



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DEL MÉTODO DE
SEDIMENTACIÓN PARA LA COSECHA DE MICROALGAS CON
POTENCIAL PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

PRESENTA:

EDITH RIVERA LUCERO

DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. ISaura YÁÑEZ NOGUEZ

ASESOR INTERNO:

M. EN C. GERMÁN CALVA VÁSQUEZ

CIUDAD DE MÉXICO, 2018





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



El trabajo experimental fue realizado en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería que cuenta con certificación de la calidad ISO 9001:2008 otorgada por el Instituto Mexicano de la Normalización y Certificación, A. C. (IMNC) con registro SRGC 960 de fecha 11 de enero de 2016 vigente al 11 de enero de 2019.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, mi casa y orgullo, por brindarme la oportunidad de ser parte de su comunidad y llevar a cabo mi formación académica en sus instalaciones.

Agradezco al Fondo Sectorial CONACYT-SENER-Sustentabilidad Energética por la beca brindada para la realización de la presente tesis dentro del Proyecto “Nuevas tecnologías para la obtención de biocombustibles a partir de microalgas cultivadas en aguas residuales” Solicitud 220704.

A mi directora de tesis, la M. en C. Isaura Yáñez Noguez, por todo el apoyo y la confianza que me brindo durante mi estancia en el Instituto, porque sin ayuda no hubiera sido posible la realización de esta tesis, muchas gracias Maestra.

A la Dra. María Teresa Orta Ledesma por brindarme la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo.

A mi asesor interno, M. en C. Germán Calva Vásquez y a mi jurado asignado, M. en C. Armando Cervantes Sandoval, Bióloga Angélica Elaine González Schaff y M. en F. Idalia Leticia Flores Gómez., por sus valiosas observaciones y comentarios que me permitieron enriquecer el contenido de este trabajo.

A mis compañeros de cubículo Regina, Andrea, Tere, Santiago, Isaac, Rebeca y Erick les agradezco infinitamente por su ayuda para poder llevar a cabo este trabajo.

Al Instituto de Ingeniería y al personal del Laboratorio de Ingeniería Ambiental, por permitirme realizar mi tesis en esta institución.

Muchas gracias...

DEDICATORIAS

A mis padres Enrique Rivera y Juana Lucero, a Dios agradezco que ustedes sean el pilar en mi vida, porque todas las enseñanzas que he recibido de su parte me han impulsado a seguir adelante, este logro es de ustedes.

A mi hermana Erika, muchas gracias por siempre estar a mi lado, por apoyarme todas la veces que sentí que simplemente ya no podía y alentarme a seguir adelante, te amo hermana.

A mi hermano Edgar gracias por todas las risas compartidas con tus ocurrencias, ustedes son los mejores hermanos del mundo, te amo hermano.

A Joaly y Santiago, porque con sus risas y alegría me han enseñado lo que realmente vale la pena en esta vida, los adoro mis niños.

A Sadai, pequeño milagro de vida, gracias por luchar para quedarte con nosotros.
A Natalia, que también has llegado a esta vida a enseñarme a ser una mejor persona cada día, las adoro pequeñas.

A mí querido amigo Aldo, porque hace más de 10 años que inicio esta amistad siempre has estado conmigo, no pude haber encontrado una mejor persona en la cual confiar, te quiero amigo.

A Fernanda, gracias porque eres una gran amiga y has estado conmigo dándome ánimos a lo largo de este proceso.

A las personas que tuve el placer de conocer en la FES y que formaron parte importante de ese camino recorrido, gracias por todos los momentos divertidos que tuvimos y porque sin ustedes la estancia en la Facultad no hubiera sido igual.

**“Mejor es adquirir sabiduría que oro preciado; y adquirir
inteligencia vale más que la plata”**

(Proverbios 16:16)

“La mente es como un paracaídas, sólo funciona si se abre”

(Albert Einstein)

**“Lo que hace al desierto tan bello es que esconde un pozo de
agua en algún lado”**

(Antoine de Saint-Exupéry)

“El tiempo es el mejor autor: siempre encuentra el final perfecto”

(Charles Chaplin)

**“Solamente cuando vea el último árbol derrumbado, o el último
animal extinto y el último río contaminado, el hombre verá que no
se puede comer dinero”**

(Proverbio indígena)

ÍNDICE

RESUMEN	12
INTRODUCCIÓN	13
1. MARCO TEÓRICO	15
1.1 Panorama energético mundial	15
1.2 Sector energético en México	16
1.3 Biocombustibles	17
1.3.1 Clasificación de los biocombustibles	17
1.4 Microalgas	18
1.4.1 Composición bioquímica de las microalgas.....	20
1.4.2 Características de <i>Scenedesmus obliquus</i>	22
1.4.3 Características de <i>Desmodesmus</i> spp.	23
1.5 Sistemas de cultivo	24
1.5.1 Parámetros a considerar en un sistema de cultivo	24
1.6 Aguas residuales	26
1.7 Lixiviados de rellenos sanitarios	27
1.7.1 Composición típica de los lixiviados.....	28
1.8 Cosecha de microalgas	30
1.8.1 Centrifugación	30
1.8.2 Coagulación-floculación	30
1.8.3 Ozonoflotación	31
1.8.4 Sedimentación por gravedad	31
2. ANTECEDENTES	35
3. HIPÓTESIS	38
4. OBJETIVOS	38
4.1 Objetivo general	38
4.2 Objetivos específicos	38
5. MATERIALES Y MÉTODOS	39
5.1 Muestreo de agua residual y lixiviado	40
5.2 Caracterización fisicoquímica de agua residual y lixiviado.	40
5.3 Cultivo de microalgas en agua residual enriquecida con lixiviado	42
5.3.1 Curva de crecimiento, remoción de nutrientes y monitoreo de biomoléculas	44
5.3.2 Observación microscópica de cultivos al inicio y final de curva de crecimiento ...	46
5.4 Pruebas de cosecha mediante sedimentación por gravedad.....	47
6. RESULTADOS Y ANÁLISIS	50
6.1 Caracterización de agua residual y lixiviado	50
6.2 Cultivo de microalgas en agua residual enriquecida con lixiviado	51
6.2.1 Curva de crecimiento	51
6.2.2 Remoción de nutrientes	54
6.2.3 Cuantificación de carbohidratos y lípidos	59
6.2.4 Observación microscópica al inicio y final de la curva.....	61
6.2.5 Observación microscópica después de la cosecha	64
6.3 Pruebas de cosecha mediante sedimentación por gravedad.....	66
6.3.1 Medición periódica de turbidez	66
6.4 Evaluación de la efectividad de la sedimentación para la recuperación de biomasa.....	72
6.4.1 Curvas de sedimentación de <i>S. obliquus</i> y el cultivo mixto	72
6.4.2 Porcentaje de recuperación de biomasa carbohidratos y lípidos	75
6.4.3 Ventajas y desventajas de la sedimentación como método de cosecha.....	80

