8.70	0.08	8.51	0.11	6.04	0.06
7	9.03	0.07	8.64	0.11	5.89	0.30
8	8.30	0.11	8.17	0.09	5.96	0.88
9	8.83	0.10	8.64	0.07	6.03	0.09
10	9.10	0.12	8.58	0.18	6.20	0.10
11	8.23	0.12	8.03	0.18	6.35	0.08
14	8.51	0.23	8.18	0.06	6.95	0.06
15	8.76	0.76	8.04	0.30	7.17	0.14
16	7.84	0.37	7.78	0.46	7.32	0.16

Con los resultados de la Tabla 14 se observa que en los cultivos en agua residual y agua tratada existe un aumento del pH hasta alrededor del día 10 donde el pH llega a un valor máximo y posteriormente disminuye, esto puede deberse a que la microalga llega a su fase estacionaria por lo que la actividad fotosintética disminuye y el pH ya no continúa elevándose. En el caso del fertilizante el valor del pH continúa aumentando durante todo el crecimiento ya que en este cultivo no se alcanzó la fase estacionaria.

Los cultivos se mantuvieron hasta que se llegó a la fase estacionaria de la curva de crecimiento tanto en el agua residual como en el agua tratada.

En la Tabla 15 se muestra el crecimiento de *S. acutus*, medido por espectrofotometría, en los cultivos en las tres calidades de agua.

Tabla 15. Determinación del crecimiento de *S. acutus* mediante espectrofotometría.

Día	Absorbancia (680 nm)					
	Agua residual		Agua tratada		Fertilizante	
	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
0	0.127	0.011	0.163	0.002	0.171	0.010
1	0.092	0.010	0.270	0.008	0.244	0.022
2	0.566	0.041	0.655	0.045	0.498	0.048
3	0.796	0.014	0.642	0.089	0.680	0.043
4	1.006	0.007	0.667	0.137	0.842	0.016
7	1.632	0.046	0.991	0.190	1.391	0.088
8	1.668	0.085	0.986	0.162	1.422	0.148
9	1.788	0.055	1.027	0.119	1.563	0.128
10	1.829	0.082	1.091	0.137	1.630	0.147
11	1.869	0.151	1.122	0.177	1.689	0.186
14	1.936	0.207	1.319	0.245	1.802	0.291
15	2.248	0.134	1.898	0.165	1.929	0.232
16	2.178	0.158	1.957	0.103	1.926	0.246

Se graficaron los resultados obtenidos para el crecimiento medido por espectrofotometría, para obtener las curvas de crecimiento.

En la Figura 12 se puede observar que todos los cultivos llegaron a su fase estacionaria alrededor de los 15 días de cultivo, teniendo el agua residual y el fertilizante curvas de crecimiento similares.

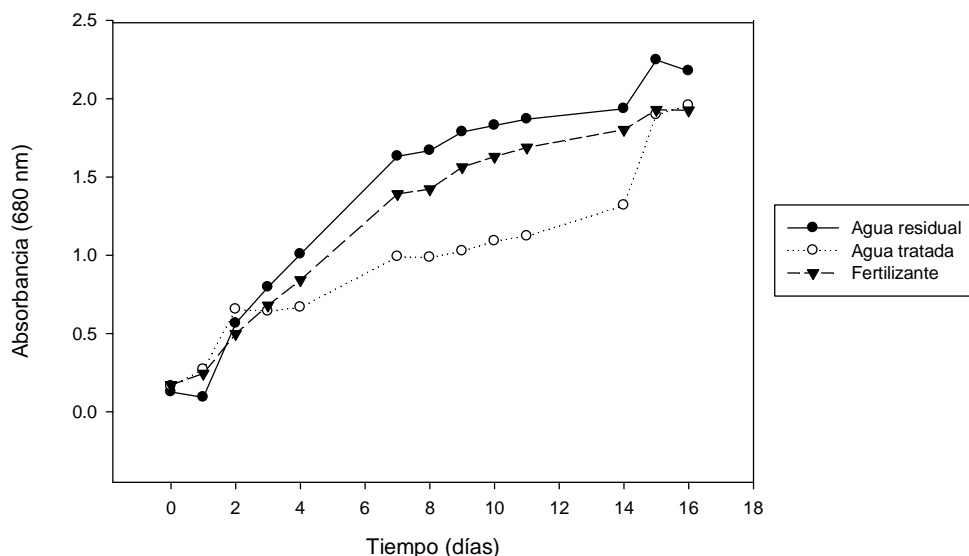


Figura 12. Curvas de crecimiento medido por espectrofotometría de *S. acutus*

El crecimiento en los cultivos también fue medido en cuanto a la concentración de biomasa seca presente. Para los cultivos de agua residual se determinó el contenido de sólidos suspendidos totales para poder corregir el valor de biomasa seca. Se cuantificó la concentración de sólidos suspendidos por triplicado obteniéndose una concentración de 120.1 ± 11.9 mg/L.

En la Tabla 16 se muestran los resultados del crecimiento de *S. acutus* como concentración de biomasa seca en las 3 diferentes calidades de agua.

Tabla 16. Contenido de biomasa seca de *S. acutus* en las 3 calidades de agua.

Día	mg biomasa/L					
	Agua residual		Agua tratada		Fertilizante	
	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
0	136.20	0.90	100.00	0.98	56.97	0.32
1	132.34	0.86	171.43	0.67	76.13	0.96
2	232.23	1.20	246.51	1.42	156.12	0.78
3	241.23	1.32	280.00	1.99	176.86	1.46
4	380.54	3.05	295.24	3.13	213.98	1.44
7	556.31	0.98	309.21	2.95	474.04	4.27
8	542.75	2.16	344.45	3.28	532.45	8.58
9	585.86	2.41	362.92	2.54	606.04	6.70
10	619.60	2.08	370.37	2.72	714.25	6.19
11	604.90	2.38	404.65	1.57	769.52	8.06
14	726.30	2.72	741.72	3.59	819.70	13.15
15	830.17	3.23	759.33	2.60	871.46	5.82
16	984.68	1.39	760.33	2.88	901.66	3.15

Se graficaron los resultados de concentración de biomasa seca en el cultivo obteniéndose la siguiente gráfica.

En la curva de crecimiento de la Figura 13 no se puede apreciar que el cultivo en agua residual haya llegado a su fase estacionaria, lo que si se observa en el cultivo en agua tratada y en fertilizante.

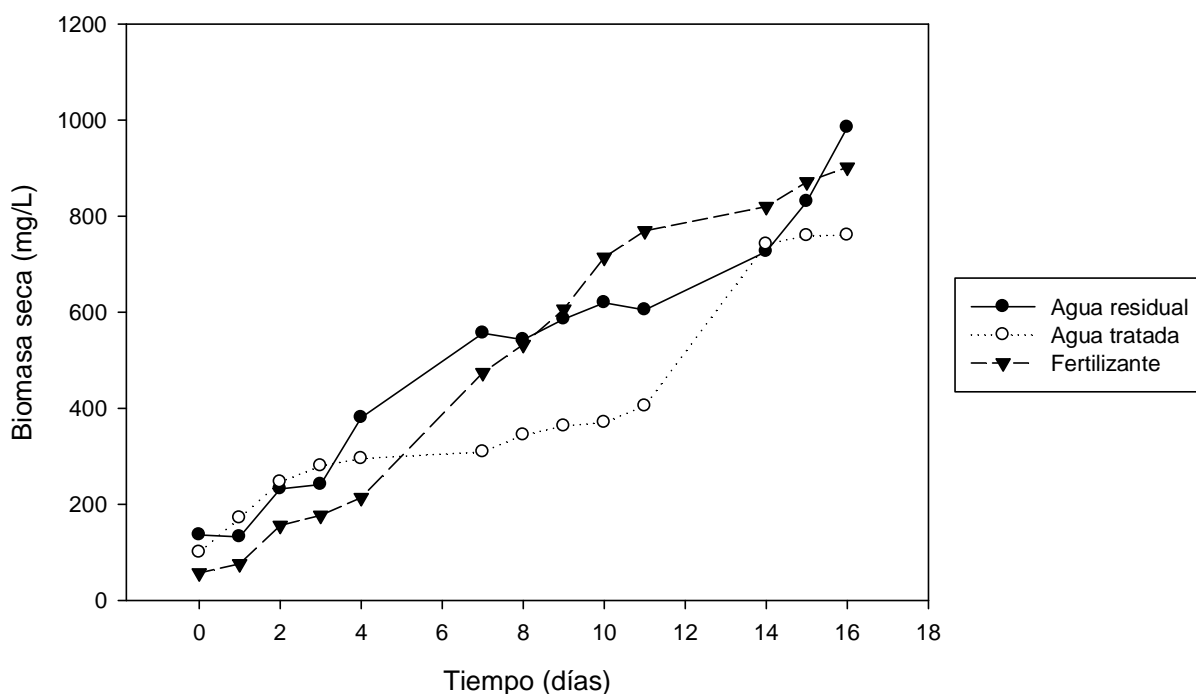


Figura 13. Curvas de crecimiento medido como biomasa seca en los cultivos de *S. acutus*

Una vez extraída la biomasa de los cultivos en las tres calidades de agua se obtuvo la cantidad de biomasa seca mostrada en la Tabla 17.

Tabla 17. Contenido de biomasa seca en g/L en los cultivos de *S. acutus*

Calidad de agua	Promedio	Desviación estándar
Agua residual	1.279	0.010
Agua tratada	0.767	0.011
Fertilizante	0.913	0.014

En los resultados mostrados en la Tabla 17 se puede ver que en los cultivos en agua residual se obtuvo el mayor contenido de biomasa seca (1.279 g/L), el menor contenido se obtuvo en los cultivos en agua tratada (0.767 g/L).

Se realizó un análisis de varianza con los datos de biomasa seca obtenidos para determinar si había diferencia significativa en los resultados obtenidos, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Análisis de varianza para la biomasa seca en los cultivos de *S. acutus*.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada
Modelo	2	0.41800156	0.209001	1491.679
Error	6	0.00084067	0.000140	Probabilidad > F
Total	8	0.41884222		<.0001

En la Tabla 18 se obtuvo una probabilidad de que la F calculada sea mayor a la F de tablas menor a 0.0001 por lo que el crecimiento de la microalga es diferente al menos en alguna las 3 calidades de agua.

Para determinar la diferencia entre los tratamientos se realizó una prueba de Tukey para los tres diferentes tratamientos, mostrándose los resultados en la Tabla 19.

Tabla 19. Prueba de Tukey para la biomasa seca de *S. acutus*.

	Nivel	Media
Agua residual	A	1.279
Fertilizante	B	0.913
Agua tratada	C	0.767

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes. ($\alpha=0.050$).

Con esta prueba se puede determinar que la biomasa obtenida en los tres diferentes cultivos es significativamente diferente.

Al igual que en los resultados obtenidos para *C. vulgaris*, se obtuvo una mayor cantidad de biomasa en el agua residual que en el fertilizante y el agua tratada, esto puede deberse a que en el agua residual la microalga crece tanto de forma autótrofa como heterótrofa, en cambio en el fertilizante solamente crece de manera autótrofa debido a que la única fuente de carbono es el dióxido de carbono. En el agua tratada fue donde menos cantidad de biomasa se obtuvo debido a que es el medio de cultivo con menor cantidad de nutrientes.

5.1.2.2 Acumulación de lípidos en los cultivos de *S. acutus*

Una vez seca la biomasa se llevó a cabo la extracción de los lípidos, el contenido de lípidos para cada una de las 3 calidades de agua se muestra en la Tabla 20.

Tabla 20. Porcentaje de lípidos de *S. acutus* cultivada en las 3 calidades de agua.

Calidad de agua	Promedio	Desviación estándar
Agua residual	28.34	1.14
Agua tratada	12.72	1.17
Fertilizante	21.83	1.51

En este caso se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en los cultivos de *C. vulgaris*, en donde en el cultivo en agua residual fue donde se obtuvo una mayor cantidad de lípidos (21.8 %), probablemente debido a que la microalga tiene un crecimiento tanto autótrofo como heterótrofo con lo cual acumula una mayor cantidad de lípidos. En el agua tratada fue donde se obtuvo un menor contenido de lípidos (12.72 %).

En la bibliografía está reportado un contenido de lípidos de entre 20 y 21 % para *Scenedesmus* sp. (Gong y Jiang, 2011), en otro trabajo está reportado un contenido de 19.6 a 21.1 % (Rodolfi *et al.*, 2009), en cultivos a nivel laboratorio y con condiciones controladas, estos contenidos de lípidos son similares a los obtenidos en los cultivos en fertilizante en este trabajo pero menores a los obtenidos en los cultivos en agua residual. En un trabajo donde los cultivos se hicieron en agua residual artificial se obtuvo un contenido de lípidos de 12.8 % (Rawat *et al.*, 2010), similar al obtenido en este trabajo para los cultivos en agua tratada, pero bastante más bajos que el contenido obtenido para los cultivos en agua residual.

Para ver si había diferencia significativa en el contenido de lípidos de *S. acutus* cultivada en cada una de las 3 calidades de agua se realizó un análisis de varianza, los resultados se presentan en la Tabla 21.

Tabla 21. Análisis de varianza del contenido de lípidos de *S. acutus*

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada
Modelo	2	368.86220	184.431	111.7945
Error	6	9.89840	1.650	Probabilidad > F
Total	8	378.76060		<.0001

En la Tabla 21 se observa que la probabilidad de que la F calculada sea mayor a la F de tablas es menor a 0.0001, esto indica que el crecimiento de la microalga es diferente en al menos una las 3 calidades de agua.

Para determinar la diferencia entre las medias de los tratamientos se realizó una prueba de Tukey para los tres diferentes tratamientos. Los resultados de esta prueba se encuentran en la Tabla 22.

Tabla 22. Prueba de Tukey para el contenido de lípidos de *S. acutus*

	Nivel	Media
Agua residual	A	28.34
Fertilizante	B	21.83
Agua tratada	C	12.72

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes. ($\alpha=0.050$).

En los resultados de la Tabla 22 se puede ver que el contenido de lípidos es significativamente diferente en cada una de las 3 calidades de agua.

5.1.2.3 Determinaciones fisicoquímicas a las calidades de agua

Se realizó la determinación de ortofosfatos, nitratos, demanda química de oxígeno y nitrógeno orgánico y amoniacal a las tres distintas calidades de agua antes y después del cultivo de esta microalga para determinar el contenido de nutrientes en las diferentes calidades de agua y la remoción de los mismos. Los resultados se muestran en la Tabla 23.

Tabla 23. Contenido de nutrientes en las 3 calidades de agua antes y después del cultivo de *S. acutus*

		Agua residual		Agua tratada		Fertilizante	
		Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
Ortofosfatos (mg/L)	Antes del cultivo	9.5	0.2	7.3	0.3	122.1	0.2
	Después del cultivo	3.2	0.4	2.6	0.1	109.1	1.9
Nitratos (mg/L)	Antes del cultivo	13.4	0.4	5.3	0.2	97.6	1.2
	Después del cultivo	3.9	0.3	3.0	0.3	67.6	2.3
Nitrógeno orgánico y amoniacal (mg/L)	Antes del cultivo	49.4	1.3	27.7	2.3	207.2	1.8
	Después del cultivo	3.2	2.3	2.1	0.4	59.8	3.2
DQO (mg O₂/L)	Antes del cultivo	782.8	52.9	273.5	10.7	287.5	57.0
	Después del cultivo	177.9	7.0	141.8	11.2	182.6	7.3

Con los resultados mostrados en la Tabla 23 se calcularon los porcentajes de remoción de cada uno de estos nutrientes, los cuales se muestran en la Tabla 24.

Tabla 24. Porcentajes de remoción de nutrientes en las 3 calidades de agua.

	Porcentaje de remoción		
	Agua residual	Agua tratada	Fertilizante
Ortofosfatos (mg/L)	66.2	64.3	10.6
Nitratos (mg/L)	71.1	42.9	30.7
Nitrógeno orgánico y amoniacal (mg/L)	93.6	92.4	71.1
DQO (mg O₂/L)	77.3	48.2	36.5

En los resultados de la Tabla 24 se puede observar que pasa algo similar a lo ocurrido con los cultivos de *C. vulgaris*, las remociones en el fertilizante son inferiores al 50 % para fosfatos y nitratos pero esta vez la remoción de la DQO es menor a la del nitrógeno orgánico y amoniacal. La baja remoción de nutrientes nuevamente se debe a que los cultivos fueron detenidos cuando los cultivos en fertilizante seguían en fase logarítmica para poder comparar los resultados obtenidos en los mismos tiempos de cultivo en las 3 calidades de agua.

Para el fósforo se obtuvieron remociones muy similares tanto para el agua residual como para el agua tratada. Para el nitrógeno orgánico y amoniacal nuevamente se obtuvieron remociones muy similares en el agua tratada y residual que alcanzaron más del 90 %.

En el agua tratada las remociones de nitratos y de DQO fueron menores al 50 %.

Igual que en el caso anterior, el fertilizante no tiene materia carbonosa por lo que la lectura obtenida para la DQO es debida a otros compuestos (nitrógeno y fósforo).

En el caso del agua residual hay una alta remoción de la DQO lo que puede ser un indicio de que la microalga tuvo un crecimiento heterótrofo.

5.1.3 Cultivo de *Arthrospira maxima*

Fueron tomadas fotografías de los cultivos de *A. maxima* mediante un microscopio, las cuales se muestran en la Figura 14.



Figura 14. Fotografías de la microalga *A. máxima* a través de un microscopio.

5.1.3.1 Crecimiento de *A. maxima*.

La temperatura de los cultivos se tomó diariamente dos veces al día durante los cultivos, el total fue de 20 mediciones. La temperatura promedio de los cultivos fue de $27.6 \pm 2.9^\circ \text{C}$.

En la Figura 15 puede observarse A) el cultivo en agua tratada, B) el cultivo en agua residual y C) el cultivo en fertilizante. El cultivo en agua residual es el que tiene el color más oscuro y el agua tratada el más claro aunque no es mucho más claro que el cultivo en fertilizante.