7. CONCLUSIONES	82
8. LITERATURA CITADA.....	83
9. ANEXO ESTADÍSTICO	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción mundial de energía primaria	15
Figura 2. Productos principales de las reacciones de luz y oscuridad.....	21
Figura 3. Proceso general para la recuperación de biomasa	33
Figura 4. Diagrama general de la metodología	39
Figura 5. Cultivo de <i>S. obliquus</i> en agua residual (a) y agua residual enriquecida con lixiviado (b); cultivo mixto con agua residual (c) y agua residual enriquecida con lixiviado (d)	43
Figura 6. Secado de biomasa en estufa a 105° C.....	44
Figura 7. Conteo de cultivo mixto en cámara de Neubauer	47
Figura 8. Sedimentación de cultivo de <i>S. obliquus</i> en conos imhoff.....	48
Figura 9. Curva de crecimiento de <i>S. obliquus</i> en agua residual y agua residual enriquecida con lixiviado.....	52
Figura 10. Curva de crecimiento de cultivo mixto en agua residual y agua residual enriquecida con lixiviado.....	53
Figura 11. Remoción de nutrientes en el cultivo de <i>S. obliquus</i> en agua residual	54
Figura 12. Remoción de nutrientes en el cultivo de <i>S. obliquus</i> en agua residual enriquecida con lixiviado.....	55
Figura 13. Remoción de nutrientes en el cultivo mixto (<i>S. obliquus-Desmodesmus</i> spp.) en agua residual.....	55
Figura 14. Remoción de nutrientes en el cultivo mixto (<i>S. obliquus-Desmodesmus</i> spp.) en agua residual enriquecida con lixiviado.....	56
Figura 15. Porcentaje de carbohidratos y lípidos en cultivo de <i>S. obliquus</i> en agua residual y agua residual enriquecida con lixiviado	60
Figura 16. Porcentaje de carbohidratos y lípidos en cultivo mixto (<i>S. obliquus-Desmodesmus</i> spp.) en agua residual y agua residual enriquecida con lixiviado.....	60
Figura 17. Cultivo de <i>S. obliquus</i> al inicio de la curva de crecimiento	61
Figura 18. Cultivo de <i>S. obliquus</i> al final de la curva de crecimiento.....	62
Figura 19. Cultivo mixto (<i>S. obliquus-Desmodesmus</i> spp.) al inicio de la curva de crecimiento	63

Figura 20. Cultivo mixto (<i>S. obliquus-Desmodesmus</i> spp.) al final de la curva de crecimiento.....	64
Figura 21. Cultivo de <i>S. obliquus</i> después de la cosecha	65
Figura 22. Cultivo mixto (<i>S. obliquus-Desmodesmus</i> spp.) después de la cosecha	66
Figura 23. Proceso de sedimentación <i>S. obliquus</i> en agua residual y agua residual enriquecida con lixiviado	68
Figura 24. Proceso de sedimentación de cultivo mixto (<i>S. obliquus-Desmodesmus</i> spp.) en agua residual y agua residual enriquecida con lixiviado	70
Figura 25: Sedimentación <i>S. obliquus</i> por mediciones de turbidez.....	72
Figura 26: Sedimentación <i>S. obliquus</i> por mediciones de volumen sedimentado.....	73
Figura 27. Sedimentación de cultivo mixto (<i>S. obliquus-Desmodesmus</i> spp.) por mediciones de turbidez.....	74
Figura 28. Sedimentación de cultivo mixto (<i>S. obliquus-Desmodesmus</i> spp.) por mediciones de volumen sedimentado	74
Figura 29. pH de <i>S. obliquus</i> durante la curva de crecimiento.	79
Figura 30. pH de cultivo mixto durante la curva de crecimiento	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características del lixiviado según su edad.....	29
Tabla 2. Ventajas y desventajas de los diferentes métodos de cosecha	34
Tabla 3. Métodos analíticos para la determinación de los parámetros fisicoquímicos en agua residual y lixiviado	41
Tabla 4: Composición de los cultivos utilizados	43
Tabla 5. Características fisicoquímicas promedio de agua residual y lixiviado.....	50
Tabla 6. Biomasa y productividad de los cultivos de <i>S. obliquus</i> y cultivos mixtos	53
Tabla 7. Remoción de nutrientes	58
Tabla 8. Porcentaje de recuperación de biomasa, carbohidratos y lípidos	75
Tabla 9. ANOVA para porcentaje de recuperación de biomasa en cultivos de <i>S. obliquus</i>	76
Tabla 10. ANOVA para porcentaje de recuperación de biomasa en cultivos Mixtos	76
Tabla 11. ANOVA para porcentaje de recuperación de biomasa	77
Tabla 12. Ventajas y desventajas del uso de la sedimentación como método de cosecha	81

ABREVIATURAS

AGV: Ácidos Grasos Volátiles

AIE: Agencia Internacional de la Energía

APHA: American Public Health Association

CAC: Captación y Almacenamiento de Carbono

DBO: Demanda Bioquímica de Oxígeno

DQO: Demanda Química de Oxígeno

FBRs: Fotobiorreactores

GEI: Gases de Efecto Invernadero

GLP: Gas Licuado de Petróleo

HMF: 5-hidrometilfurfural

INEGEI: Inventario Nacional de Emisiones de Gases de Efecto Invernadero

MMtep: Millones de toneladas equivalentes de petróleo

Mmbpce: Millones de barriles de petróleo crudo equivalente

NOM: Norma Oficial Mexicana

PET: Tereftalato de polietileno

PJ: Pentajoules

PTAR: Planta de Tratamiento de Aguas Residuales

RSU: Residuos Sólidos Urbanos

SEMARNAT: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales

SENER: Secretaría de Energía

SST: Sólidos Suspendidos Totales

TAG: Triacilglicérols

RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el fin de evaluar la efectividad del método de sedimentación para la cosecha de microalgas en un cultivo de *Scenedesmus obliquus* y un cultivo mixto (*Scenedesmus obliquus-Desmodesmus* spp). Las microalgas se cultivaron en agua residual (grupo control) y agua residual enriquecida con lixiviado en una proporción del 10% (grupo experimental). En estos cultivos se evaluó la producción de biomasa, la remoción de nutrientes y la cuantificación de carbohidratos y lípidos. Para la evaluación de la sedimentación los cultivos fueron colocados en conos imhoff y puestos a sedimentar durante un lapso de 10080 minutos (7 días). Se obtuvo que para el cultivo de *S. obliquus* la recuperación de biomasa fue del 36% en agua residual y 37% en agua residual enriquecida con lixiviado mientras para el cultivo mixto fue del 72% y 73% respectivamente. Se determinaron las ventajas y desventajas del uso de la sedimentación como método de cosecha. Por lo que a partir de los resultados obtenidos se concluye que: a) el porcentaje de lixiviado utilizado afectó la producción de biomasa; b) los cultivos de *S. obliquus* y *Desmodesmus* spp. son una opción para el tratamiento de lixiviados; c) el tipo de microalga utilizada influye directamente en el proceso de sedimentación; d) la principal desventaja de la sedimentación es el tiempo que se invierte en dicho método.

INTRODUCCIÓN

Actualmente existen dos grandes problemas que enfrenta el mundo en el área energética: la disminución de las reservas petroleras y la contaminación causada por la quema de combustibles fósiles.

Durante muchas décadas los combustibles fósiles han sido la principal fuente de energía y también el principal motor de la economía mundial, sin embargo, no se han descubierto nuevos yacimientos petroleros de gran importancia o impacto en la producción mundial, la Agencia Internacional de la Energía (AIE) señala la necesidad de desarrollar tecnologías que sustituyan el uso de petróleo, ya que para 2020 se pronostica la disminución de la producción de petróleo convencional. Uno de los retos más importantes que enfrentará la sociedad en las próximas décadas será cubrir la creciente demanda de energía de forma segura y sustentable que permita cubrir la demanda energética de las actividades antropogénicas (Fernández, *et. al.*, 2012).

Entre las diversas fuentes potenciales de energía renovable, los biocombustibles son los de mayor interés (Peralta, *et.al.*, 2012). Sin embargo, la sostenibilidad de producción de los biocombustibles se ha visto fuertemente cuestionada ya que la demanda de cultivos tradicionales como, aceite de canola, soja o girasol destinado a los biocombustibles de primera generación y maíz, caña de azúcar destinado a los biocombustibles de segunda generación aumenta el riesgo de cambio de uso de suelo al ser mayor el número de áreas de cultivo requeridas (Bermeo, 2011; Tapia, *et.al.*, 2015). Los expertos han reconocido el biocombustible obtenido a partir de microalgas (biocombustibles de tercera generación) como una opción viable para disminuir la dependencia a los combustibles fósiles y reducir las emisiones de gases de efecto invernadero (Gupta, *et. al.*, 2017).

Además del uso que se le da a las microalgas para la producción de biocombustibles, también se presentan como una alternativa para la biorremediación de medios acuáticos, ya que permiten la remoción de fósforo y nitratos del agua, debido a que lo usan como alimento para poder potencializar su

crecimiento, por lo que el uso de aguas residuales como medio de cultivo es una ventaja ya que mientras las microalgas eliminan el exceso de nutrientes en las aguas residuales, al mismo tiempo acumulan biomasa con elevado valor, como materia prima para la producción de energía a un mejor costo (Ayala, 2015; Bermeo, 2011). Los lixiviados de rellenos sanitarios contienen altas concentraciones de nitrógeno (1,000 a 5,000 mg/l) y fósforo así como otros compuestos por lo que pueden ser utilizados como una alternativa para ser medio de cultivo de microalgas (Zhao, *et. al.*, 2014; Sforza, *et. al.*, 2015).

Una de las principales limitaciones en el cultivo de microalgas es el método de cosecha. De hecho, es considerado el paso más costoso y complejo del sistema, el cual depende en gran medida de las características del cultivo. La selección del método de cosecha es de gran importancia para la economía durante el proceso producción de biocombustibles puesto que puede encarecer el costo total entre 20-30% (Hernández y Labbé, 2014).

A pesar de la amplia gama de aplicaciones, la cosecha de microalgas todavía no es económicamente viable, por lo que se han realizado diversos estudios para lograr una reducción de costos (Barros *et. al.*, 2015).

En este contexto, en el presente trabajo se evaluó la recuperación de biomasa microalgal de *Scenedesmus obliquus* y un cultivo mixto (*Scenedesmus obliquus* y *Desmodesmus* spp.) utilizando agua residual y agua residual enriquecida con lixiviado como medios de cultivo, mediante el método de cosecha de sedimentación por gravedad. Se monitoreo la generación de biomasa, carbohidratos y lípidos durante la duración de la curva de crecimiento (40 y 44 días respectivamente), así como la remoción de nutrientes en ambos medios de cultivo.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Panorama Energético Mundial

En 2015 la producción mundial de energía primaria totalizó 13,790.02 millones de toneladas equivalentes de petróleo (MMtep), 0.6% mayor que en 2014. Los países con mayor producción primaria fueron China, Estados Unidos, Rusia, Arabia Saudita e India, con participaciones de 18.1%, 14.6%, 9.7%, 4.7% y 4.0% respectivamente. México se situó en el decimoquinto lugar, con 1.5% de la energía total producida en todo el mundo (SENER, 2017).

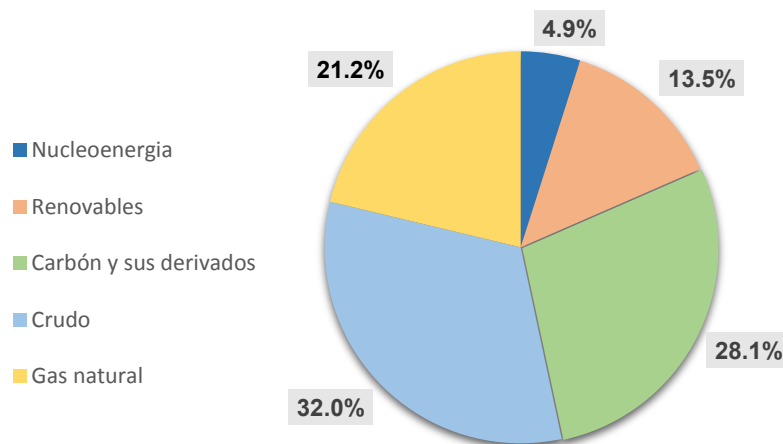


Figura 1: Producción mundial de energía primaria, 2015, 13,790.02 MMtep (SENER, 2017).