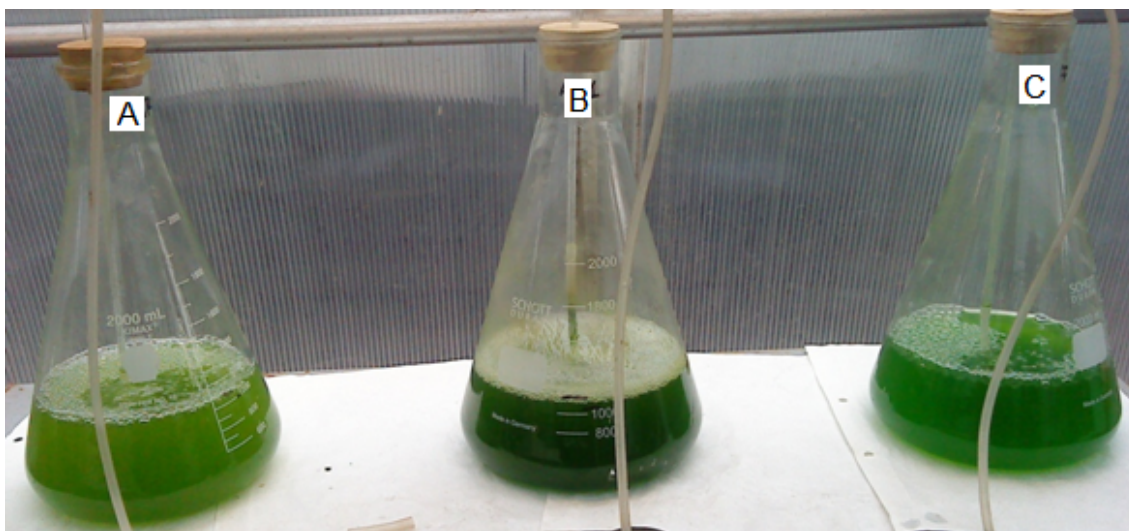


Figura 15. Cultivos de *A. maxima* en las 3 calidades de agua.

En la Tabla 25 se muestra la variación del contenido de oxígeno disuelto en los cultivos de esta microalga.

Tabla 25. Oxígeno disuelto en los cultivos de *A. maxima*.

Día	Oxígeno disuelto (mg O ₂ /L)					
	Agua residual		Agua tratada		Fertilizante	
	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
0	4.68	0.10	4.59	0.24	5.01	0.07
1	5.63	0.22	5.84	0.09	5.98	0.17
2	6.38	0.45	6.65	0.20	6.46	0.16
3	6.89	0.06	6.92	0.07	6.77	0.19
4	6.83	0.05	6.86	0.11	7.00	0.16
7	7.37	0.06	6.86	0.02	6.97	0.15
8	6.87	0.06	7.06	0.05	6.93	0.11
9	6.75	0.11	7.26	0.05	6.91	0.19
11	6.88	0.07	7.06	0.03	6.92	0.07
14	6.40	0.11	6.94	0.03	7.17	0.10

El aumento de la concentración de oxígeno disuelto que puede observarse en la Tabla 25 es debido a la producción de oxígeno durante la fotosíntesis.

En la Tabla 26 se muestra la variación de pH en los cultivos de *A. maxima* en las 3 calidades de agua. El pH inicial del agua con fertilizante fue de 5.96, el pH inicial del agua residual fue de 7.95 y el pH inicial del agua tratada fue de 8.56. La variación de pH durante los cultivos se muestra en la Tabla 26.

Tabla 26. Variación de pH en los cultivos de *A. maxima* en las 3 calidades de agua.

Día	pH					
	Agua residual		Agua tratada		Fertilizante	
	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
0	8.36	0.00	8.68	0.02	6.53	0.03
1	8.41	0.02	8.66	0.02	6.63	0.03
2	8.55	0.07	8.95	0.53	6.56	0.04
3	8.80	0.11	9.03	0.61	6.55	0.05
4	8.75	0.41	9.00	0.77	6.52	0.05
7	8.85	0.38	8.60	0.06	6.42	0.09
8	9.39	0.45	8.81	0.23	6.47	0.10
9	10.31	0.10	9.90	0.21	6.50	0.16
11	8.44	0.06	8.34	0.39	6.62	0.12
14	7.76	0.09	7.96	0.18	6.63	0.06

En los resultados de la Tabla 26 se puede ver como en el caso de las otras dos microalgas que existe un aumento del pH, en los cultivos en agua residual y en agua tratada, el pH llega a un valor máximo alrededor del día 9 y posteriormente disminuye. En el caso del fertilizante el pH continúa aumentando ya que no hay disminución de la actividad fotosintética por no alcanzarse en este cultivo la fase estacionaria.

En la Tabla 27 se muestra el crecimiento de los cultivos de esta microalga medido por espectrofotometría en las tres calidades de agua.

Tabla 27. Crecimiento de *A. maxima* medido por espectrofotometría en las 3 calidades de agua.

Día	Absorbancia (680 nm)					
	Agua residual		Agua tratada		Fertilizante	
	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
0	0.106	0.024	0.174	0.004	0.166	0.003
1	0.175	0.036	0.314	0.017	0.201	0.011
2	0.382	0.036	0.549	0.038	0.363	0.013
3	0.750	0.096	0.766	0.121	0.520	0.054
4	0.961	0.124	0.848	0.168	0.651	0.071
7	1.352	0.173	1.337	0.232	1.183	0.173
8	1.537	0.179	1.446	0.213	1.317	0.232
9	1.774	0.145	1.588	0.303	1.545	0.272
11	1.784	0.148	1.550	0.352	1.654	0.312
14	1.881	0.031	1.677	0.324	2.049	0.394

Con el fin de obtener las curvas de crecimiento de esta microalga, los resultados de la Tabla 27 fueron graficados

En la Figura 16 se puede observar que la microalga *A. maxima* llegó a su fase estacionaria alrededor del día 9 en los cultivos de agua residual y agua tratada, sin embargo para el cultivo en fertilizante la microalga seguía en su fase de crecimiento.

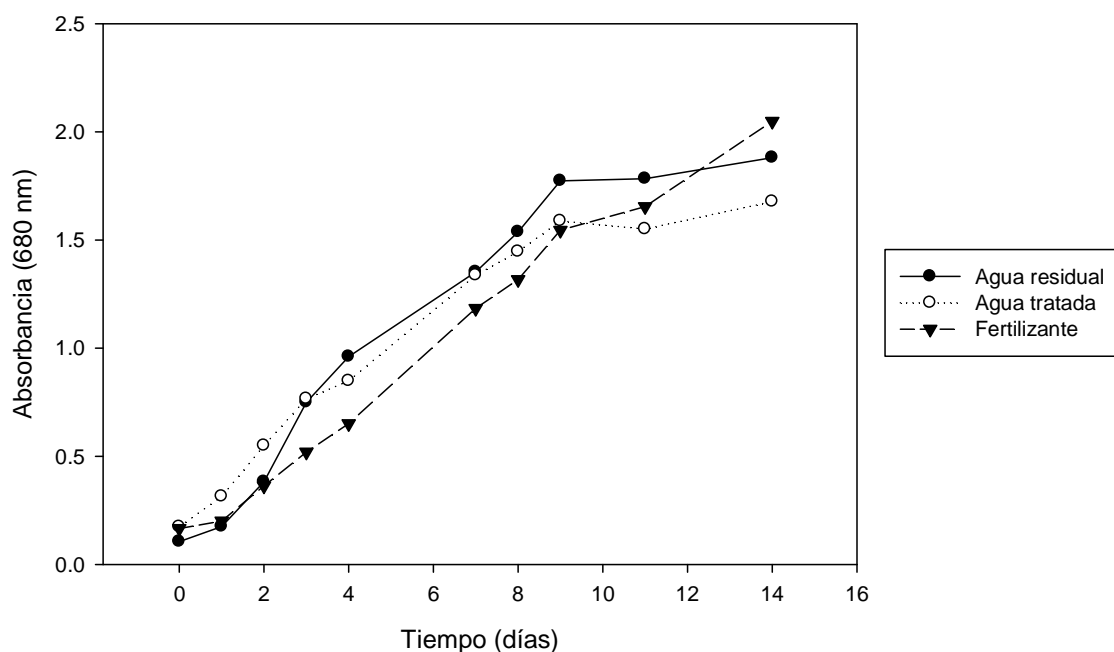


Figura 16. Curvas de crecimiento medido por espectrofotometría de *A. máxima*.

El crecimiento de esta microalga también fue medido por la cantidad de biomasa seca contenida en cada uno de los cultivos. Para los cultivos en agua residual se corrigieron los datos determinando el contenido de sólidos suspendidos totales presentes en el agua residual por triplicado, obteniéndose un resultado de 171.9 ± 3.2 mg/L. Los resultados se muestran en la Tabla 28.

Tabla 28. Crecimiento de *A. maxima* cultivada en fertilizante medido como concentración de biomasa seca.

Día	mg biomasa/L					
	Agua residual		Agua tratada		Fertilizante	
	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
0	79.79	5.73	100.39	0.60	76.35	0.66
1	90.20	4.87	109.41	0.78	59.30	0.76
2	144.88	2.91	176.71	1.02	126.61	0.64
3	173.35	4.83	275.67	2.54	147.48	1.94
4	340.05	3.75	319.10	3.19	290.74	2.42
7	516.66	4.41	405.00	2.59	498.92	3.07
8	618.88	3.13	446.17	1.20	657.12	4.02
9	699.13	3.89	540.61	5.06	689.99	4.26
11	795.34	3.36	587.03	5.02	719.42	3.54
14	905.29	1.49	687.71	7.13	877.12	11.82

Los resultados de la Tabla 28 se graficaron para obtener las curvas de crecimiento medido como concentración de biomasa seca.

Tal como puede observarse en la Figura 17, los cultivos en agua residual y en fertilizante tuvieron un contenido muy similar de biomasa seca al final del cultivo, el cultivo en agua tratada tuvo un contenido menor de biomasa seca que los cultivos en agua residual y fertilizante.

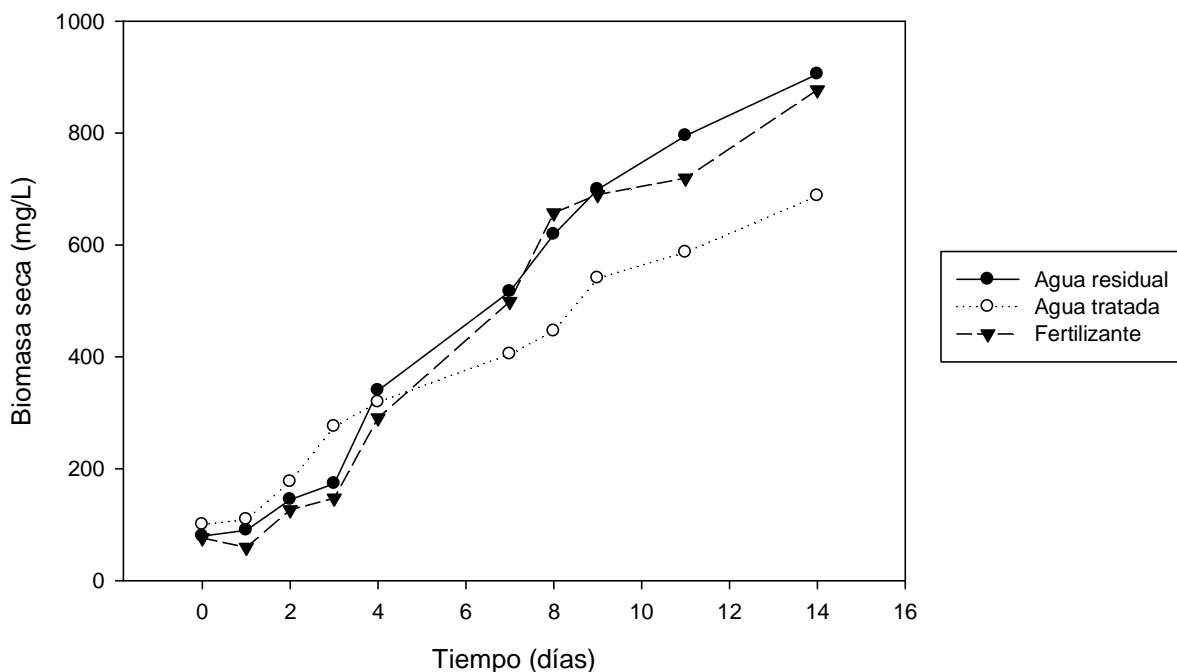


Figura 17. Curvas de crecimiento medido como biomasa seca de los cultivos de *A. maxima*.

Una vez extraída la biomasa de los cultivos en las tres calidades de agua se obtuvo la cantidad de biomasa seca mostrada en la Tabla 29.

Tabla 29. Contenido de biomasa seca en mg /L en los cultivos de *A. maxima* en las 3 calidades de agua.

Calidad de agua	Promedio	Desviación estándar
Agua residual	0.934	0.009
Agua tratada	0.697	0.011
Fertilizante	0.957	0.010

De los resultados en la Tabla 29 se puede destacar que a diferencia de las otras dos microalgas, el contenido de biomasa seca en los cultivos en agua residual y en fertilizante son muy similares, 0.934 y 0.957 mg/L respectivamente. Pero de forma similar a los casos anteriores el contenido de biomasa en los cultivos en agua tratada fue menor que en las otras dos calidades de agua.

Para determinar si hubo diferencia significativa en el contenido de biomasa en los cultivos se hizo un análisis de varianza, cuyos resultados se muestran en la Tabla 30

Tabla 30. Análisis de varianza para el contenido de biomasa seca en los cultivos de *A. maxima*.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada
Modelo	2	0.12434467	0.062172	610.1974
Error	6	0.00061133	0.000102	Probabilidad > F
Total	8	0.12495600		<.0001

Los resultados de la Tabla 30 muestran que la probabilidad de que la F calculada sea mayor a la F de tablas es menor a 0.0001, lo que indica que el contenido de biomasa seca en al menos uno de los cultivos es diferente.

Para determinar cuál de los tratamientos es diferente a los otros, se realizó una prueba de Tukey, se muestran los resultados en la Tabla 31.

Tabla 31. Prueba de Tukey para el contenido de biomasa seca en los cultivos de *A. maxima*.

	Nivel	Media
Fertilizante	A	0.957
Agua residual	A	0.933
Agua tratada	B	0.697

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes. ($\alpha=0.050$).

Con esta prueba se puede determinar que la biomasa obtenida en los cultivos en fertilizante y agua residual no fue significativamente diferente y que el tratamiento que tuvo una diferencia significativa respecto a los otros dos fue el cultivo en agua tratada.

5.1.3.2 Acumulación de lípidos en los cultivos de *A. maxima*.

Se realizó la extracción de lípidos a la biomasa seca, el contenido de lípidos para cada una de las 3 calidades de agua se muestra en la Tabla 32.

Tabla 32. Porcentaje de lípidos de *A. maxima* cultivada en las 3 calidades de agua.

Calidad de agua	Promedio	Desviación estándar
Agua residual	13.78	0.74
Agua tratada	7.52	0.61
Fertilizante	11.36	0.59

Los resultados obtenidos para esta microalga son similares a los obtenidos con las otras dos microalgas, ya que en el cultivo en agua residual fue donde se obtuvo la mayor cantidad de lípidos (13.8 %), aunque el contenido de lípidos no es mucho mayor que el obtenido en el cultivo en fertilizante. El cultivo en agua tratada fue donde se obtuvo el menor contenido de lípidos (7.5 %). Nuevamente se puede ver que debido al cultivo heterótrofo en el agua residual se acumula una mayor cantidad de lípidos.

En la bibliografía está reportado para cultivos a nivel laboratorio con condiciones controladas un porcentaje de lípidos de 4 a 9 % para *A. maxima* (Gouveia y Oliveira, 2009), en otra revisión se reporta un contenido de lípidos de 6 a 7 % (Verma et al., 2010). El contenido de lípidos de *A. maxima* obtenido en este trabajo en los cultivos en agua tratada está dentro de los rangos reportados en bibliografía pero el contenido obtenido tanto en los cultivos en el fertilizante y en el agua residual son superiores a los reportados.

Para determinar si existía diferencia significativa en el contenido de lípidos de los cultivos de esta microalga en cada una de las 3 calidades de agua se realizó un análisis de varianza. Los resultados de este análisis de varianza se muestran en la Tabla 33.

Tabla 33. Análisis de varianza del contenido de lípidos de *A. maxima*.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada
Modelo	2	59.972822	29.9864	70.5120
Error	6	2.551600	0.4253	Probabilidad > F
Total	8	62.524422		<.0001

El análisis de varianza de la Tabla 21 muestra que la probabilidad de obtener una F calculada mayor a la de tablas es menor a 0.0001, esto significa que el crecimiento de la microalga es diferente en alguna las 3 calidades de agua.

Para determinar la diferencia entre las medias de los tratamientos se realizó una prueba de Tukey para los tres diferentes tratamientos. Los resultados se muestran en la Tabla 34.

Tabla 34. Prueba de Tukey para el contenido de lípidos de *A. maxima*.

Nivel	Media
Agua residual	A 13.78
Fertilizante	B 11.36
Agua tratada	C 7.52

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes. ($\alpha=0.050$).

En la Tabla 34 se puede ver que el contenido de lípidos en los cultivos en cada una de las 3 calidades de agua es significativamente diferente.

5.1.3.3 Determinaciones fisicoquímicas a las calidades de agua

Se realizó la determinación de ortofosfatos, nitratos, demanda química de oxígeno y nitrógeno orgánico y amoniacal en las distintas calidades de agua antes y después del cultivo de la microalga para determinar el contenido de nutrientes en las diferentes calidades de agua y el porcentaje de remoción de los mismos. Los resultados de estas determinaciones se muestran en la Tabla 35.

Tabla 35. Contenido de nutrientes en las tres calidades de agua antes y después de los cultivos de *A. maxima*.

		Agua residual		Agua tratada		Fertilizante	
		Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
Ortofosfatos (mg/L)	Antes del cultivo	10.0	0.2	3.7	0.1	129.6	0.6
	Después del cultivo	4.2	0.2	1.6	0.2	80.1	2.8
Nitratos (mg/L)	Antes del cultivo	19.4	0.4	5.8	0.3	91.1	4.6
	Después del cultivo	8.3	0.3	2.4	0.0	65.0	1.8
Nitrógeno orgánico y amoniacal (mg/L)	Antes del cultivo	34.7	3.4	24.4	1.0	204.5	1.3
	Después del cultivo	9.5	0.3	3.6	0.4	135.0	3.9
DQO (mg O ₂ /L)	Antes del cultivo	649.3	32.5	203.0	35.0	286.9	48.5
	Después del cultivo	267.1	25.2	135.5	3.5	173.8	22.7

Con los resultados de la Tabla 35 se calcularon los porcentajes de remoción de cada uno de los nutrientes presentes en las 3 calidades de agua, estos resultados se muestran en la Tabla 36.

Tabla 36. Remoción de nutrientes en las 3 calidades de agua.