Actualmente alrededor del 80% de la demanda mundial de energía se satisface a partir de combustibles fósiles. Un problema es la reducción de las reservas de estos combustibles así como las dificultades para su extracción, esta situación es particularmente difícil en el sector del transporte, donde no hay grandes alternativas para sustituir a los combustibles fósiles (Peralta, *et. al.*, 2012; Mata, *et. al.*, 2010).

1.2 Sector energético en México

Entre 2000 y 2011, el consumo de energía en México se incrementó en promedio 2% anual, mientras que la producción primaria de energía se redujo 0.3%. La producción de petróleo alcanzó su máximo entre 2000 y 2004 (3.3 millones de barriles diarios) para descender a 2.5 millones de barriles por día en el 2012. A pesar de que las inversiones en exploración y producción de hidrocarburos casi se triplicaron en los últimos 10 años (pasaron de 113,332 millones de pesos en 2004 a 301,682 millones de pesos en 2014). Para el mismo periodo, las reservas probadas de petróleo también han disminuido en más de 30%, pasando de 18,895.2 millones de barriles de petróleo crudo equivalente (Mmbpce) a 13,017.4 Mmbpce, al igual que las reservas probables, las cuales decrecieron un 29%, de 16,005.1 Mmbpce a 11,377.2 Mmbpce. En este periodo, México se ha convertido en un importador neto de gasolina, diésel, gas natural, gas licuado de petróleo (GLP) y productos petroquímicos. De continuar con esta tendencia es probable que México enfrente un déficit energético para 2020. De acuerdo con la información del Sistema de Información Energética de la Secretaría de Energía (SENER), el consumo total de energía en el año 2014 ascendió a 4895.79 Pentajoules (PJ). El sector transporte se ubicó como el más intensivo en energía, representando casi el 50% del consumo total, seguido por el sector industrial con 32.08%. Para el mismo año, el consumo energético del sector residencial alcanzó 15.4% mientras que los sectores comercial y agropecuario representaron 2.76% y 3.26%, respectivamente. Según el Inventario Nacional de Emisiones de Gases de Efecto Invernadero (INEGEI), entre 1990 y 2006 el sector energético fue la principal fuente de emisiones de GEI en el país, alcanzando el 60.7% del total (SENER, 2016). Los biocombustibles pueden constituir una alternativa prometedora para subsanar dicha problemática, ya que pueden reemplazar parcialmente el uso de los combustibles fósiles (Serna, *et. al.*, 2011).

1.3 Biocombustibles

Los biocombustibles son aquellos biocarburantes como alcoholes, éteres, ésteres y otros productos químicos que provienen de compuestos orgánicos de base celulósica (biomasa) extraída de tejidos de plantas y animales, los residuos de la agricultura y de la actividad forestal, y de algunos desechos industriales, por ejemplo los de la industria de la alimentación. El término biomasa, se refiere a cualquier tipo de materia orgánica que haya tenido su origen a partir de organismos vivos; el concepto de biomasa comprende productos tanto de origen vegetal como de origen animal (Salinas y Gasca, 2009; Espinosa de Aquino, *et. al.*, 2009).

1.3.1 Clasificación de biocombustibles

A los biocombustibles, se les clasifica de acuerdo al insumo o materia prima y a la tecnología empleada para producirlos, en biocombustibles de primera, segunda, tercera y cuarta generación (Maciel, 2009):

Los de primera generación son de procedencia agrícola y están conformadas por las partes alimenticias de las plantas, las cuales tienen un alto contenido de almidón, azúcares y aceites. Ejemplos de estas materias son el jugo de la caña de azúcar, granos de maíz, jugo de betabel, aceites de semilla de girasol, de soya, de palma, de ricino, de algodón, de coco, de cacahuete, entre otros. También se emplean como insumos las grasas animales, grasas y aceites de desecho provenientes de la cocción y elaboración de alimentos, así como desperdicios sólidos orgánicos. La producción de estos biocombustibles se lleva a cabo utilizando tecnología convencional como la fermentación (para azúcares y carbohidratos) obteniendo metanol, etanol y n-butano; transesterificación (para aceites y grasas) que da como resultado biodiesel y la digestión anaerobia (para los desperdicios orgánicos) teniendo biogás.

Los de segunda generación utilizan de insumos a los residuos agrícolas y forestales compuestos principalmente por celulosa. Algunos ejemplos de estos

insumos son el bagazo de la caña de azúcar, el rastrojo de maíz (tallo, hojas y olote), paja de trigo, paja de trigo, aserrín, hojas y ramas secas de árboles.

Para estos, los procesos de producción tienen una complejidad más alta que los de primera generación y entre ellos destacan la sacarificación-fermentación y el proceso Fischer-Tropsch que permiten la fabricación de etanol, metanol, gas de síntesis, biodiesel, 2.5-dimetilfurano, entre otros.

Para los biocombustibles de tercera generación los insumos utilizados son vegetales no alimenticios de crecimiento rápido y con una alta densidad energética almacenada en sus componentes químicos, por lo que se les denomina “cultivos energéticos”. Entre estos vegetales están los pastos perennes, árboles y plantas de crecimiento rápido, algas verdes y cianobacterias. Los procesos de obtención de estos biocombustibles se encuentran en fase de desarrollo, sin embargo, se ha logrado producir biodiesel y etanol a nivel piloto.

En los biocombustibles de cuarta generación la materia prima utilizada son microalgas o bacterias manipuladas genéticamente para mejorar la eficiencia del proceso así como mejorar la captación y almacenamiento de carbono (CAC) a medida que el cultivo crece (Sanz, 2016).

Una de las alternativas más utilizadas ha sido la de la producción de biocombustibles de tercera generación utilizando microalgas, ya que a diferencia de los biocombustibles de primera y segunda generación no compiten por los recursos propios de la agricultura como las tierras de cultivo y agua de buena calidad (MALGAS, 2014).

1.4 Microalgas

Las microalgas son organismos procariontes (cianobacterias) o eucariontes (algas verdes, algas rojas o diatomeas). Las microalgas se encuentran presentes en hábitats diversos como aguas marinas, dulces, salobres, residuales o en el suelo, bajo un amplio rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes.

Se han identificado alrededor de 40,000 especies aunque se estima que existen más de 100,000 (Garibay, *et. al.*, 2009; Mata, *et. al.*, 2010).

El uso de microalgas ha despertado gran interés en los últimos años debido, principalmente, a su plasticidad metabólica y su elevada velocidad de crecimiento. Las fases de crecimiento de un cultivo típico de microalgas son cinco, que se definen por el número de células presentes en un tiempo (edad) determinado y por las condiciones generales del cultivo: fase de latencia, fase de adaptación o inicial, fase exponencial o desarrollo logarítmico, fase estacionaria y la fase de declinación o muerte (García, *et. al.*, 2017).

Las principales ventajas del uso de las microalgas son las siguientes (Gouveia, 2011):

- Tienen mayor rendimiento de crecimiento y producción de biomasa por hectárea, aproximadamente 3.8% frente a un 0.5% que producen los cultivos energéticos convencionales a partir de plantas terrestres como caña de azúcar, palma o maíz.
- Tienen una alta capacidad para capturar CO₂.
- Son capaces de crecer en un medio líquido marino o aguas residuales, lo que reduce el consumo de agua dulce para su producción.
- Se utilizan para la biorremediación de aguas residuales (industriales y municipales) ya que utilizan el nitrógeno y fósforo para su crecimiento.
- Pueden ser cultivadas en áreas no aptas para la agricultura por lo que no compiten por las zonas cultivables.
- La producción de biomasa no es estacional por lo que puede ser cosechada prácticamente todo el año.
- Los cultivos pueden manipularse para producir una alta concentración de la materia prima deseada.
- Pueden ser cultivadas sin el uso de fertilizantes y pesticidas, lo que resulta en menos contaminación para el cultivo.
- Tienen un impacto ambiental mínimo.

- Además de su utilidad como bioremediadores de aguas residuales producen biomasa con un valor añadido generando co-productos o subproductos (por ejemplo: proteínas, polisacáridos, pigmentos, biopolímeros, alimentos para animales o fertilizantes), además de ser una fuente de energía en la generación de biocombustibles (combustible para aviones, gasolina de aviación, biodiesel, gasolina y bioetanol). No obstante, las microalgas poseen otros compuestos como los carbohidratos (20-30%), lípidos (10-30%) y proteínas (30-60%), estos porcentajes varían en función de la especie y las condiciones de cultivo.

1.4.1 Composición bioquímica de las microalgas

La concentración de proteínas, carbohidratos y lípidos de las microalgas puede modificarse alterando las condiciones ambientales como: concentración de nutrientes, temperatura, intensidad luminosa, así como el estado fisiológico, edad de la población, densidad de la población, desarrollo autotrófico o heterotrófico.

- a) **Carbohidratos:** Son los principales productos derivados de la fotosíntesis y el metabolismo de fijación de carbono. La fotosíntesis se puede expresar como una reacción redox impulsada por energía lumínica en la que el dióxido de carbono y el agua se convierte en carbohidratos y oxígeno. La conversión es tradicionalmente dividida en dos etapas, las llamadas reacciones de luz y oscuridad (Figura 2). En las reacciones de luz, que están ligadas a la membrana la energía de la luz se convierte en energía química que proporciona un reductor bioquímico NADPH_2 y un compuesto ATP de alta energía. En las reacciones oscuras, que tienen lugar en el estroma, NADPH_2 y ATP son utilizados en la reducción bioquímica secuencial de dióxido de carbono a carbohidratos. Los azúcares pueden presentarse como monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos o polisacáridos. Los carbohidratos se pueden acumular como material de reserva como el almidón o convertirse en un componente principal de la pared celular (por ejemplo, celulosa, pectina y polisacáridos). Las paredes celulares de microalgas consisten principalmente en pared celular interna y

una pared celular externa, que se pueden agrupar en tres tipos: 1) una capa externa trilaminar, 2) una monocapa exterior delgada y 3) sin una capa externa. La composición de la pared celular externa varía de una especie a otra, pero usualmente contiene polisacáridos específicos, como pectina, agar y alginato. La pared celular interna de las microalgas está compuesta principalmente de celulosa y otros materiales (como hemicelulosa y glicoproteína). Las microalgas se consideran una materia prima prometedora para la producción de bioetanol porque tienen células basadas en paredes celulares de celulosa, con almidón acumulado como fuente principal de carbohidratos. Tanto el almidón como la mayoría de los polisacáridos de la pared celular se pueden convertir en azúcares fermentables para la posterior producción de bioetanol a través de fermentación microbiana (Chen, *et. al.*, 2013; Richmond, 2004).

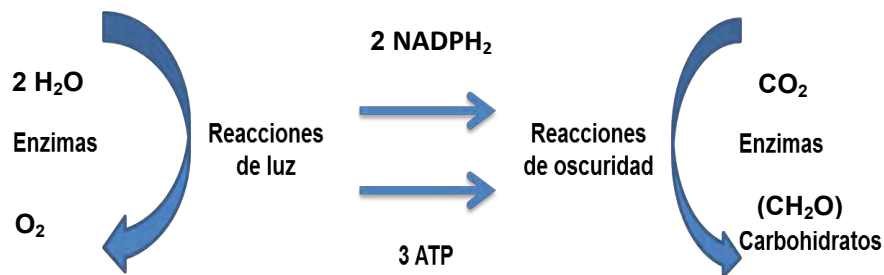


Figura 2: Productos principales de las reacciones de luz y oscuridad (Richmon, 2004).

Las rutas metabólicas de síntesis de carbohidratos y lípidos están estrechamente relacionadas, ya que la fotosíntesis convierte el CO_2 en glicerato-3-fosfato (G3P) que es un material de partida de compuestos de almacenamiento que incluye lípidos y carbohidratos. La ruta biosintética para la producción de lípidos se inicia mediante la transformación de G3P en piruvato y posteriormente a acetil-CoA en el plástido.

Lípidos: La fracción lipídica puede dividirse en dos grupos principales: los lípidos polares (que incluyen glicolípidos y fosfolípidos) y los lípidos neutros (que incluyen a los triglicéridos, diglicéridos, hidrocarburos, alquenonas, esteroides y pigmentos).