	Porcentaje de remoción		
	Agua residual	Agua tratada	Fertilizante
Ortofosfatos (mg/L)	57.7	56.2	38.2
Nitratos (mg/L)	57.2	58.9	28.6
Nitrógeno orgánico y amoniacal (mg/L)	72.6	85.3	34.0
DQO (mg O₂/L)	58.9	33.2	39.4

Al igual que lo que sucede con las otras dos microalgas, las remociones de nutrientes en el fertilizante son menores a las de los otros dos cultivos debido a que el cultivo en fertilizante se detuvo antes de que la microalga llegara a la fase estacionaria, con el objetivo de comparar los resultados obtenidos para las 3 calidades de agua en los mismos tiempos de cultivo. Los porcentajes de remoción de nutrientes en el fertilizante son todos menores al 50 %.

De la misma forma que con las otras dos microalgas se obtuvieron remociones de fosfatos muy similares en el agua tratada y en el agua residual, lo mismo ocurrió para la remoción de los nitratos, las remociones fueron cercanas al 55 %. En esta ocasión también no se alcanzaron remociones mayores del 90 % de nitrógeno orgánico y amoniacal, y además hay una diferencia mayor entre la remoción en el agua residual y en el agua tratada, siendo la remoción más alta para el agua tratada (85.3 %).

Las remociones de DQO en el fertilizante y en el agua tratada son similares, sin embargo debido a que el fertilizante no contiene materia carbonosa la remoción de la DQO se debe a otros nutrientes como los fosfatos y el nitrógeno. En el agua residual se alcanzó una remoción mayor de la materia carbonosa medida como DQO que en las otras dos calidades de agua, cercana al 60 %.

5.2 Comparación de las tres especies

Del crecimiento para las microalgas *S. acutus* y *C. vulgaris*, se obtuvo una mayor producción de biomasa y acumulación de lípidos en los cultivos en agua residual que en el fertilizante y el agua tratada. Con los resultados obtenidos se determina que la cantidad de biomasa y acumulación de lípidos puede estar

relacionada con el contenido de carbono orgánico presente en el medio de cultivo, debido a que con este nutriente las microalgas pueden crecer de manera heterótrofa, sin embargo se esperaría haber obtenido mejores resultados en los cultivos en agua tratada que en fertilizante, ya que este último no contiene carbono orgánico, el hecho de no haber obtenido estos resultados puede deberse a que gran parte del contenido de carbono orgánico del agua tratada son compuestos que no son removidos por el tratamiento de lodos activados y que pueden ser difíciles de asimilar por las microalgas o actuar como inhibidores del crecimiento de las mismas (Buttiglieri y Knepper, 2008). Esto no sucedió para *A. maxima* donde se obtuvieron mejores resultados en el fertilizante que en el agua residual y el agua tratada, probablemente debido a que esta microalga no se adaptó al crecimiento en el agua residual y el agua tratada.

Para determinar la posible interacción de los parámetros de calidades de agua y las especies de microalgas para determinar cómo afectaban estos factores en el contenido de biomasa de los cultivos, se realizó un análisis de varianza con los resultados obtenidos para las 3 especies de microalgas, los resultados se presentan en la Tabla 37.

Tabla 37. Análisis de varianza de biomasa seca de las 3 especies de microalgas.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada
Modelo	8	0.98488096	0.123110	392.4871
Error	18	0.00564600	0.000314	Probabilidad > F
Total	26	0.99052696		<.0001

La probabilidad de obtener una F calculada mayor a la F de tablas mostrada en la Tabla 37 es menor a 0.0001, esto quiere decir que si hay interacción entre la calidad de agua y la especie de microalga.

Para determinar la diferencia que existe entre las medias de los tratamientos se realizó una prueba de Tukey, los resultados se presentan en la Tabla 38.

Tabla 38. Prueba de Tukey para la biomasa seca de las 3 especies de microalgas.

Nivel	Media
Agua residual, <i>Scenedesmus</i>	A 1.279
Agua residual, <i>Chlorella</i>	B 1.149
Fertilizante, <i>Arthrospira</i>	C 0.957
Agua residual, <i>Arthrospira</i>	C D 0.933
Fertilizante, <i>Scenedesmus</i>	C D 0.913
Fertilizante, <i>Chlorella</i>	D 0.904
Agua tratada, <i>Scenedesmus</i>	E 0.767
Agua tratada, <i>Arthrospira</i>	F 0.697
Agua tratada, <i>Chlorella</i>	F 0.652

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes. ($\alpha=0.050$).

Con los resultados de la Tabla 38 se determinó que el tratamiento donde se obtuvo una mayor cantidad de biomasa fue con el cultivo de la microalga *S. acutus* en agua residual. El cultivo de *S. acutus* en agua residual fue significativamente diferente a todos los demás tratamientos, lo mismo ocurre para el cultivo de *C. vulgaris* en agua residual y de *S. acutus* en agua tratada. Los cultivos de *A. maxima* en fertilizante y agua residual y el de *S. acutus* en fertilizante no fueron significativamente diferentes. Los cultivos de *A. maxima* e agua residual y los de *S. acutus* y *C. vulgaris* en fertilizante tampoco fueron significativamente diferentes. Los cultivos de *A. maxima* y de *C. vulgaris* en agua tratada no fueron significativamente diferentes.

También puede notarse que para *S. acutus* y *C. vulgaris* se obtuvo un mayor contenido de biomasa en el agua residual que en el fertilizante en los mismos tiempos de cultivo, lo cual no pasó con *Arthrospira maxima*.

Para elegir la especie de microalga que tuvo un mayor contenido de lípidos se debe comparar el porcentaje de lípidos contenido en cada una de las 3 especies de microalgas estudiadas cultivadas en cada una de las 3 calidades de agua. Para esto se realizó un análisis de varianza cuyos resultados se encuentran en la Tabla 39.

Tabla 39. Análisis de varianza de contenido de lípidos seca de las 3 especies de microalgas.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada
Modelo	8	1047.9153	130.989	129.0856
Error	18	18.2655	1.015	Probabilidad > F
Total	26	1066.1808		<.0001

Con los datos de la Tabla 39 se puede ver que se rechaza la hipótesis nula que dice que no existe interacción entre la calidad de agua y la especie de microalga debido a que la probabilidad de obtener una F mayor a la F de tablas es menor a 0.0001, con un nivel de significancia del 5 %. Nuevamente se probó que si existe interacción entre los dos factores y por esto entonces ya no se prueban las otras dos hipótesis nulas, que se refieren a los factores por separado.

Para probar si existe diferencia entre las medias de los tratamientos se realizó una prueba de Tukey, los resultados de esta prueba se encuentran en la Tabla 40.

Tabla 40. Prueba de Tukey para el contenido de lípidos seca de las 3 especies de microalgas.

Nivel		Media
Agua residual, <i>Scenedesmus</i>	A	28.33
Agua residual, <i>Chlorella</i>	B	22.38
Fertilizante, <i>Scenedesmus</i>	B	21.82
Fertilizante, <i>Chlorella</i>	C	16.55
Agua residual, <i>Arthrospira</i>	C D	13.78
Agua tratada, <i>Scenedesmus</i>	D	12.72
Agua tratada, <i>Chlorella</i>	D	12.28
Fertilizante, <i>Arthrospira</i>	D	11.35
Agua tratada, <i>Arthrospira</i>	E	7.51

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes. ($\alpha=0.050$).

Los resultados de la Tabla 40 muestran que el tratamiento donde se obtuvo el mayor porcentaje de lípidos fue en el cultivo de la microalga *S. acutus* en agua residual. Además se puede observar que este tratamiento es significativamente diferente al resto de los tratamientos. También puede observarse que tanto para *Scenedesmus* sp. como para *C. vulgaris* el contenido de lípidos fue mayor en el agua residual que en el fertilizante debido al crecimiento heterótrofo.

Basándonos en los resultados obtenidos se seleccionó a la microalga *S. acutus* para realizar la segunda etapa de la metodología (Figura 5).

Con estos resultados se puede determinar que todas las microalgas tuvieron un contenido mayor de lípidos en el cultivo en agua residual que en el cultivo en fertilizante, esto seguramente se debe a que en el cultivo en fertilizante se da un crecimiento únicamente autótrofo mientras que en el cultivo agua residual se da un crecimiento tanto autótrofo como heterótrofo. Por lo general el contenido de lípidos es menor en el agua tratada debido al menor contenido de nutrientes en este cultivo.

5.3 Segunda etapa

5.3.1 Cultivos de *S. acutus* con adición y sin adición de CO₂.

Se realizaron cultivos en matraces Erlenmeyer de 2 L con un volumen de 1.35 L de agua residual y se inocularon con 150 mL de un cultivo de *S. acutus* realizado en agua residual. Los cultivos se mantuvieron con 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Todos los cultivos se mantuvieron con aireación constante, a algunos de estos cultivos se les adicionó CO₂ mediante un cultivo de levaduras en agua con una mezcla de glucosa, sacarosa y lactosa.

La temperatura de los cultivos se midió 2 veces al día con un total de 20 mediciones siendo la temperatura promedio de los cultivos de $26.7 \pm 4.2^\circ \text{C}$.

En la Figura 18 se observa A) cultivo de *S. acutus* con adición de CO_2 y B) cultivo de *S. acutus* sin adición de CO_2 .

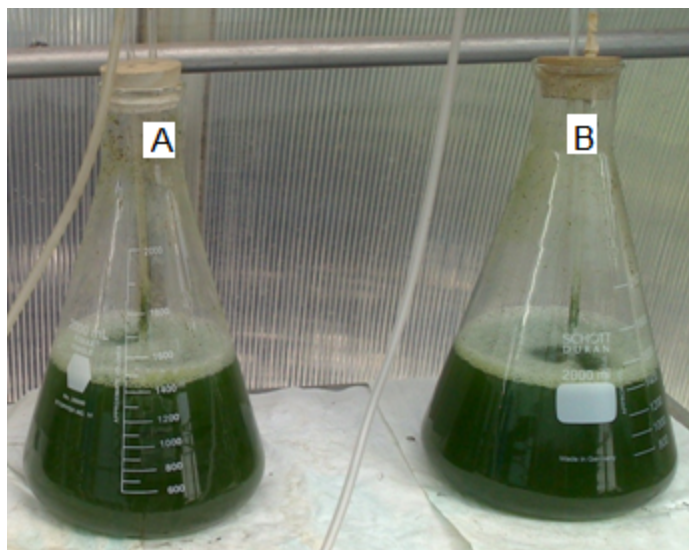


Figura 18. Cultivos de *S. acutus* en agua residual.

Se hicieron 5 réplicas de los cultivos en agua residual y 4 réplicas de los cultivos en agua residual adicionados con dióxido de carbono.

La variación de pH en los cultivos con y sin adición de CO_2 se muestran en la Tabla 41.

Tabla 41. Valores de pH para el cultivo de *S. acutus* en agua residual con y sin adición de CO_2 .

Día	Agua residual		Agua residual + CO_2	
	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
0	9.16	0.02	9.13	0.01
1	8.79	0.04	8.76	0.03
2	8.94	0.03	8.97	0.04
3	8.95	0.05	8.79	0.02
6	9.12	0.07	9.08	0.23
7	9.47	0.04	9.42	0.32
8	9.59	0.07	9.60	0.41
9	9.29	0.06	9.18	0.05
10	9.49	0.07	9.29	0.02
13	8.98	0.07	9.12	0.09

En ambos cultivos se alcanzan valores muy similares de pH, alcanzando un valor máximo en el día 8 (pH=9.6) y después el pH comienza a disminuir.

La concentración de oxígeno disuelto en los cultivos con y sin adición de CO₂ se muestran en la Tabla 42.

Tabla 42. Concentración de oxígeno disuelto (mg/L) en los cultivos de *S. acutus* en agua residual con y sin adición de CO₂.

Día	Agua residual		Agua residual + CO ₂	
	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
0	4.70	0.23	4.64	0.19
1	5.27	0.18	4.76	0.15
2	5.90	0.06	5.56	0.29
3	6.32	0.10	6.15	0.23
6	6.67	0.20	6.65	0.08
7	6.58	0.18	6.92	0.10
8	6.63	0.25	7.03	0.06
9	7.15	0.12	7.15	0.09
10	6.76	0.17	6.85	0.07
13	6.17	0.11	6.87	0.04

Se puede observar un aumento en la concentración de oxígeno disuelto en los cultivos debida a la producción de oxígeno durante la fotosíntesis.

El crecimiento de estos cultivos se determinó midiendo la absorbancia a 680 nm. Los resultados se muestran en la Tabla 43.

Tabla 43. Crecimiento de *S. acutus* medido por espectrofotometría, en los cultivos en agua residual.

Día	Agua residual		Agua residual + CO ₂	
	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
0	0.273	0.040	0.304	0.032
1	0.315	0.012	0.336	0.021
2	0.346	0.028	0.394	0.032
3	0.462	0.046	0.476	0.019
6	1.141	0.099	1.204	0.069
7	1.364	0.110	1.478	0.070
8	1.666	0.065	1.746	0.111
9	1.721	0.099	1.735	0.140
10	1.872	0.104	1.900	0.085
13	2.230	0.134	2.411	0.041

Para obtener las curvas de crecimiento con y sin adicionar dióxido de carbono se graficaron los resultados obtenidos.

En la Figura 19 se puede apreciar que ambas curvas de crecimiento son muy similares, por lo que al parecer no existe una diferencia en el crecimiento si se adiciona CO_2 a los cultivos.

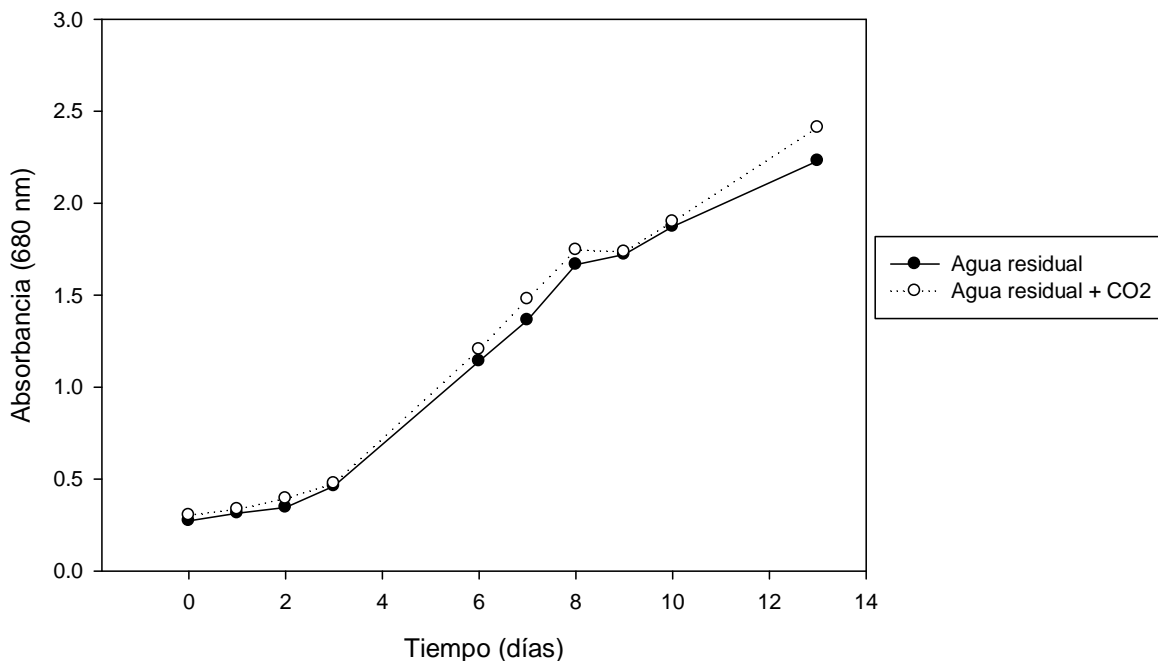


Figura 19. Curva de crecimiento de los cultivos de *S. acutus* en agua residual con y sin adición de CO_2 .

El crecimiento se midió únicamente mediante absorbancia ya que se utilizó la relación biomasa seca contra absorbancia obtenida de los cultivos de *S. acutus* en la primera etapa de la experimentación, esto para determinar el contenido aproximado de biomasa seca en los cultivos.

En la Figura 20 se muestra la relación entre absorbancia y biomasa seca para los cultivos en agua residual de *S. acutus*

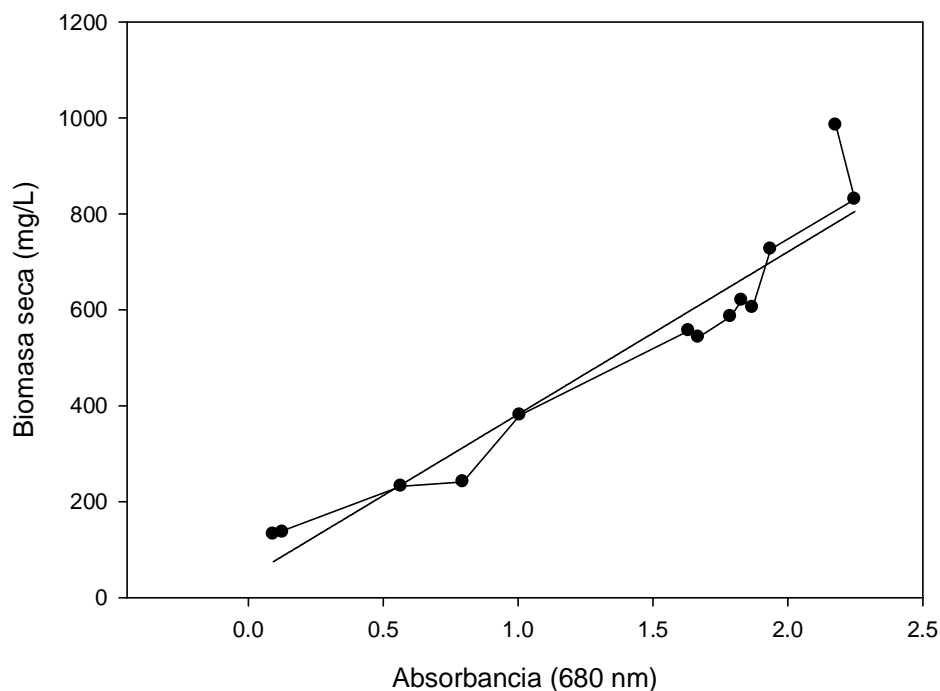


Figura 20. Relación entre absorbancia y biomasa seca en los cultivos de *S. acutus*.

La ecuación de regresión lineal de la recta fue $\text{mg/L} = 338.61(\text{Abs}) + 43.676$, con una r^2 de 0.917. Con esta relación se puede obtener un aproximado del contenido de biomasa seca presente en los cultivos, estos resultados se muestran en la Tabla 44.

Tabla 44. Contenido aproximado e biomasa seca en los cultivos de *S. acutus* en agua residual con y sin adición de CO_2 .

Día	Agua residual		Agua residual + CO_2	
	Absorbancia (680 nm)	Biomasa seca (mg/L)	Absorbancia (680 nm)	Biomasa seca (mg/L)
0	0.273	136.174	0.304	146.502
1	0.315	150.283	0.336	157.337
2	0.346	160.723	0.394	177.090
3	0.462	199.946	0.476	204.969
6	1.141	430.147	1.204	451.479
7	1.364	505.488	1.478	544.034
8	1.666	607.693	1.746	634.782
9	1.721	626.542	1.735	631.170
10	1.872	677.673	1.900	686.928
13	2.230	798.671	2.411	860.073

Para los cultivos de *S. acutus* en agua residual, tanto los que estaban adicionados con CO₂ como los que no lo estaban se obtuvieron concentraciones de biomasa muy similares, la variación fue únicamente de alrededor de 61 mg/L.

Se determinó si el crecimiento fue significativamente diferente en los cultivos adicionados con CO₂ y los que no se adicionaron con CO₂ mediante un análisis de varianza mostrado en la Tabla 45.

Tabla 45. Análisis de varianza de los cultivos de *S. acutus* con y sin adición de CO₂.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada
Modelo	1	0.06576356	0.065764	4.9378
Error	7	0.09322933	0.013318	Probabilidad > F
Total	8	0.15899289		0.0617

En la Tabla 45 se observa que la probabilidad de obtener una F calculada mayor a la F de tablas es de 0.0617, esto quiere que el crecimiento de la microalga *S. acutus* en agua residual con adición de CO₂ y sin adición de CO₂ no es significativamente diferente, lo que significa que no hay un efecto en la adición de dióxido de carbono sobre el crecimiento de esta microalga.

Debido a que no se apreció una diferencia considerable en la biomasa obtenida en los cultivos en agua residual adicionados con CO₂ y en los que no se adicionó CO₂, se realizó el cultivo de *S. acutus* en agua con fertilizante burbujeando únicamente con aire, burbujeando aire adicionado con CO₂ y burbujeando el aire en una trampa de hidróxido de sodio para secuestrar el dióxido de carbono. Esto se realizó para ver porque en los cultivos de agua residual no hubo un efecto considerable por la adición de CO₂.

Cada uno de los cultivos se hizo por triplicado, en la Tabla 46 se muestran los valores de pH para cada uno de los cultivos.

Tabla 46. Variación de pH en los cultivos de *S. acutus* en agua con fertilizante con aire, con adición de CO₂ y con trampa para CO₂.

Día	Fertilizante con adición CO ₂		Fertilizante con aire		Fertilizante con trampa de CO ₂	
	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
0	7.10	0.02	7.07	0.02	7.02	0.01
1	7.34	0.01	7.34	0.01	7.57	0.05
4	7.35	0.06	7.42	0.01	8.04	0.25
5	7.40	0.09	7.43	0.02	8.35	0.24
6	7.34	0.07	7.48	0.01	8.43	0.13
7	7.37	0.07	7.42	0.03	8.58	0.07
8	7.39	0.07	7.45	0.01	8.75	0.02
11	7.48	0.06	7.58	0.12	8.87	0.12
12	7.56	0.03	7.68	0.13	8.62	0.40
13	7.59	0.03	7.87	0.06	8.49	0.39
14	7.67	0.03	7.88	0.21	8.46	0.38
15	7.68	0.03	7.92	0.22	8.47	0.30
18	7.63	0.08	7.88	0.21	8.32	0.22
19	7.61	0.13	7.87	0.24	8.27	0.53
21	7.28	0.13	7.59	0.30	7.95	0.70

En los resultados de esta Tabla se puede observar que en los cultivos adicionados con CO₂ y con aire hubo un menor incremento del pH comparado con los cultivos a los cuales se les colocó una trampa de CO₂, esto puede deberse a que los carbonatos actuaron como amortiguadores del pH en los cultivos que si tenían CO₂.

El crecimiento en los cultivos fue medido por espectrofotometría, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 47.

Tabla 47. Crecimiento de *S. acutus* en los cultivos en agua con fertilizante con aire, con adición de CO₂ y con trampa para CO₂.

Día	Fertilizante con adición CO ₂		Fertilizante con aire		Fertilizante con trampa de CO ₂	
	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
0	0.394	0.009	0.400	0.016	0.381	0.008
1	0.497	0.009	0.560	0.029	0.380	0.011
4	1.070	0.149	0.963	0.097	0.414	0.012
5	1.158	0.080	1.150	0.149	0.432	0.011
6	1.337	0.174	1.253	0.160	0.487	0.012
7	1.459	0.185	1.384	0.186	0.530	0.027
8	1.602	0.147	1.526	0.181	0.569	0.028
11	1.959	0.187	1.932	0.144	0.668	0.010
12	2.148	0.186	2.024	0.218	0.788	0.018
13	2.256	0.160	2.182	0.136	0.885	0.011
14	2.377	0.217	2.203	0.200	0.942	0.010
15	2.526	0.232	2.398	0.194	1.018	0.031
18	2.736	0.200	2.622	0.200	1.176	0.027
19	2.805	0.155	2.632	0.157	1.287	0.010
21	2.867	0.134	2.715	0.135	1.360	0.044

Se puede observar que hubo un mayor crecimiento de la microalga en los cultivos burbujeados únicamente con aire y los que tenían aire con CO₂ que en el cultivo con la trampa de CO₂, esto es debido a que el CO₂ era la única fuente de carbono en los cultivos.

El crecimiento medido como absorbancia se graficó para cada uno de los tres diferentes medios de cultivo para comparar las curvas de crecimiento obtenidas.

En la Figura 21 se puede apreciar que el crecimiento en los cultivos con aire y con aire adicionado con CO₂ el crecimiento es muy similar, pero en el cultivo con trampa para CO₂ el crecimiento es mucho menor que en los otros dos cultivos.

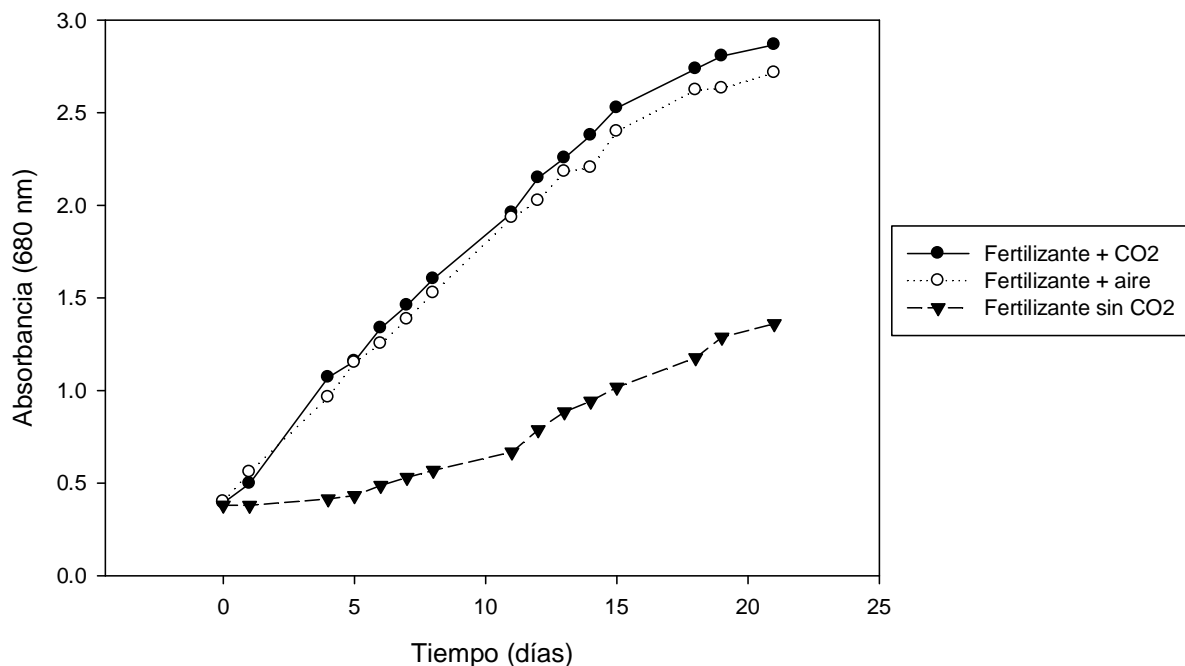


Figura 21. Crecimiento de *S. acutus* en agua con fertilizante con adición de CO₂, con aire y con trampa para CO₂.

El contenido de biomasa obtenido después de los 21 días de cultivo para cada uno de los tres diferentes cultivos se muestra en la Tabla 48.

Tabla 48. Contenido de biomasa en los diferentes cultivos de *S. acutus* en agua con fertilizante.

Cultivo	Promedio	Desviación estándar
Fertilizante adicionado con CO ₂	1025.6	0.01
Fertilizante con aire	1013.6	0.01
Fertilizante con trampa para CO ₂	586.0	0.01

De la Tabla 48 se observa que para los cultivos de *S. acutus* en fertilizante con adición de CO₂ y con aire se obtuvieron concentraciones de biomasa muy similares, sin embargo para el cultivo con trampa de CO₂ la concentración de biomasa fue mucho menor. Esto se debe a que en los cultivos con trampa para CO₂ estaba limitada la fuente de carbono.

Para determinar si el crecimiento fue significativamente diferente en los cultivos se hizo un análisis de varianza, cuyos resultados se muestran en la Tabla 49.

Tabla 49. Análisis de varianza para los cultivos de *S. acutus* en fertilizante.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada
Modelo	2	376321.85	188161	7762.770
Error	6	145.43	24	Probabilidad > F
Total	8	376467.28		<.0001

Los resultados de la Tabla 49 indican que la probabilidad de obtener una F calculada mayor a la F de tablas es menor al 0.0001 %, lo que quiere decir que al menos uno de los tratamientos es diferente. Para determinar cuál de los tratamientos es diferente o si los tres son diferentes entre sí, se hizo una prueba de Tukey de diferencia de medias. Los resultados de la prueba de Tukey se muestran en la Tabla 50.

Tabla 50. Prueba de Tukey para los cultivos de *S. acutus* en fertilizante.

Nivel		Media
Fertilizante+ CO ₂	A	1025.6
Fertilizante con aire aire	A	1013.6
Fertilizante con trampa para CO ₂	B	585.9

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes. ($\alpha=0.050$).

Mediante la prueba de Tukey de la Tabla 50 se puede determinar que el cultivo con trampa de CO₂ es diferente a los otros dos cultivos, los cuales no resultaron ser significativamente diferentes. Con los resultados obtenidos podemos ver que una aireación constante con aire produce una saturación de CO₂ en el medio de cultivo y por lo tanto una mayor adición de CO₂ no tiene un efecto sobre el crecimiento de las microalgas.

5.3.2 Determinación de nutrientes en el agua residual.

En los cultivos de *S. acutus* en agua residual con y sin adición de CO₂ se hicieron las determinaciones de nutrientes en el agua residual antes del cultivo, durante el cultivo y al finalizar el cultivo de la microalga. Se determinó el contenido de nitrógeno orgánico y amoniacal, ortofosfatos, de nitrógeno en forma de nitratos y la demanda química de oxígeno.

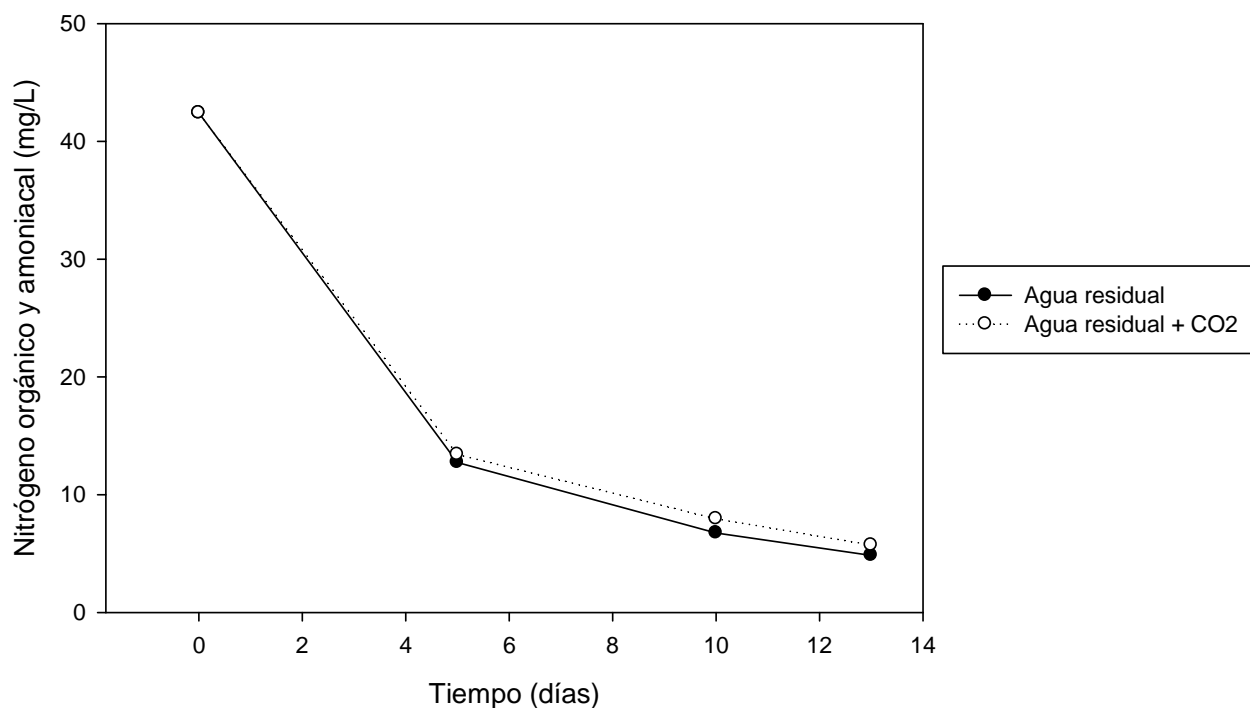
El contenido de nitrógeno orgánico y amoniacal en los cultivos en agua residual con y sin adición de CO₂ se muestra en la Tabla 51.

Tabla 51. Contenido de nitrógeno orgánico y amoniacal en los cultivos de *S. acutus* en agua residual con y sin adición de CO₂.

Día	Nitrógeno orgánico y amoniacal (mg/L)	Agua residual sin adición de CO ₂		Agua residual con adición de CO ₂	
		Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
0		42.42	7.91	42.42	7.91
5		13.42	0.50	12.73	0.32
10		7.96	1.59	6.75	0.97
13		5.72	0.63	4.85	0.37

La remoción alcanzada para el nitrógeno orgánico y amoniacal fue de 86.5 % en los cultivos sin adición de CO₂, un poco menor a la alcanzada en los cultivos con adición de CO₂, donde se alcanzó un 91.99 % de remoción.

Se graficaron los resultados para determinar cómo se redujo la cantidad de este nutriente durante el cultivo (Figura 22). En la Figura 22 se observa que el decrecimiento de la concentración de este nutriente se da de manera muy similar en ambos cultivos.

**Figura 22.** Curva de contenido de nitrógeno orgánico y amoniacal en los cultivos de *S. acutus* en agua residual con y sin adición de CO₂.

En la Tabla 52 se muestran los resultados para el contenido de nitratos en ambos cultivos.

Tabla 52. Contenido de nitratos en los cultivos en agua residual de *S. acutus* con y sin adición de CO₂.

Día	Nitratos (mg/L)	Agua residual sin adición de CO ₂		Agua residual con adición de CO ₂	
		Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
0		20.78	0.83	20.78	0.83
3		20.54	0.48	19.82	0.70
6		17.05	0.65	17.24	0.15
8		11.48	0.62	11.79	0.62
10		9.51	0.27	8.42	0.21
13		7.18	0.33	6.46	0.25

La remoción de nitratos fue de 65.4 % en los cultivos sin adición de CO₂ y de 68.9 % en los cultivos con adición de CO₂, se obtuvieron remociones muy similares en ambos cultivos.

Los resultados de la remoción de nitratos pueden observarse en la Figura 23, donde se muestra que su remoción también es muy similar en ambos cultivos.

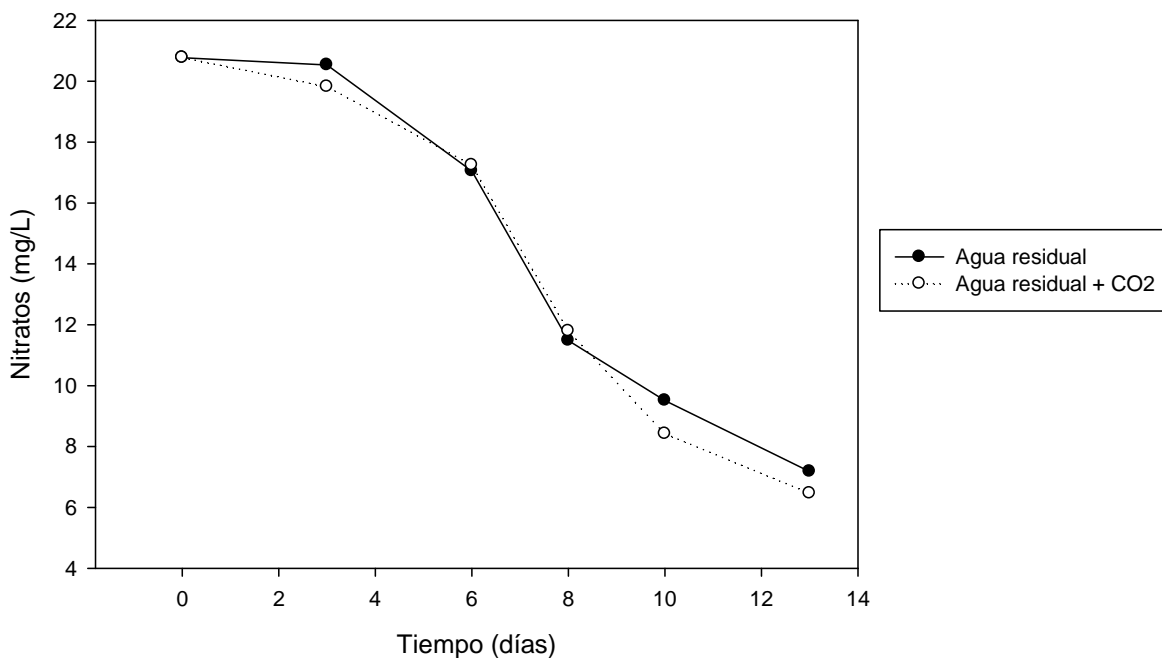


Figura 23. Curva de contenido de nitratos en los cultivos de *S. acutus* en agua residual con y sin adición de CO₂.