La mayoría de los lípidos microalgales son lípidos polares, que son componentes de membranas; y los triglicéridos que son una reserva de ácidos grasos para la división celular, energía metabólica, mantenimiento de la membrana, síntesis y una amplia variedad de funciones fisiológicas. Los triglicéridos pueden llegar a constituir hasta el 80% del total de lípidos en microalgas eucariotas. Las cantidades relativas de cada clase de lípido en las células microalgales pueden cambiar considerablemente con variaciones de las condiciones de cultivo. El alto contenido de lípidos está asociado a la síntesis de triacilgliceroles (TAG), lípidos con alto porcentaje de ácidos grasos y ausencia de fosfato, que son ideales para la producción de biodiesel por su baja sensibilidad a la oxidación (Band, 1999; (Fernández, *et. al.*, 2012).

Los cultivos de microalgas presentan la ventaja de que el contenido de carbohidratos y lípidos puede ser controlado en función de las condiciones de cultivo, principalmente mediante la limitación de nutrientes, sin embargo, aunque la limitación de nutrientes principalmente el nitrógeno, logra aumentar significativamente el contenido de carbohidratos y lípidos a nivel celular en las microalgas, también involucra una disminución de la división celular, lo que conlleva a una baja productividad de la biomasa en este proceso (Fernández, *et. al.*, 2012).

Los géneros de microalgas más utilizados para la producción de biocombustibles debido a sus altos contenidos de carbohidratos y lípidos son: *Chlorella*, *Desmodesmus*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas*, y *Scenedesmus* (Fernández, *et. al.*, 2012). En este trabajo fue utilizada la especie *Scenedesmus obliquus* y el género *Desmodesmus* spp.

1.4.2 Características de *Scenedesmus obliquus*

Es una microalga perteneciente a la clase *Chlorophyceae*, es una célula pequeña formadora de colonias en la que se alinean en forma de plato. Las células contienen un único núcleo, que consiste en un cloroplasto en la parte central. Las estructuras de este tipo de microalgas solo pueden ser observadas con un microscopio electrónico.

Su principal característica morfológica es la ausencia de una pared celular rígida de polisacárido. La célula está incluida en una delgada y elástica membrana plasmática y envuelta mucídica. Esto le permite responder rápidamente a cambios osmóticos, alterando su forma y volumen celular. Por otro lado, ésta falta de pared celular rígida aumenta su sensibilidad a fuerzas de tensión externa e impone algunas limitaciones a la manipulación de los cultivos (Olivares, 2010).

1.4.3 Características de *Desmodesmus* spp.

Algas pertenecientes a la clase *Chlorophyceae*, son organismos coloniales, la colonia es plana y formada en general por 2, 4, 8, 16 e incluso 32 células, dispuestas lado a lado, con sus ejes más largos paralelos entre sí, organizado linealmente o en zigzag. Las células pueden ser elipsoides, ovoides, fusiformes o lunadas. Todas de igual forma en el mismo cenobio, o las células externas diferentes de las internas. La pared celular es más compleja que la de *Scenedesmus*, además de que puede ser ornamentada con diminutas verrugas o tener una costilla mediana más o menos evidente. El origen del género *Desmodesmus* proviene de *Scenedesmus* ya que todas las especies de *Scenedesmus* que poseen espinas en las células externas y/o intermedias del cenobio fueron recientemente transferidas para el género *Desmodesmus* basándose en la comparación de la secuencia de DNA ribosómico ITS-2 (Aboal, 2012).

La selección de una microalga en específico es importante ya que como se mencionó anteriormente entre mayor sea su contenido de carbohidratos o lípidos será mejor la biomasa recuperada para la producción de biocombustibles, principalmente bioetanol o biodiesel.

Las investigaciones acerca de los cultivos de microalgas además de centrarse en incrementar la producción de biomasa, carbohidratos y lípidos, también se han basado en el diseño e innovación de los sistemas de cultivo ya que también el tipo de sistema utilizado influye directamente sobre producción de biomasa.

1.5 Sistemas de cultivo

Los sistemas de cultivo de las microalgas se pueden clasificar según su configuración y tipo de funcionamiento, en sistemas abiertos (estanques) y fotobiorreactores (FBRs).

Los sistemas abiertos son lo más comunes para la producción comercial de microalgas y son una tecnología relativamente sencilla, cultivándose las microalgas en estanques de 20 a 50 cm de profundidad. La producción mediante estanques tiene la gran ventaja de ser un método más barato que los FBRs, en inversión, mantenimiento y consumo energético. Sin embargo, los estanques presentan desventajas, como facilidad de contaminación (es difícil mantener una sola especie), mezclado poco eficiente, la falta potencial de CO₂ y la limitación de luz en las capas inferiores. A diferencia de los estanques los FBRs son sistemas cerrados transparentes, de plástico o vidrio, con geometrías de diversos tipos (tubulares, cilíndricos o planos). En estos sistemas se obtiene una mayor productividad, fundamentalmente porque mejora la eficiencia de la fotosíntesis y la capacidad de fijación de CO₂. Necesitan un espacio menor y el costo de la cosecha de la biomasa también es menor.

Otra ventaja muy importante es su mayor facilidad para mantener un monocultivo sin contaminación por otras especies, lo que permite obtener un producto de pureza para su procesado (Santos, *et. al.*, 2014).

En la presente tesis se simuló biorreactores con botellas PET de 5 litros, de forma cilíndrica y se tomaron en cuenta los parámetros que se enlistan a continuación para el sistema de cultivo.