En la Tabla 53 se muestran los resultados obtenidos para el contenido de ortofosfatos en los cultivos con y sin adición de CO₂.

Tabla 53. Contenido de ortofosfatos en el agua residual durante el cultivo de *S. acutus* con y sin adición de CO₂.

Día	Agua residual sin adición de CO ₂		Agua residual con adición de CO ₂	
	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
0	16.53	0.37	16.53	0.37
3	14.33	0.29	13.31	0.39
6	13.30	0.40	12.37	0.31
8	11.82	0.41	10.61	0.40
10	10.44	0.25	8.39	0.35
13	7.50	0.13	7.07	0.16

La remoción de ortofosfatos fue de 54.7 % en los cultivos sin adición de CO₂ y de 64.7 % en los cultivos donde se adicionó CO₂. En este caso se observa una mayor diferencia entre la remoción cuando se adicionó CO₂ que cuando no se adicionó, siendo mayor la remoción al adicionar este gas a los cultivos.

En la Figura 24 puede observarse que en el cultivo adicionado con CO₂ hay una reducción más rápida de los ortofosfatos que en el cultivo donde no se adicionó CO₂, sin embargo la concentración final de ortofosfatos es muy similar en ambos cultivos.

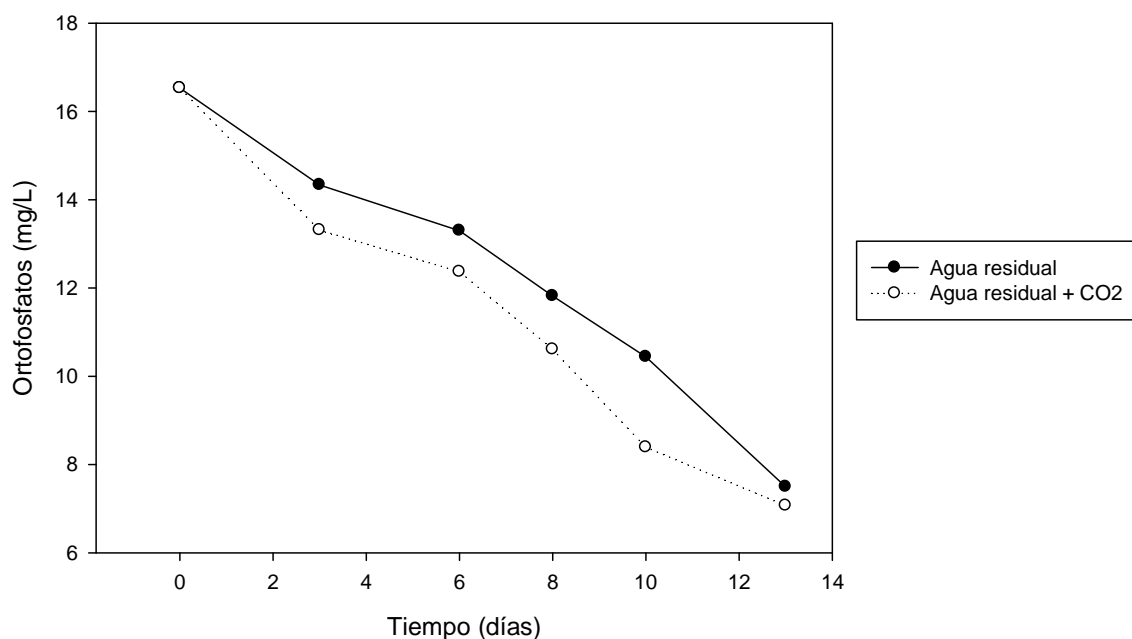


Figura 24. Curva de contenido de ortofosfatos en los cultivos de *S. acutus* en agua residual con y sin adición de CO₂.

En la Tabla 54 se muestran las concentraciones de DQO obtenidas para los cultivos de *S. acutus* con y sin adición de CO₂.

Tabla 54. Contenido de DQO en el agua residual durante el cultivo de *S. acutus* con y sin adición de CO₂.

Día	DQO (mg O ₂ /L)	Agua residual sin adición de CO ₂		Agua residual con adición de CO ₂	
		Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
0		681.61	21.69	681.61	21.69
3		585.33	5.17	576.96	9.23
6		495.14	9.69	486.15	6.22
8		424.50	10.13	419.22	7.54
10		325.35	12.48	326.01	7.18
13		256.41	9.76	268.18	9.59

La remoción obtenida para estos nutrientes fue de 62.4 % para los cultivos a los cuales no se les adicionó CO₂ y de 60.6 % para los cultivos adicionados con CO₂. Nuevamente se obtienen porcentajes de remoción similares en ambos cultivos.

En la Figura 25 se puede observar que la reducción de la DQO en los cultivos con y sin adición de CO₂ es casi igual.

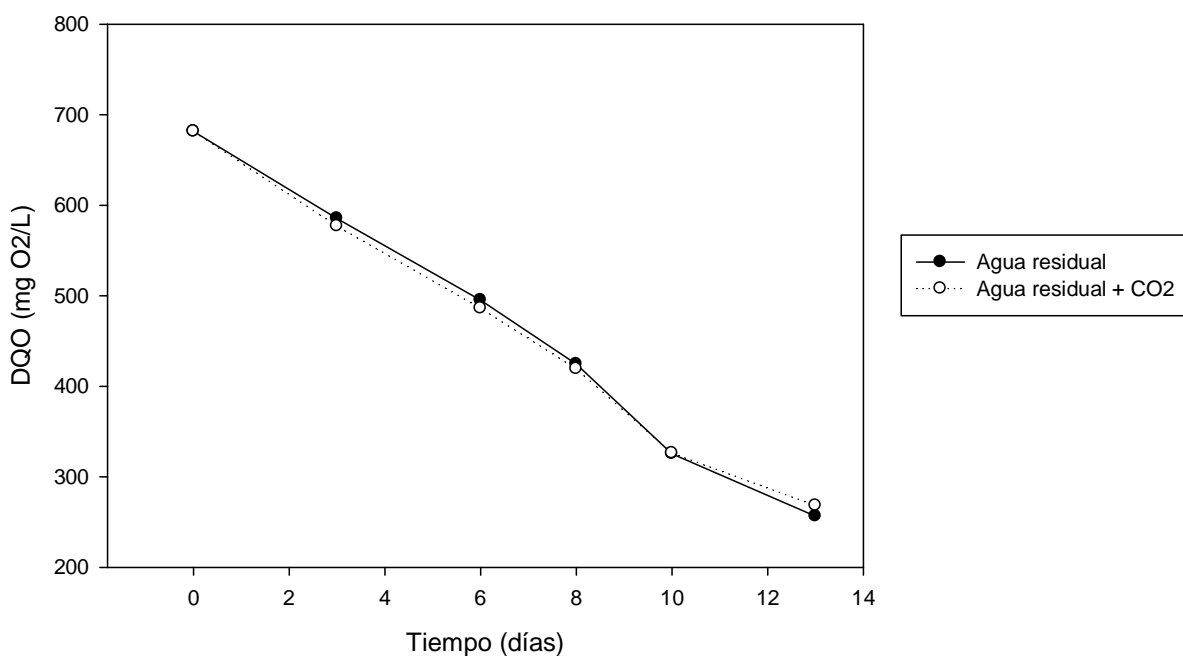


Figura 25. Curva de contenido de DQO en los cultivos de *S. acutus* en agua residual con y sin adición de CO₂.

Después de los cultivos, tanto los adicionados con CO₂ como los que no fueron adicionados con CO₂, se obtuvieron remociones muy similares de todos los nutrientes, excepto de los ortofosfatos.

Para determinar si el contenido final de cada uno de los nutrientes es diferente en el cultivo adicionado con CO₂ que en el cultivo sin adición de dióxido de carbono se realizó un análisis de varianza.

En la Tabla 55 se muestra el análisis estadístico hecho para el nitrógeno orgánico y amoniacal con y sin adición de CO₂.

Tabla 55. Análisis de varianza para el contenido de nitrógeno orgánico y amoniacal.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada
Modelo	1	1.5138000	1.51380	8.1537
Error	7	1.2996000	0.18566	Probabilidad > F
Total	8	2.8134000		0.0245

En la Tabla 55 se muestra que la probabilidad de obtener una F calculada mayor a la F de tablas es de 0.0245 por lo que si hay diferencia significativa en la remoción de este nutriente para los cultivos con adición de CO₂ y sin adición de CO₂.

En la Tabla 56 se muestra el análisis estadístico para el contenido de ortofosfatos.

Tabla 56. Análisis de varianza para el contenido de ortofosfatos en ambos cultivos.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada
Modelo	1	0.36408889	0.364089	8.8086
Error	7	0.28933333	0.041333	Probabilidad > F
Total	8	0.65342222		0.0209

La Tabla 56 muestra que la probabilidad de obtener una F calculada mayor a la F de tablas es de 0.0209, esto demuestra que la adición de CO₂ si tiene efecto sobre la remoción de ortofosfatos ya que existe diferencia significativa en el porcentaje de remoción de este nutriente entre ambos cultivos.

En la Tabla 57 se muestra el análisis de varianza para los nitratos en los cultivos con y sin adición de CO₂.

Tabla 57. Análisis de varianza para el contenido de nitratos.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada
Modelo	1	1.0272222	1.02722	11.6002
Error	7	0.6198667	0.08855	Probabilidad > F
Total	8	1.6470889		0.0114

Según los resultados de la Tabla 57 la probabilidad de obtener una F calculada mayor a la de tablas es de 0.0114, lo que indica que en la remoción de nitratos si hay diferencia significativa para los cultivos adicionados con CO₂ y para los cultivos que no fueron adicionados con CO₂.

En la Tabla 58 se muestra el análisis de varianza para el contenido de DQO en ambos cultivos.

Tabla 58. Análisis de varianza para la DQO.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada
Modelo	1	276.12500	276.125	2.9269
Error	7	660.37500	94.339	Probabilidad > F
Total	8	936.50000		0.1309

De la Tabla 58 se observa que la probabilidad de obtener una F calculada mayor a la de tablas es de 0.1309, esto quiere decir que no hay diferencia significativa en la remoción de la DQO para los cultivos adicionados con CO₂ y para los cultivos que no fueron adicionados con este gas.

Con estos resultados se puede observar que el CO₂ tuvo efecto sobre la remoción de los nitratos, el nitrógeno orgánico y amoniacal y los ortofosfatos pero no en la remoción de DQO. Debido a que el CO₂ no tuvo efecto sobre el crecimiento de la microalga y que aunque los resultados mostraron una diferencia significativa en la remoción del nitrógeno y el fósforo, las concentraciones finales de estos nutrientes tienen diferencias menores a 1 mg/L por lo que en los cultivos realizados para la producción del biodiesel no se adicionará dióxido de carbono.

5.3.3 Pruebas de coagulación con quitosano.

Para determinar si se podía separar la microalga del cultivo mediante coagulación con quitosano se hizo una prueba de jarras con este coagulante para determinar el pH y la dosis óptima para obtener la mayor eficiencia de remoción de las microalgas.

Para medir la eficiencia de remoción primero se midió la absorbancia del cultivo de microalgas a 680 nm y posteriormente se midió la absorbancia del sobrenadante después de la sedimentación.

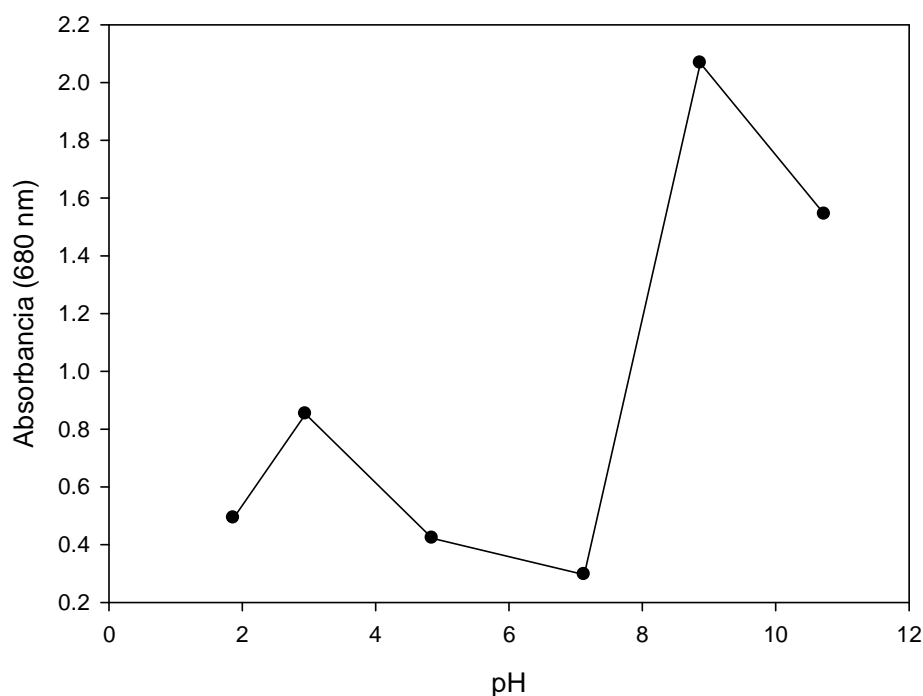
Primero se hicieron pruebas utilizando 15 mg/L de quitosano, ya que con esta dosis se han tenido buenas eficiencias de remoción (Muñoz y Guieysse, 2006) y se variaron los pH, para obtener el pH óptimo. Las pruebas se hicieron en un volumen de 500 mL.

Los pH que se eligieron para probar fueron 2, 3, 5, 7, 9 y 11 (Tabla 59).

Tabla 59. Eficiencia de remoción de la microalga a diferentes pH.

pH	Dosis de quitosano (mg/L)	Absorbancia inicial (680 nm)	Absorbancia final (680 nm)	Eficiencia de remoción
1.87	15	2.538	0.492	80.61
2.95	15	2.538	0.852	66.43
4.85	15	2.538	0.422	83.37
7.13	15	2.538	0.296	88.34
8.87	15	2.538	2.067	18.56
10.73	15	2.538	1.544	39.16

Se graficaron los pH contra la absorbancia final en la Figura 26 donde puede verse que el pH en el cual se tuvo la menor absorbancia después de la coagulación fue a un pH de alrededor de 7.

**Figura 26.** Remoción de absorbancia a diferentes pH.

En la Figura 27 se observa que el vaso D) que es en donde se puede observar un sobrenadante más claro que en las demás pruebas y se alcanzan a distinguir los flóculos en el fondo del vaso, esta prueba fue donde se obtuvo una mayor eficiencia de remoción a un pH de 7.13.

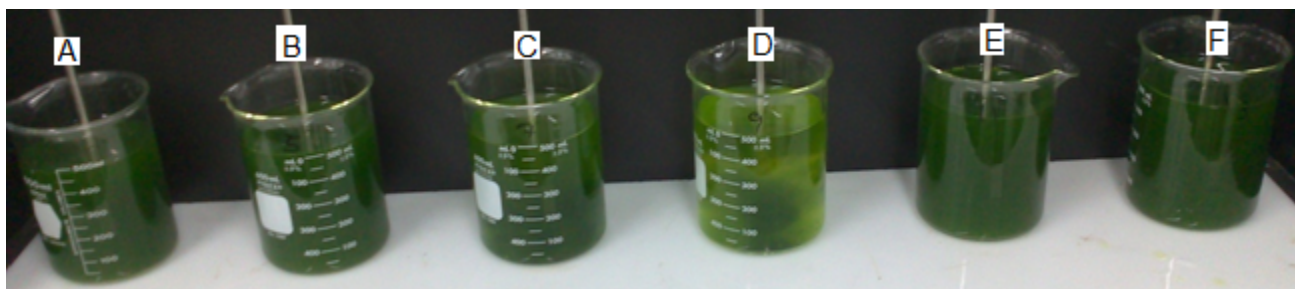


Figura 27. Prueba de jarras a diferentes pH que son: A) 1.87, B) 2.95, C) 4.85, D) 7.13, E) 8.87 y F) 10.37.

Se volvieron a probar pH entre 5 y 7 que fueron los valores de pH a los que se obtuvieron las mayores eficiencias de remoción (Tabla 60).

Tabla 60. Eficiencia de remoción de la microalga a diferentes pH.

pH	Dosis de quitosano (mg/L)	Absorbancia inicial (680 nm)	Absorbancia final (680 nm)	Eficiencia de remoción
5.11	15	2.497	0.453	81.86 %
5.73	15	2.497	0.369	85.22 %
6.13	15	2.497	0.161	93.55 %
6.41	15	2.497	0.097	96.12 %
6.77	15	2.497	0.071	97.16 %

Los datos de la Tabla 60 fueron graficados, la gráfica se muestra en la Figura 28 donde puede notarse que la mayor eficiencia de remoción se alcanzó a un pH de 6.77.

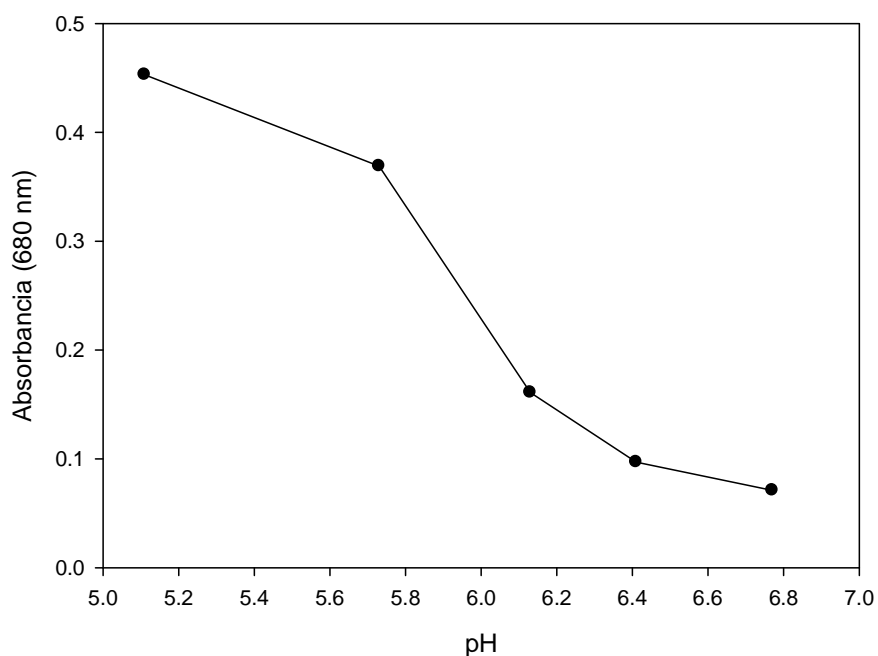


Figura 28. Remoción de la absorbancia a diferentes pH.