1.5.1 Parámetros a considerar en un sistema de cultivo

a) Especie de microalga: La elección de las especies a cultivar depende directamente de la finalidad que se le desea brindar a la biomasa resultante y/o si el cultivo es para fitorremediación. Las especies algales predominantes dentro de un sistema abierto dependen de factores ambientales, operacionales y parámetros

biológicos, mientras que en un cultivo cerrado se pueden lograr cultivos monoespecíficos aislados del medio ambiente.

b) Luz: La intensidad lumínica es uno de los principales parámetros a considerar en un cultivo. En ausencia de limitación por nutrientes, la fotosíntesis se incrementa con el aumento de la intensidad lumínica hasta alcanzar la máxima tasa de crecimiento específica para cada especie en el punto de saturación por luz. Pasado este punto, se alcanza el punto de fotoinhibición con resultados perjudiciales para la misma célula e incluso la muerte, implicando pérdida de eficiencia fotosintética y productividad del cultivo.

c) Temperatura: La producción algal aumenta proporcionalmente con la temperatura hasta alcanzar la temperatura óptima de cada especie. Por encima de esta, aumenta la respiración y la fotorrespiración reduce la productividad global. La temperatura óptima varía entre las especies, pero en general está entre 28° y 35°C.

d) pH: El pH del cultivo está influenciado por varios factores como la productividad algal, la respiración, la alcalinidad y composición iónica del medio de cultivo, la actividad microbiana autotrófica y heterotrófica y la eficiencia del sistema de adición de CO₂. Como en los otros parámetros, cada especie necesita un rango determinado de pH que permita un crecimiento óptimo, siendo pH 8 el más indicado para especies dulceacuícolas. Por encima o debajo de éste, presentan un descenso en la productividad, que no solo afecta el crecimiento algal, sino también la capacidad de remover el nitrógeno en sistemas de tratamientos de aguas.

e) Nutrientes: El nitrógeno es el nutriente más importante para las microalgas (después del carbono) y se incorpora como nitrato (NO₃⁻) o como amonio (NH₄⁺). Es también un factor crítico para regular el contenido de lípidos de las microalgas. Típicamente, las microalgas tienen un contenido lipídico aproximadamente del 20%, pero cuando el nitrógeno se convierte en el factor limitante del crecimiento, la acumulación de los niveles de lípidos aumenta en más de 40%. Sin embargo, usando la limitación de nitrógeno para estimular la acumulación de lípidos en las células de algas, a menudo reduce la producción de algas, lo que sugiere que las 2 condiciones, alto contenido en lípidos y alta productividad, pueden ser

mutuamente excluyentes. El fósforo es fundamental en muchos procesos celulares, tales como la formación de ácidos nucleicos y transferencia de energía. Aunque el contenido en fósforo de las microalgas es menor al 1%, su deficiencia en el medio de cultivo es una de las mayores limitaciones al crecimiento. En los medios de cultivo suele incorporarse en forma de HPO_4^{2-} o HPO_4 (Hernández y Labbé, 2014).

En condiciones apropiadas, las microalgas poseen una capacidad depuradora conocida como fitorremediación definida como el uso de macroalgas y/o microalgas para la eliminación o biotransformación de contaminantes desde aguas residuales (Hernández y Labbé, 2014).

1.6 Aguas residuales

La descarga de aguas residuales domésticas, industriales, agrícolas y pecuarias sin tratamiento provoca la contaminación de los cuerpos de agua receptores disminuyendo la calidad de las aguas superficiales y subterráneas, poniendo en riesgo la salud de la población y la integridad de los ecosistemas.

La descarga de aguas residuales de origen urbano proviene de viviendas, edificios públicos y de la escorrentía urbana que se colecta en el drenaje. Sus principales contaminantes son el nitrógeno y fósforo, compuestos orgánicos, bacterias coliformes fecales, materia orgánica, entre muchos otros. Para la remoción de los contaminantes en las aguas residuales municipales existen diversos procesos de tratamiento. En el país los procesos de tratamiento de aguas residuales municipales incluyen lodos activados, lagunas de estabilización, primario avanzado, lagunas aireadas, filtros biológicos, dual y otros (SEMARNAT, 2014). El requisito principal en el tratamiento de aguas residuales es la necesidad de eliminar el exceso de nutrientes, en particular nitrógeno y fosforo, ya que la acumulación de estos compuestos en ríos y lagos puede causar eutrofización. Para la remoción de nitrógeno y fósforo se ha promovido durante mucho tiempo el uso de microalgas, ya que varias especies de microalgas son capaces de crecer efectivamente en aguas residuales. La gran ventaja del uso de las microalgas para el tratamiento de aguas residuales sobre los procesos químicos convencionales,

está basado en el posible ahorro de costos y la tecnología de nivel inferior que se utiliza, además la remediación es más sostenible con el medio ambiente ya que no genera contaminantes adicionales como subproductos de lodo y brinda una oportunidad para el reciclaje eficiente de nutrientes (Pittman, *et. al.*, 2011).

La mayoría de los trabajos publicados se centran en la importancia del tratamiento de aguas residuales municipales, industriales y agrícolas debido a que contiene los dos elementos fundamentales requeridos por las microalgas, nitrógeno y fósforo, sin embargo, una alternativa para la adición de estos nutrientes y con ventajas económicas y ambientales es el lixiviado de rellenos sanitarios (Sforza, 2015).

1.7 Lixiviados de rellenos sanitarios

La mayoría de los rellenos sanitarios son sitios de disposición final de residuos sólidos urbanos (RSU) y en nuestro país no cumplen en su totalidad con la normatividad vigente para que ésta sea una alternativa efectiva, continúan siendo sitios de disposición final a cielo abierto que pueden llegar a ocasionar graves problemas ambientales. Los impactos ambientales de mayor consideración son los relacionados con los lixiviados que se generan en ellos, el cual se produce durante la descomposición de los residuos almacenados debido a la percolación del agua de lluvia. Estos líquidos arrastran todo tipo de contaminantes, muchos de ellos en concentraciones elevadas, por lo que son considerados como uno de los residuos más complejos y difíciles de tratar. Los lixiviados contienen concentraciones elevadas de contaminantes orgánicos e inorgánicos, incluyendo ácidos húmicos, nitrógeno amoniacal en concentraciones que oscilan entre 1000 y 5000 mg L⁻¹ y metales pesados, así como sales inorgánicas si estos líquidos no son controlados pueden permear hasta llegar al agua subterránea o mezclarse con aguas superficiales y ocasionar la contaminación de suelos y cuerpos de agua (Huichapa y Bernal, 2015; Vera, 2013).

La NOM-083-SEMARNAT-2003 define al lixiviado como: Líquido que se forma por la reacción, arrastre o filtrado de los materiales que constituyen los residuos y que contiene en forma disuelta o en suspensión, sustancias que pueden infiltrarse en

los suelos o escurrirse fuera de los sitios en los que se depositan los residuos y que puede dar lugar a la contaminación del suelo y de cuerpos de agua, provocando su deterioro y representar un riesgo potencial a la salud humana y de los demás organismos vivos.