En la Figura 29 pueden verse todos los flóculos en el fondo de los vasos, pero el vaso donde el sobrenadante se ve más claro es en el E) que se encontraba a un pH de 6.77 y el que fue donde se alcanzó la mayor remoción de biomasa.

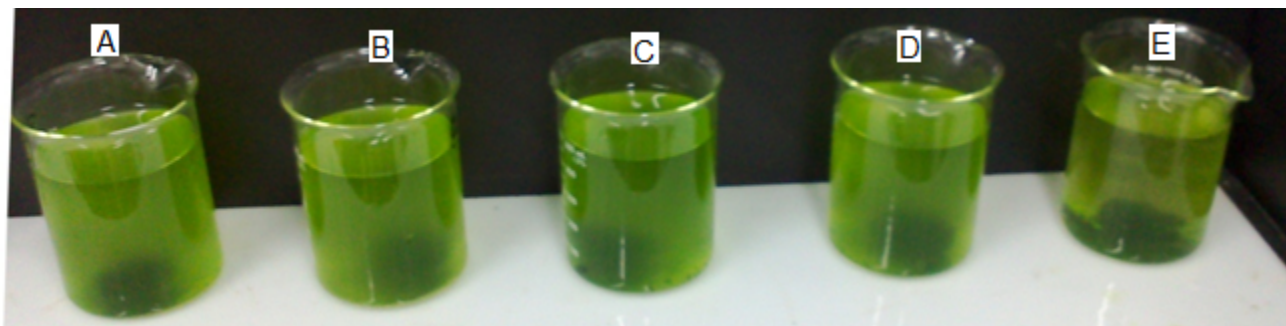


Figura 29. Prueba de jarras a diferentes pH, los cuales son: A) 5.11, B) 5.73, C) 6.13, D) 6.41 y E) 6.77.

En este caso la mayor remoción se consiguió con un pH de 6.77, que se seleccionó como el pH óptimo ya que aunque a un pH de 6.41 también se obtiene una alta eficiencia de remoción, los cultivos de la microalga en agua residual se encuentran en valores de pH básicos por lo que se tendría que hacer un mayor gasto de reactivos para alcanzar un pH más bajo.

Se prosiguió a realizar una prueba con diferentes dosis de coagulante, con el valor de pH seleccionado. Las dosis que se probaron fueron 20, 30, 40, 50, 60 y 70 mg/L de quitosano, los resultados se muestran en la Tabla 61.

Tabla 61. Eficiencia de remoción de las microalgas con diferentes dosis de quitosano.

Dosis (mg/L)	pH	Absorbancia inicial (680 nm)	Absorbancia final (680 nm)	Eficiencia de remoción
15	6.71	2.497	0.071	97.16 %
20	6.71	2.429	0.027	98.89 %
30	6.71	2.429	0.161	93.37 %
40	6.71	2.429	0.783	67.76 %
50	6.71	2.429	0.339	86.04 %
70	6.71	2.429	1.131	53.44 %

Se graficó la dosis de quitosano contra la remoción de la absorbancia, mostrándose los resultados en la Figura 30 donde puede observarse que se alcanza una mayor remoción con una dosis de 20 mg/L de quitosano.

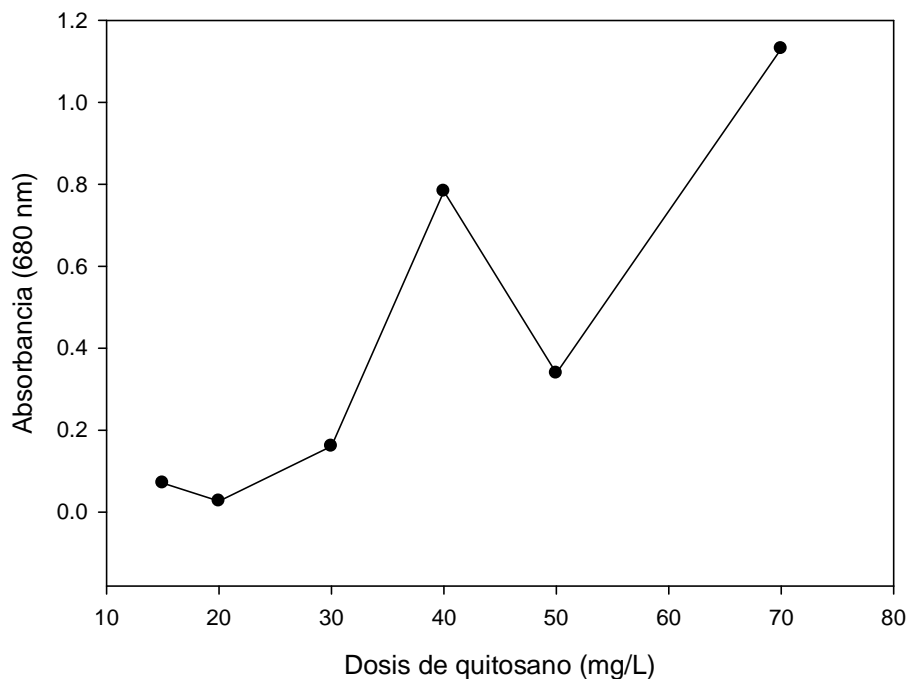


Figura 30. Remoción de la absorbancia a diferentes dosis de quitosano.

La remoción de la biomasa de la microalga *S. acutus* se puede llevar a cabo ajustando el pH del cultivo a 6.7 y añadiendo una dosis de quitosano de 20 mg/L.

En la Figura 31 se pueden apreciar los flóculos de la microalga una vez que se sedimentaron en el fondo del vaso.

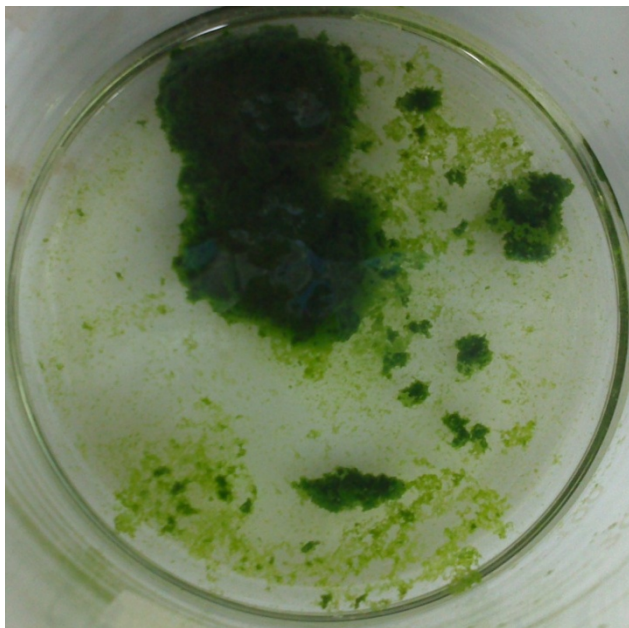


Figura 31. Apariencia de los flóculos de la microalga *S. acutus* después de la coagulación.

Mediante centrifugación a 3500 rpm por 9 min, de un cultivo con una absorbancia de 2.513 se obtiene una absorbancia del sobrenadante de 0.017 a 680 nm. Esto significa una eficiencia de remoción de 99.3 %, con la remoción mediante coagulación-floculación se obtiene una remoción de 98.9 %, por lo que este proceso es una forma eficiente y económica de remover la biomasa del medio de cultivo.

5.3.4 Cultivo de *S. acutus* a pequeña escala

La microalga *S. acutus* fue la que tuvo un mayor contenido de lípidos por lo que los cultivos para la producción de biodiesel se realizaron en agua residual utilizando esta especie de microalga. Los cultivos se realizaron en reactores con un volumen de entre 17 y 19 L los cuales se inocularon con 2 L de un cultivo de *S. acutus* en agua residual.

En la Figura 32 se aprecian los reactores utilizados para los cultivos de la microalga *S. acutus* que fueron utilizados para la producción de biodiesel.



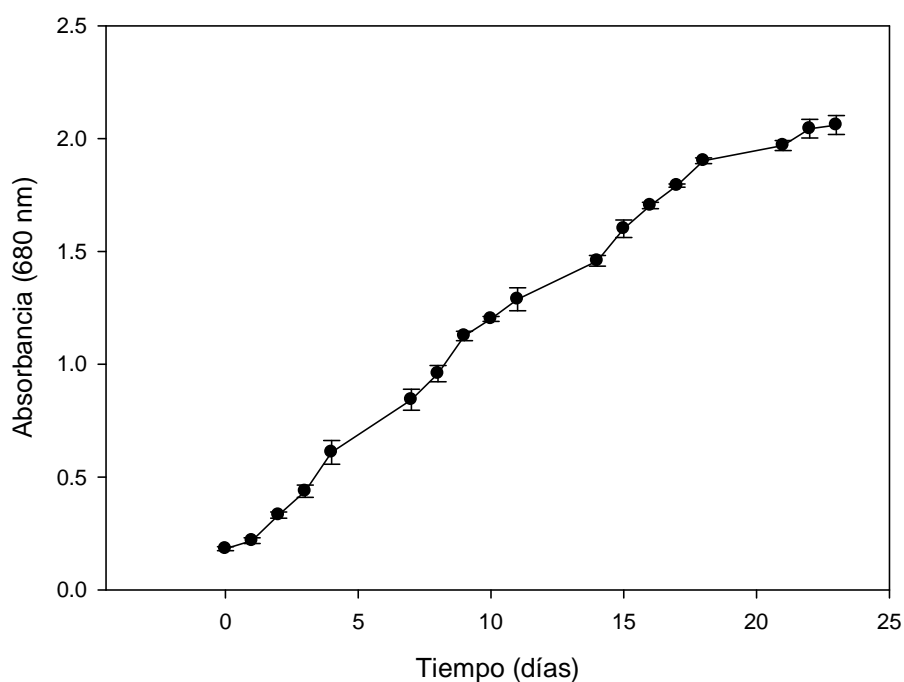
Figura 32. Reactores para los cultivos de *S. acutus* en un volumen mayor.

El crecimiento de *S. acutus* medido por absorbancia en estos reactores y los resultados se muestran en la Tabla 62.

Tabla 62. Crecimiento de *S. acutus* en agua residual medido por espectrofotometría.

Día	Promedio	Desviación estándar
0	0.183	0.009
1	0.219	0.013
2	0.332	0.014
3	0.437	0.027
4	0.610	0.053
7	0.843	0.046
8	0.959	0.036
9	1.126	0.021
10	1.201	0.011
11	1.288	0.051
14	1.458	0.024
15	1.601	0.039
16	1.704	0.014
17	1.792	0.007
18	1.902	0.013
21	1.970	0.022
22	2.044	0.042
23	2.060	0.042

Los datos de la Tabla 62 se graficaron para obtener la curva de crecimiento que se muestra en la Figura 33, donde se aprecia que la fase estacionaria se alcanzó alrededor de los 21 días de cultivo.

**Figura 33.** Curva de crecimiento de *S. acutus* en agua residual a pequeña escala.

En los cultivos en reactores de mayor volumen, la microalga tardó más tiempo en llegar a su fase estacionaria comparando con los resultados de los cultivos en los reactores más pequeños de la primera etapa experimental, en donde la microalga tardó 15 días en llegar a su fase estacionaria.

La variación de pH durante el crecimiento de esta microalga se muestra en la Tabla 63.

Tabla 63. Variación de pH durante el crecimiento de *S. acutus* en agua residual.

Día	Promedio	Desviación estándar
0	8.83	0.05
1	9.06	0.02
2	9.16	0.04
3	9.31	0.04
4	9.45	0.12
7	9.52	0.13
8	9.60	0.13
9	9.74	0.12
10	9.85	0.06
11	9.89	0.11
14	9.92	0.10
15	9.94	0.09
16	9.95	0.08
17	9.99	0.07
18	10.01	0.09
21	9.87	0.13
22	9.67	0.13
23	9.60	0.10

Con los resultados de la Tabla 63 se puede observar que se alcanzaron valores de pH mayores que los alcanzados durante la primera etapa experimental, donde los valores de pH estuvieron por debajo del 9. Sin embargo se muestra la misma tendencia del incremento de pH hasta un valor máximo (10.01) y posteriormente el pH desciende nuevamente.

Se determinó la concentración de nutrientes en el agua residual antes y después del cultivo para determinar los porcentajes de remoción de los diferentes nutrientes (Tabla 64).

Tabla 64. Contenido de nutrientes en el agua residual antes y después de los cultivos de *Scenedesmus*.

		Promedio	Desviación estándar	Porcentaje de remoción
Ortofosfatos (mg/L)	Antes del cultivo	9.1	0.6	73.6
	Después del cultivo	2.4	0.4	
Nitratos (mg/L)	Antes del cultivo	11.6	0.5	69.2
	Después del cultivo	3.6	0.4	
Nitrógeno orgánico y amoniacal (mg/L)	Antes del cultivo	49.7	1.2	93.1
	Después del cultivo	3.4	1.0	
DQO (mg O ₂ /L)	Antes del cultivo	704.4	18.9	79.4
	Después del cultivo	144.8	4.3	

De los resultados obtenidos se puede determinar que las remociones de los nutrientes son similares a las remociones obtenidas en la primera etapa experimental (71.1 % para los nitratos, 93.6 % para el nitrógeno orgánico y amoniacal y 77.6 % para la DQO), el único valor que incrementó fue el valor de remoción de los fosfatos (66.2 % en la primera etapa experimental), lo cual puede deberse a que los cultivos alcanzaron valores de pH de alrededor de 10 con lo cual se produce una precipitación de los fosfatos al reaccionar con el calcio presente en el agua.

5.3.5 Separación de la biomasa

Para poder llevar a cabo la separación de la biomasa del medio de cultivo se realizó una operación de coagulación-floculación utilizando las condiciones óptimas obtenidas con la prueba de jarras. Una vez que se obtuvieron los flóculos de las microalgas se filtraron para así separarlos del agua.

La biomasa obtenida de los cultivos fue secada en una estufa a 60° C durante 24 h. De los cultivos de todos los reactores se obtuvieron 113.69 g de biomasa seca de *S. acutus*, de un total de 123.1 L de agua residual. Esto quiere decir que se obtuvieron 923.6 mg/L de biomasa seca.

El contenido de biomasa seca obtenido en esta etapa experimental fue menor al obtenido en la primera etapa experimental donde se obtuvo un promedio de 1,279 mg/L de biomasa seca (lo que representa una disminución de 355.4 mg/L de de biomasa seca), esto se debe a que en la primera etapa se separó la biomasa por centrifugación y en esta por coagulación-floculación, por lo que hay una menor recuperación de la biomasa. En este caso tampoco hubo un control de la iluminación por lo que esto pudo haber reducido el crecimiento de las microalgas y además al realizar los cultivos a pequeña escala no se obtienen los mismos resultados que a nivel laboratorio.

En la Figura 34 se observa una fotografía tomada a la biomasa de *S. acutus* una vez que se había secado y pulverizado.



Figura 34. Biomasa seca de *S. acutus*

5.3.6 Determinaciones a los lípidos

Después de extraer los lípidos a toda la biomasa obtenida se obtuvieron 34.53 g, lo que equivale a un contenido de 30.4 % de lípidos. Esto representa una concentración de 280.5 mg/L de lípidos en el cultivo, equivalente a una productividad de lípidos de 13.36 mg/L d. Esta productividad es menor a la reportada en la bibliografía para *S. acutus* que es de alrededor de 54 mg/L d, sin embargo el contenido de lípidos es mayor al reportado que es de 21 % (Rodolfi *et al.*, 2009). Estos valores están reportados para cultivos por lotes de esta microalga a nivel laboratorio, son cultivos de aproximadamente 5 días en volúmenes de 250 mL y bajo condiciones controladas y en un medio de cultivo específico. En otra referencia se reporta una productividad de lípidos de 0.54 mg/L d la cual es mucho menor a la obtenida y con solo un 0.9 % de contenido de lípidos (Kim *et al.*, 2007), ese estudio fue realizado con un cultivo de *S. acutus* en agua residual fermentada de una granja de puercos.

Después de la extracción del aceite se realizó una espectroscopía de infrarrojo para determinar que en realidad el extracto obtenido estuviera compuesto por triacilglicerol.

El espectro de infrarrojo se muestra en la Figura 35, donde se aprecian las vibraciones del metilo que se producen a 1459 cm^{-1} ; las vibraciones de los metilenos se dan a 2926 cm^{-1} , a 2855 cm^{-1} y a 723 cm^{-1} ; las vibraciones de los dobles enlaces carbono-carbono se dan alrededor de 3100 cm^{-1} ; las bandas de los ésteres están a 1746 cm^{-1} . Con este espectro de infrarrojo se puede deducir que el extracto realmente se trata de un aceite.

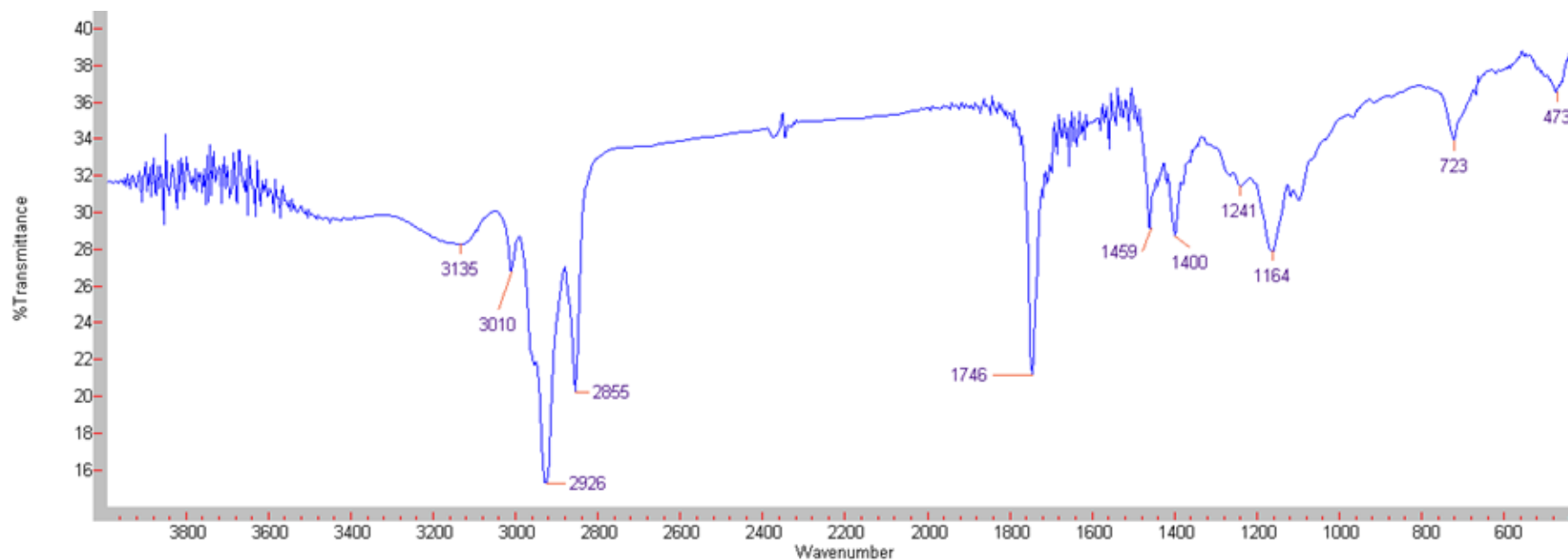


Figura 35. Espectro de infrarrojo del aceite extraído.

Se determinó la densidad del aceite por triplicado obteniéndose una densidad de 0.935 ± 0.003 g/mL. En cuanto a la viscosidad del aceite fue de 65 cP a 25 °C. Estos valores se determinaron para compararlos con los del biodiesel, ya que el biodiesel debe tener una viscosidad y una densidad menores a las del aceite.

Se analizó el valor de acidez de los lípidos, por triplicado, para determinar el contenido de ácidos grasos libres lo que permitió determinar si se tenía que realizar una pre-esterificación con catalizador ácido al aceite. La acidez obtenida fue de 24.2 ± 0.8 mg KOH/g.

La determinación del valor de saponificación del aceite se hizo por triplicado obteniéndose un valor 206.6 ± 2.3 mg KOH/g.

Una vez obtenidos estos valores se puede calcular el peso molecular promedio del aceite mediante la ecuación 1 (Yin *et al.*, 2012):

$$\bar{M} = \frac{(56.1)(3)(1000)}{VS-VA} \quad \text{Ec. 1}$$

en donde 56.1 es el peso molecular del KOH, 3 significa que se necesitan 3 moles de KOH para saponificar 1 mol de aceite, 1000 es la conversión de gramos a miligramos, VS es el valor de saponificación (mg KOH/g) y VA el valor de acidez (mg KOH/g). En el caso del aceite extraído de la microalga se obtuvo un peso molecular promedio de 922.7 g/mol. Cada molécula de aceite es una molécula de glicerol formando enlaces éster con 3 ácidos grasos, por lo que si al aceite le quitamos el peso molecular del glicerol y dividimos el peso restante entre tres obtenemos el peso molecular promedio de los ácidos grasos, mismo que en este caso es equivalente a 276.9 g/mol.

Con el peso molecular promedio del ácido graso y su valor de acidez se puede determinar el porcentaje de ácidos grasos libres que en este caso fue de 11.94 %. Se recomienda hacer biodiesel mediante catálisis básica solo en aceites con contenidos de ácidos grasos menores al 1 % (Tiwari *et al.*, 2007), por lo que el aceite de este estudio requiere una transesterificación primero con catálisis ácida para esterificar los ácidos grasos libres y posteriormente con catálisis básica para esterificar el resto del aceite.

5.3.7 Producción de biodiesel y determinaciones analíticas.

El biodiesel se preparó utilizando 32.69 g de aceite, a los cuales se le agregaron 23.90 mL de metanol. Primero se hizo la esterificación ácida con 272 μ L de ácido sulfúrico. Se dejó reaccionando el aceite durante 1 h a 65 °C. Después de la hora de reacción se adicionó el catalizador básico del cual se agregaron 545 mg. La reacción se dejó una hora a 60° C.

Una vez terminada la reacción se separó la glicerina del biodiesel. Con la glicerina obtenida se calculó el rendimiento de la obtención de biodiesel. Se realizó la reacción con 32.69 g de aceite, de los cuales un 11.94% eran ácidos grasos libres, por lo tanto de aceite se tenían 28.79 g, que es igual a 0.031 mol. Cada mol de aceite genera un mol de glicerol. Después de la reacción se obtuvieron 2.52 g de glicerol, lo que equivale a 0.027 mol de glicerol. Por lo tanto el rendimiento de la reacción fue de 87.7 % (los cálculos se muestran en el anexo A).

Después de la reacción de transesterificación y el lavado del biodiesel se obtuvieron 30.73 g de biodiesel. En la Figura 36 se observa el biodiesel que se obtuvo a partir de los lípidos que se extrajeron de la biomasa seca de *S. acutus*

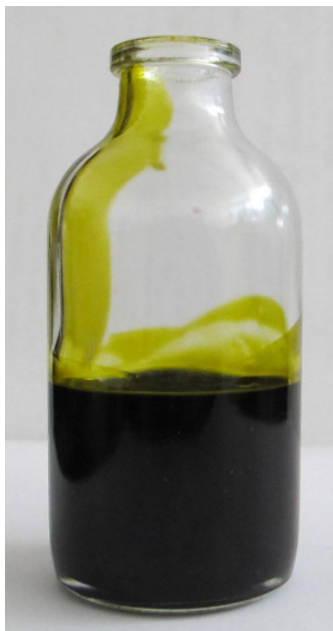


Figura 36. Biodiesel obtenido de los lípidos extraídos de *S. acutus*

Una vez producido el biodiesel se le midió la densidad por triplicado obteniéndose un valor de 0.897 ± 0.003 g/mL. En la norma ASTM D6751 (ASTM, 2003) se menciona que la densidad del biodiesel debe estar entre 0.86 y 0.90 g/mL y en la EN 14214 (EN, 2008) una densidad de entre 860 y 900 kg/m³ a 15 °C. De lo anterior se puede concluir que el biodiesel obtenido cumple con ambas normas para el parámetro de densidad.

La viscosidad del biodiesel fue de 57 cP a 25 °C, menor a la del aceite extraído (65 cP) que era el resultado que se esperaba obtener.

Al biodiesel obtenido se le midió la acidez por triplicado, la cual fue de 1.8 ± 0.05 mg KOH/g. En la norma ASTM D6751 (ASTM, 2003) se marca un valor de acidez del biodiesel de máximo 0.80 mg KOH/g y en la EN 14214 (EN, 2008) un máximo de 0.5 mg KOH/g, por lo que el biodiesel obtenido no cumple con ninguna de las normas en cuanto al valor de acidez, lo cual puede deberse a que quedaron ácidos grasos libres que no reaccionaron.

El índice de yodo del biodiesel se midió por triplicado y se obtuvo un valor de 95.5 ± 1.21 g yodo/100 g. En la norma EN 14214 (EN, 2008) se marca un índice de yodo de máximo 120 g de yodo/100 g para el biodiesel, por lo que el biodiesel obtenido si cumple con la norma para el índice de yodo.

Se realizó una cromatografía de gases del biodiesel para determinar el perfil de ésteres de ácidos grasos del mismo. El cromatograma se muestra en la Figura 37 y se muestra un detalle de los picos obtenidos para los ácidos grasos en la Figura 38.

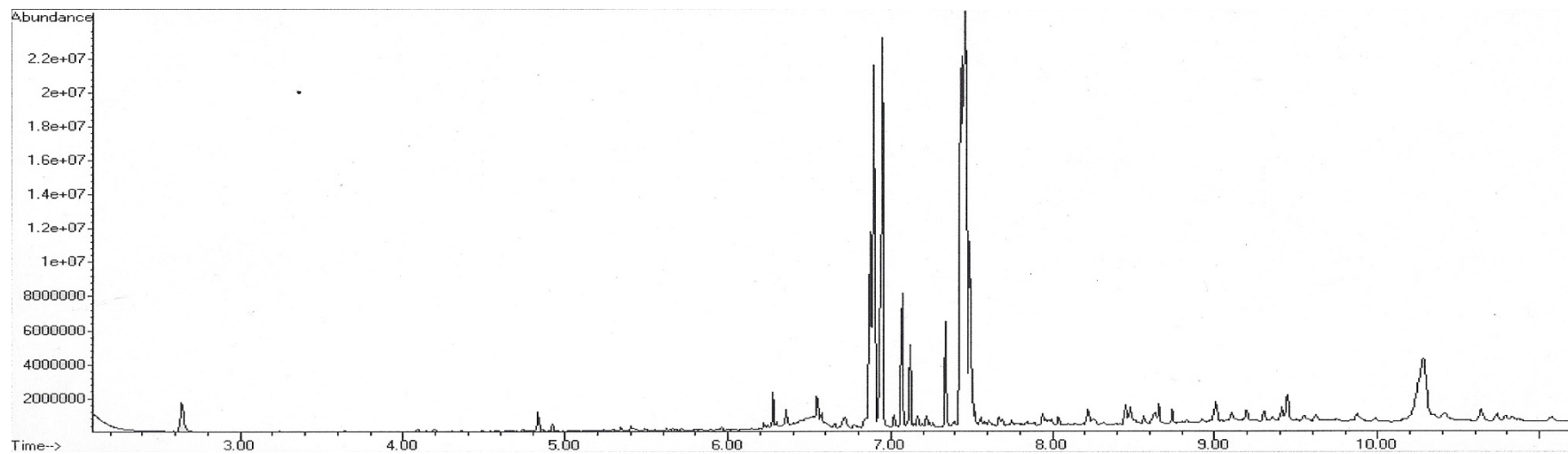


Figura 37. Cromatograma del biodiesel.

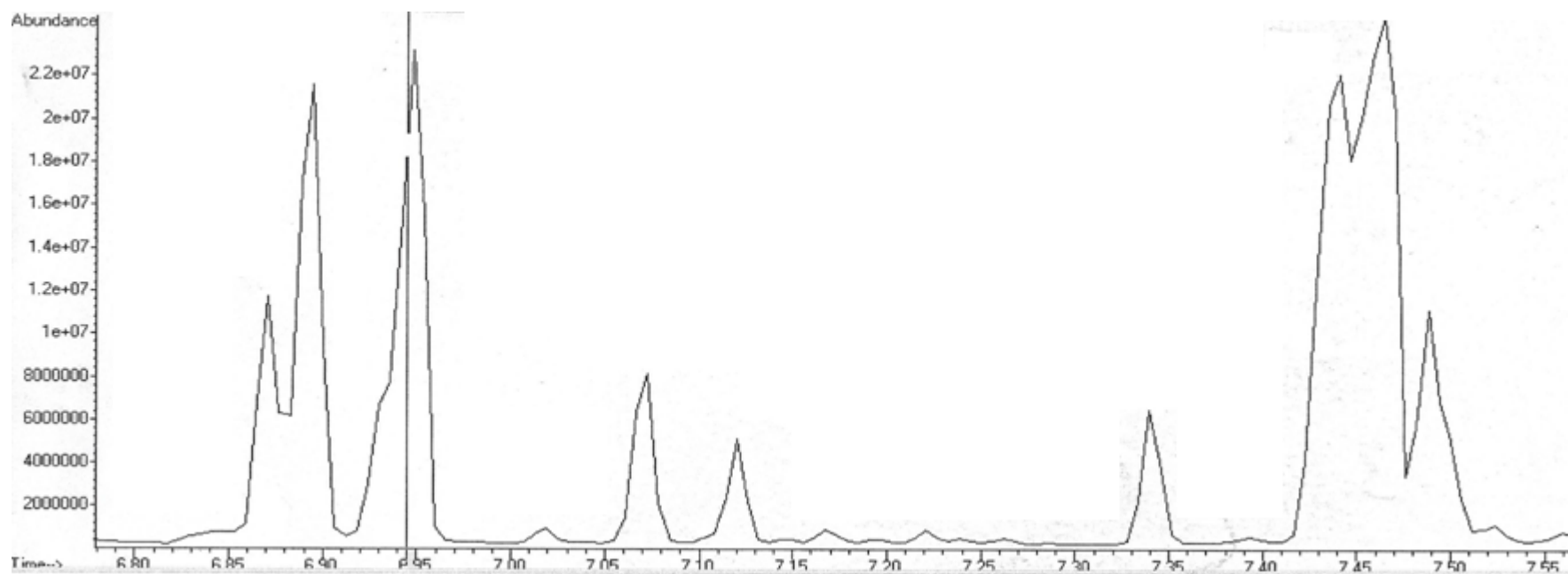


Figura 38. Detalle del cromatograma del biodiesel.

En la Tabla 65 se muestra el porcentaje de los ésteres metílicos de estos ácidos grasos presentes en el biodiesel y el tiempo en el cual aparece el pico de cada uno de los ésteres.

Tabla 65. Contenido de ésteres metílicos de ácidos grasos en el biodiesel.

Éster metílico	Tiempo	Porcentaje
Ácido mirístico (14:0)	6.549 min	5.19
Ácido hexadecadienoico (16:2)	6.865 min	15.65
Ácido hexadecatrienoico (16:3)	6.895 min	
Ácido palmítico (16:0)	6.950 min	13.81
Ácido heptadecanoico (17:0)	7.122 min	1.99
Ácido linoléico (18:2)	7.437 min	31.97
Ácido α -linolénico (18:3)	7.465 min	

En la norma europea EN 14214 (EN, 2008), se marca como límite máximo de un contenido de 12 % en masa del éster metílico del ácido linolénico, sin embargo como en el cromatograma no hubo una buena separación de los picos de los ésteres de los ácidos linoléico y linolénico no se puede comparar el contenido del biodiesel con la norma ya que no se tiene únicamente el porcentaje de ácido linolénico sino el porcentaje de la mezcla de ácido linolénico y de ácido linoléico.

Con este trabajo se pudo determinar que mediante un cultivo de la microalga *S. acutus* en agua residual se puede obtener un agua que está dentro de los parámetros marcados por la NOM-001-SEMARNAT-1996, para nitrógeno total y fósforo. Para la producción de biodiesel se obtiene una producción de biomasa seca de 43.98 mg/L d con un contenido de lípidos de 30.4 % lo que representa una productividad de lípidos de 13.36 mg/L d.

Capítulo 6

Conclusiones

6 Conclusiones

La mayor eficiencia de remoción de nutrientes para los cultivos de la especie *C. vulgaris* se obtuvo en agua residual, siendo de 78.4 % en el caso de los fosfatos, de 66.5 % para los nitratos y de 65.2 % para la DQO; la eficiencia de remoción para el nitrógeno orgánico y amoniacal fue similar en el agua residual y el agua tratada, siendo de 91.5 % y 93 % respectivamente, esto se obtuvo en 13 días de cultivo. Se obtuvo la mayor concentración de biomasa seca en los cultivos de agua residual (1,149 mg/L), con el mayor contenido de lípidos (22.4 %).

Para los cultivos de *S. acutus* se alcanzó una eficiencia de remoción de nutrientes en el agua residual superior a la alcanzada en las otras dos calidades de agua, siendo de 71.1 % para los nitratos, y de 77.3 % para la DQO; en el caso de los fosfatos la eficiencia de remoción fue similar en el agua residual y el agua tratada siendo de 66.2 % y 64.3 % respectivamente, lo mismo sucedió para el nitrógeno orgánico y amoniacal siendo las remociones de 93.6 % y 92.4 % respectivamente, lo cual se obtuvo en un cultivo de 16 días. En el agua residual fue donde se obtuvo la mayor concentración de biomasa seca (1,279 mg/L) con el mayor contenido de lípidos (28.3 %).

En los cultivos de *A. maxima* en agua residual se obtuvo la mayor eficiencia de remoción para la DQO, siendo de 58.9 %, en el caso del nitrógeno orgánico y amoniacal la mayor eficiencia de remoción se alcanzó en el agua tratada siendo de 85.3 %. Para los fosfatos las eficiencias de remoción en el agua tratada y el agua residual fueron similares, de 57.7 % y 56.2 % respectivamente, algo parecido se obtuvo para los nitratos siendo las eficiencias de remoción de 57.2 % y 58.9 % respectivamente, después de 14 días de cultivo. En este caso la mayor concentración de biomasa seca se obtuvo en los cultivos en fertilizante, obteniéndose 0.957 mg/L, pero el mayor contenido de lípidos se obtuvo para los cultivos en agua residual, el cual fue de 13.8 %.

Se determinó que la microalga *S. acutus* fue la que tuvo el mayor contenido de biomasa seca (1.279 g/L) y lípidos (28.3 % en base seca) obtenido en los cultivos en agua residual, teniendo un contenido de lípidos un 5.9 % mayor que la microalga *C. vulgaris* y un 14.9 % mayor que *A. maxima*, por esta razón se eligió esta microalga para llevar a cabo la producción de biodiesel.

En los cultivos de *S. acutus* en agua residual en la segunda etapa experimental se obtuvo un mayor contenido de lípidos que en la primera etapa experimental (30.4 %), sin embargo se obtuvo un 28 % menos de concentración de biomasa seca. Si estos resultados se extrapolaran a cultivos de 1 m³ en agua residual se podrían obtener 0.92 kg de biomasa seca, de los cuales se extraerían 0.28 kg de lípidos para preparar 0.26 kg de biodiesel, sin embargo se debe tener en cuenta que a mayor escala hay una menor productividad.

Recomendaciones

Para la realización de trabajos futuros se recomienda probar otras especies de microalgas que pudieran tener un mayor contenido de lípidos al cultivarlas en agua residual.

Se deberían realizar los cultivos en volúmenes mayores de agua residual para determinar la cantidad de biomasa y contenido de lípidos obtenidos en estos cultivos.

Para determinar si es factible producir biodiesel mediante el cultivo de algas en agua residual se debería hacer un análisis económico y ambiental del proceso.

Capítulo 7

Referencias

7 Referencias

- Abou-Shanab R.A., Ji M.K., Kim H.C., Paeng K.J. y Jeon B.H. (2013). *Microalgal species growing on piggery wastewater as a valuable candidate for nutrient removal and biodiesel production*. Journal of Environmental Management 115:257-264.
- Akbar E., Yaakob Z., Kamarudin S.K. Ismail M. y Salimon J. (2009). *Characteristic and Composition of Jatropha Curcas Oil Seed from Malaysia and its Potential as Biodiesel Feedstock*, European Journal of Scientific Research 29(3):396-403.
- Amaro H.M., Guedes A.C. y Malcata F.X. (2010). *Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel*, Applied Energy 88(10): 3402-3410.
- AOCS, American Oil Chemists Society. (1988). Official Methods and Recommended Practices EUA 3rd Edition.
- APHA, American Public Health Association (1998). *Standard methods for the examination of water and wastewater*, EUA.
- ASTM, American National Standard Method. (2000) Standard Test Method Kinematic Viscosity of Transparent and Opaque Liquids (and the Calculation of Dynamic Viscosity) ASTM D 445-04.
- ASTM, American National Standard Method. (2003) *Standard Test Method for Acid and Base Number by Color-Indicator Titration* ASTM D 974-02.
- ASTM, American National Standard Method (2003). *Specification for Biodiesel Fuel (B100) Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels* ASTM D6571-03a.
- Amin S. (2009). Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae, Energy Conversion and Management 50:1834–1840.
- Aslan S. y Kapdan I.K. (2006). *Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae*. Ecological Engineering 28(1):64–70.
- Balat M. y Balat H. (2010). *Progress in biodiesel processing*, Applied Energy 87:1815–1835.
- Buttiglieri G. y Knepper T.P. (2008). *Removal of Emerging Contaminants in Wastewater Treatment: Conventional Activated Sludge Treatment*, The Handbook of Environmental Chemistry 5:1-35.
- Cai T., Park S.Y. y Li Y. (2013). *Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects*, Renewable and Sustainable Energy Reviews 19:360–369.
- Cardoño F., Ríos L. y Franco A. (2010). *Producción de biodiesel de aceite crudo de palma mediante catálisis heterogénea*, Revista de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Antioquia 51:81-86.
- Chen C.Y., Yeh K.L., Aisyah R., Lee D.J. y Chang J.S. (2011). *Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review*, Bioresource Technology 102(1):71-81.
- Chinnasamy S., Bhatnagar A., Hunt R.W. y Das K.C. (2010). *Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications*, Bioresource Technology 101(9):3097-3105.
- Chisti Y. (2007). *Biodiesel from microalgae*, Biotechnology Advances 25(3): 294-306.
- Cho S., Le, N., Par, S., Y, J., Luon, T.T., Oh Y-K. y Lee T. (2013). *Microalgae cultivation for bioenergy production using wastewaters from a municipal WWTP as nutritional sources*, Bioresource Technology 131:515-520.
- Divakaran R. y Pillai V.N.S. (2002). *Flocculation of algae using chitosan*, Journal of Applied Phycology 14(5):419-422.
- EN, European Standard EN 14214. (2008). *Automotive fuels - Fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines - Requirements and test methods*.
- EN, European Standard EN 14111 (2003). *Fat and oil derivatives – Fatty acid methyl esters (FAME) – Determination of iodine value*.
- Feng Y., Li C. y Zhang D. (2011). *Lipid production of Chlorella vulgaris cultured in artificial wastewater medium*, Bioresource Technology 102:101–105.

- Godos I., Blanco S., García-Encina P.A., Becares E. y Muñoz R. (2009). *Long-term operation of high rate algal ponds for the bioremediation of piggery wastewaters at high loading rates*, *Bioresource Technology* 100(19):4332-4339.
- Gong Y. y Jiang M. (2011). *Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel*, *Biotechnology Letters* 33(7):1269–1284.
- Gouveia L. y Oliveira A.C. (2009). *Microalgae as a raw material for biofuels production*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36:269–274.
- Granados M.R., Ación F.G., Gómez C., Fernández-Sevilla J.M. y Molina Grima E. (2012). *Evaluation of flocculants for the recovery of freshwater microalgae*, *Bioresource Technology* 118:102-110.
- Grayburn W. S., Tatara R. A., Rosentrater K. A. y Holbrook G. P. (2013). *Harvesting, oil extraction, and conversion of local filamentous algae growing in wastewater into biodiesel*, *International Journal of Energy and Environment* 4(2):185-190.
- Griffiths M.J. y Harrison S.T.L. (2009). *Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production*, *Journal of Applied Phycology* 21(5):493–507.
- Hernández J.P., de-Bashan L.E. y Bashan Y. (2006). *Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella* spp. co-immobilized with *Azospirillum brasilense**, *Enzyme and Microbial Technology* 38 (1-2):190-198.
- Hoffmann J.P. (1998). *Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae*, *Journal of Phycology* 34(5):757–763.
- Hu Q., Sommerfeld M., Jarvis E., Ghirardi M., Posewitz M., Seibert M. y Darzins A. (2008). *Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances*, *Plant Journal* 54(4):621-39.
- Ip S.Y., Bridger J.S., Chin C.T., Martin W.R.B. y Raper, W.G.C. (1982). *Algal growth in primary settled sewage – the effects of five key variables*. *Water Research* 16:621–632.
- Kargbo D.M. (2010). *Biodiesel production from municipal sewage sludges*, *Energy Fuels* 24(5):2791–2794.
- Kim J., Lingaraju B.P., Rheume R., Lee J.Y. y Siddiqui K.F. (2010). *Removal of Ammonia from Wastewater Effluent by *C. vulgaris**, *Tsinghua Science and Technology* 15(4): 391-396.
- Kim M.K., Park J.W., Park C.S., Kim S.J., Jeune K.H., Chang M.U. y Acreman J. (2007). *Enhanced production of *Scenedesmus* spp. (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater*, *Bioresource Technology* 98: 2220–2228.
- Knothe G. (2005). *Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters*, *Fuel Processing Technology* 86:1059– 1070.
- Knothe G., Krahl J. y Van Gerpen J. (2010). *The Biodiesel Handbook*. AOCS Press. 2a edición EUA.
- Kong Q., Li L., Martinez B., Chen P. y Ruan R. (2010). *Culture of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in wastewater for biomass feedstock production*, *Applied Biochemical Biotechnology* 160(1):9–18.
- Lee S.H., Ahn C.Y., Jo B.H., Lee S.A., Park J.Y., An K.G. y Oh H.M. (2013). *Increased microalgae growth and nutrient removal using balanced N:P ratio in wastewater*, *Journal of. Microbiology and Biotechnology* 23(1):92–98.
- Ma F. y Hanna M.A. (1999). *Biodiesel production: a review*, *Bioresource Technology* 70 (1):1-15.
- Mandal S. y Mallick N. (2010). *Waste utilization and biodiesel production by the green microalga *Scenedesmus obliquus**, *Applied Environmental Microbiology* 77(1):374-377.
- Mara, Duncan y Horan, Nigel. (2003). *Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. Academic Press. EUA.
- Mata T.M., Martins A.A. y Caetano N.S. (2010). *Microalgae for biodiesel production and other applications: A review*, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14(1):217–232.
- Martínez M.E., Sánchez S., Jiménez J.M., El Yousfi F. y Muñoz L. (2000). *Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus**, *Bioresource Technology* 73(3):263-272.

- Moazami N., Ranjbar R., Ashori A., Tangestani M., Nejad A.S. (2011). *Biomass and lipid productivities of marine microalgae isolated from the Persian Gulf and the Qeshm Island*. *Biomass and bioenergy* 35(5):1935-1939.
- Mousdale, D.M. (2008). *Biofuels. Biotechnology, Chemistry, and Sustainable Development*. CRC Press. EUA.
- Mulbry W., Kondrad S. y Buyer J. (2008). *Treatment of dairy and swine manure effluents using freshwater algae: fatty acid content and composition of algal biomass at different manure loading rates*, *Journal of Applied Phycology* 20(6):1079-1085.
- Muñoz R., Guieysse B. (2006). *Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review*, *Water Research* 40(15):2799-2815.
- Naik M., Meher L.C., Naik S.N. y Das L.M. (2008). *Production of biodiesel from high free fatty acid Karanja (Pongamia pinnata) oil*, *Biomass and Bioenergy* 32(4):354-357.
- Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.
- Olguín E.J. (2003). *Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes*, *Biotechnology Advances* 22 (1-2): 81–91.
- Olguín E.J., Hernández B., Araus A., Camacho R., González R., Ramírez M.E., Galicia S. y Mercado G. (1994). *Simultaneous high-biomass protein production and nutrient removal using Spirulina maxima in sea water supplemented with anaerobic effluents*, *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 10:576-578.
- Órpez R., Martínez E., Hodaifa G., El Yousfi F., Jbari N. y Sánchez S. (2009). *Growth of the microalga Botryococcus braunii in secondarily treated sewage*, *Desalination* 246:625–630.
- Patel A., Barrington S. y Lefsrud M. (2012). *Microalgae for phosphorus removal and biomass production: a six species screen for dual-purpose organisms*. *Global Change Biology Bioenergy* 4:485–495.
- Park J., Jin H.F., Lim B.R., Park K.Y. y Lee K. (2010). *Ammonia removal from anaerobic digestion effluent of livestock waste using green alga S. acutus*, *Bioresource Technology* 101(22):8649-8657.
- Pittman J.K., Dean A.P. y Osundeko O. (2011). *The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources*, *Bioresource Technology* 102(1): 17-25.
- Rawat I., Ranjith Kumar R., MutandavT. y Bux F. (2010). *Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production*, *Applied Energy* 88(10):3411-3424.
- Rodolfi L., Chini Zittelli G., Bassi N., Padovani G., Biondi N., Bonini G. yTredici M.R. (2009). *Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor*, *Biotechnology and Bioengineering* 102(1):100-112
- Safonova E., Kvitko K.V., Iankevitch M.I., Surgko L.F., Afti I.A. y Reisser W. (2004). *Biotreatment of industrial wastewater by selected algal-bacteria consortia*, *Engineering in Life Sciences* 4(4):347-353.
- Sakthivel R., Elumalai S. y Mohommad arif M. (2011). *Microalgae lipid research, past, present: A critical review for biodiesel production, in the future*, *Journal of Experimental Sciences* 2(10): 29-49.
- Sathish A. y Sims R.C. (2012). *Biodiesel from mixed culture algae via a wet lipid extraction procedure*. *Bioresource Technology* 118:643–647.
- Satyanarayana K.G., Mariano A.B. y Vargas J.V.C. (2011). *A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials*, *International Journal of Energy Research* 35(4):291–311.
- Schenk P.M., Thomas-Hall S.R., Stephens E., Marx U.C., Mussgnug J.H., Posten C., Kruse O. y Hankamer B. (2008). *Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production*, *BioEnergy Research* 1(1):20-43.
- Singh A. y Olsen S.I. (2011). *A critical review of biochemical conversion, sustainability and life cycle assessment of algal biofuels*, *Applied Energy* 88(10):3548–3555.
- Sturm S.M.B. y Lamer L.S. (2011). *An energy evaluation of coupling nutrient removal from wastewater with algal biomass production*, *Applied Energy* 88:3499–3506.

- Sydney E.B., da Silva T.E., Tokarski A., Novak A.C., de Carvalho J.C., Woiciechowski A.L., Larroche C. y Soccol C.R. (2010). *Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage*, Applied Energy 88(10):3291-3294.
- Tiwari A.K., Kumar A. y Raheman H. (2007). *Biodiesel production from jatropha oil (Jatropha curcas) with high free fatty acids: An optimized process*, Biomass and Bioenergy 31:569–575.
- EPA; US Environmental Protection Agency. (2002). *A comprehensive analysis of biodiesel impacts on exhaust emissions*. Draft technical report EPA420-P02-001. EUA.
- Verma N.M., Mehrotra S., Shukla A. y Mishra B.N. (2010). *Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories: A comprehensive discussion*, African Journal of Biotechnology 9(10):1402-1411.
- Wang L., Li Y., Chen P., Min M., Chen Y., Zhu J. y Ruan R. R. (2010). *Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae C. vulgaris*, Bioresource Technology 101:2623–2628.
- Wang L., Min M., Li Y., Chen P., Chen Y., Liu Y., Wang Y. y Ruan R. (2010). *Cultivation of green algae C. vulgaris in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant*, Applied Biochemistry Biotechnology 162(4):1174-1186.
- Wang H, Xiong H, Hui Z y Zeng X. (2012). *Mixotrophic cultivation of Chlorella pyrenoidosa with diluted primary piggery wastewater to produce lipids*, Bioresource Technology 104:215–220.
- Wilde E.W. y Benemann J.R. (1993). *Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae*, Biotechnology Advances 11(4):781-812.
- Woertz I., Feffer A., Lundquist T. y Nelson Y. (2009). *Algae grown on dairy and municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and lipid production for biofuel feedstock*, Journal of Environmental Engineering 135(11): 1115-1122.
- Wu P.F., Teng, J.C., Lin, Y.H. y Hwang S.J. (2013). *Increasing algal biofuel production using Nannochloropsis oculata cultivated with anaerobically and aerobically treated swine wastewater*, Bioresource Technology 133:102-108.
- Yin, X., Ma, H., You, Q., Wang, Z. y Chang, J. (2012). *Comparison of four different enhancing methods for preparing biodiesel through transesterification of sunflower oil*. Applied Energy 91:320–325.
- Zhou W., Min M, Li Y, Hu B, Ma X, Cheng Y, Liu Y, Chen P y Ruan R. (2012). *A hetero-photoautotrophic two-stage cultivation process to improve wastewater nutrient removal and enhance algal lipid accumulation*. Bioresource Technology 110:448–455.

Capítulo 8

Anexos

8 Anexos

8.1 Anexo A. Cálculos para la producción del biodiesel.

El biodiesel se preparó utilizando 32.69 g de aceite, el peso molecular promedio de los ácidos grasos es de 276.9 g/mol.

$$32.69 \text{ g} \left(\frac{1 \text{ mol}}{276.9 \text{ mol}} \right) = 0.118 \text{ mol}$$

Se tienen 0.118 mol de ácido graso y se tienen que agregar 5 veces esta cantidad de metanol, lo cual equivale a 0.59 mol de metanol.

$$0.59 \text{ mol} \left(\frac{32 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \right) \left(\frac{1 \text{ mL}}{0.7918 \text{ g}} \right) = 23.86 \text{ mL}$$

Se agregaron al aceite 23.9 mL de metanol.

El catalizador utilizado fue ácido sulfúrico que se agregó en 1.5 % en peso respecto al aceite, lo que equivale a 0.49 g de H_2SO_4 que está al 98 % de pureza.

$$0.49 \text{ g} \left(\frac{1 \text{ mL}}{1.84 \text{ g}} \right) \left(\frac{100 \text{ mL}}{98 \text{ mL}} \right) = 271.9 \mu\text{L}$$

Se agregaron 272 μL de ácido sulfúrico al aceite. Después de llevar a cabo la reacción con el catalizador ácido se requería neutralizar el ácido y agregar la cantidad de catalizador básico deseado.

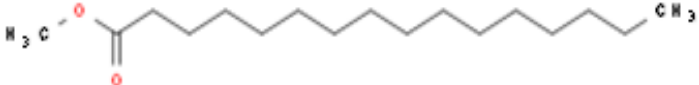
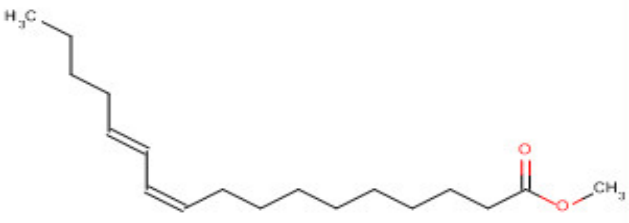
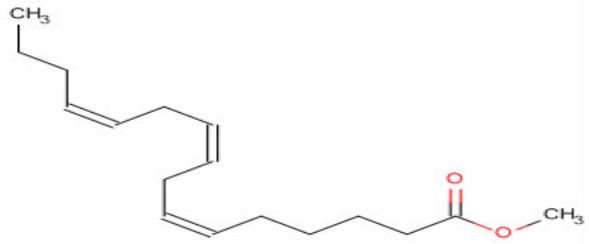
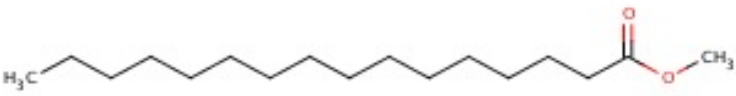
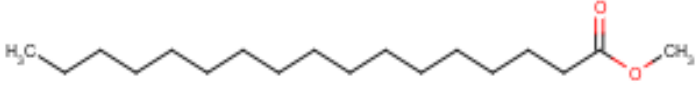
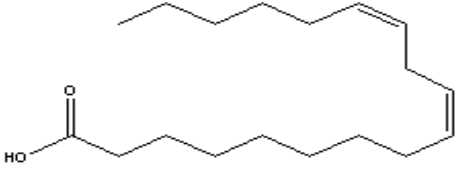
El catalizador básico utilizado fue metóxido de sodio. Para neutralizar el ácido sulfúrico se agregó la siguiente cantidad de metóxido de sodio (MeONa).

$$0.272 \text{ mL} \left(\frac{1.84 \text{ g}}{1 \text{ mL}} \right) \left(\frac{98 \text{ mL}}{100 \text{ mL}} \right) \left(\frac{1 \text{ mol}}{98.1 \text{ g}} \right) = 0.005 \text{ mol de } \text{H}_2\text{SO}_4$$

$$0.005 \text{ mol } \text{H}_2\text{SO}_4 \left(\frac{2 \text{ mol MeONa}}{1 \text{ mol } \text{H}_2\text{SO}_4} \right) \left(\frac{54 \text{ g}}{1 \text{ mol MeONa}} \right) = 0.5398 \text{ g}$$

Se adicionaron 540 mg del catalizador básico para neutralizar el ácido y 5 mg como catalizador.

8.2 Anexo B. Fórmula y estructura de los ésteres metílicos de los ácidos grasos presentes en el biodiesel.

Nombre común	Nombre IUPAC	Fórmula semidesarrollada y estructura
Ácido mirístico	Ácido tetradecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOCH}_3$ 
-	Ácido hexadecadienoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{COOCH}_3$ 
-	Ácido hexadecatrienoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOCH}_3$ 
Ácido palmítico	Ácido hexadecadienoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOCH}_3$ 
-	Ácido heptadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{COOCH}_3$ 
Ácido linoleico	18:2cΔ ^{9,12} (ω-6) Ácido cis, cis-9,12-octadecadienoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOCH}_3$ 
Ácido α-linolénico	18:3cΔ ^{9,12,15} (ω-3) Ácido cis,cis,cis-9,12,15-octadecatrienoico	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOCH}_3$ 