Por esta razón, el lixiviado debe de ser contenido y tratado, sin embargo, por su composición altamente tóxica y heterogénea, así como la variabilidad de los volúmenes generados es difícil encontrar y establecer un solo tratamiento para la mitigación y manejo de los lixiviados. Se han realizado diversas investigaciones para encontrar el tratamiento adecuado para éstos entre los que se incluyen el tratamiento aeróbico o anaeróbico convencional que son capaces de producir lixiviados de calidad adecuada para su reutilización o eliminación, pero el consumo de energía es muy elevado (Huichapa y Bernal, 2015; Richards y Mullins, 2013).

1.7.1 Composición típica de los lixiviados

La composición de los lixiviados va cambiando debido al proceso de degradación de los residuos sólidos biodegradables. Este proceso consiste en diferentes fases, la primera es un corto periodo que se caracteriza por la degradación aerobia de la materia orgánica, cuando el oxígeno se agota la degradación continua anaeróbicamente. El proceso de degradación anaeróbica consiste en dos fases de fermentación, la fase acidogénica que genera lixiviado joven y la fase metanogénica que genera lixiviado estabilizado o viejo. Una forma típica de clasificar el lixiviado puede ser en función de su edad como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1: Características de lixiviado según su edad (Bhalla, *et. al.*, 2012)

Parámetro	Joven	Intermedio	Viejo
Edad (años)	<5	5-10	>10
pH	6.5	6.5-7.5	>7.5
DQO (mg/L)	>10,000	4,000-10,000	<4,000
DBO5/DQO	>0.3	0.1-0.3	<0.1
Compuestos orgánicos	80% ácidos grasos volátiles (AGV)	5-30 AGV+ ácidos húmicos y fúlvicos	Ácidos húmicos y fúlvicos
Metales pesados	Bajo-medio	Bajo	Bajo
Biodegradabilidad	Importante	Media	Baja

El uso de una biorremediación basada en microalgas parece un método viable para tratar lixiviados y simultáneamente producir biomasa valiosa, ya que se trata de un proceso biológico económico y eficiente para la remoción de nutrientes además las microalgas son conocidas por la capacidad que tienen para la biocumulación de metales. Se ha demostrado que en la eliminación de fósforo pueden ser tan eficientes como en los tratamientos químicos convencionales. Además es un proceso global ya que permite: la remoción de sales (amonio, nitratos, nitritos, ortofosfatos), el aumento del pH (proceso fotosintético), lo cual favorece la precipitación de los ortofosfatos, la eliminación del nitrógeno amoniacal por efecto de intercambio gaseoso, disminuye la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO), reduce la sobrevivencia de organismos patógenos, etcétera (Huichapa y Bernal, 2015; Richards y Mullins, 2013).

El reto de utilizar microalgas como tratamiento de lixiviado radica en la toxicidad de éste ya que puede inhibir el crecimiento microalgal. Sin embargo, el uso de lixiviado diluido de acuerdo a lo reportado por Mustafa *et. al.* (2012), Orta, *et. al.* (2012), Sforza (2015) y Hernández (2017), puede resolver este problema.

Otro de los inconvenientes que se presenta para el producción de biocombustibles a partir de microalgas, es el proceso de cosechado de la biomasa, ya que las tecnologías aplicadas actualmente no son lo suficientemente eficientes o económicas para mejorar la viabilidad comercial del cultivo de microalgas.

1.8 Cosecha de microalgas

Las microalgas son difíciles de separar debido a su pequeño tamaño, la técnica de separación depende del tipo de microalga, la densidad del cultivo y su uso posterior (Santos, *et. al.* 2014). La cosecha de microalgas se ha visto obstaculizada por la incapacidad para encontrar un método confiable y rentable que permita cosechar la biomasa microalgal. Se ha sugerido que alrededor de 20-30% del costo total del proceso se debe a la etapa de cosecha. A través de los años se ha demostrado que no existe un proceso universal para los métodos de cosecha de la biomasa. Este tema sigue siendo un área activa de investigación, buscando desarrollar una recolección apropiada y económica para todas las especies de microalgas, ya que cada una tiene sus características particulares (Bermeo, 2011; Christenson y Sims, 2011; Milledge y Heaven, 2013).

Algunas de las técnicas de cosecha de biomasa se mencionan a continuación:

1.8.1 Centrifugación

Es utilizada a nivel de laboratorio y ha demostrado que alrededor del 80-90% de las microalgas puede ser recuperada por este sistema, aunque la centrifugación genera altas eficiencias de recuperación, este método presenta algunas desventajas como el daño en la estructuras de las células ante altas fuerzas gravitatorias (Peralta, *et. al.*, 2012)

1.8.2 Coagulación-floculación

Es un proceso que consiste en añadir al cultivo productos químicos conocidos como floculantes con el objeto de favorecer la formación de partículas más grandes que llevan una rápida sedimentación: Estos productos químicos coagulan las algas sin embargo, pueden llegar a contaminar el cultivo. Entre las variables

que afectan el proceso se encuentra el tipo de floculante, la dosis aplicada, el tiempo de agitación y la especie de microalga (Bermeo, 2011).

1.8.3 Ozonoflotación

Es un proceso físico-químico que combina las propiedades oxidativas del ozono con las propiedades físicas de la flotación para la remoción de partículas suspendidas en agua, que al aplicarse a cultivos de microalgas provoca un fenómeno de espumación, promoviendo la recuperación de biomasa. El ozono provoca lisis celular en las microalgas permitiendo la liberación de biopolímeros como lípidos, carbohidratos y proteínas que pueden ser utilizados para producir, biodiesel, bioetanol, biogás y otros productos de valor agregado. Adicionalmente se tienen beneficios tales como: tratamiento y desinfección del agua residual, así como biocombustibles de mejor calidad (Valeriano, *et al.*, 2016).

1.8.4 Sedimentación por gravedad

Es una técnica de uso común para la recolección de biomasa de aguas residuales debido a los grandes volúmenes que pueden ser tratados. En este proceso las partículas se diluyen en el fluido por la acción de la gravedad formando un concentrado en el fondo del contenedor y dejando el líquido claro en la parte de arriba. Las microalgas pueden generar un proceso de sedimentación, esta puede ocurrir de forma natural o inducida por la limitación de carbono o de otros factores abióticos. El método de cosecha por sedimentación se basa en la Ley de Stokes que toma en consideración la aceleración por gravedad, densidad de la partícula, densidad del fluido, diámetro de la partícula y viscosidad del fluido para calcular la velocidad de sedimentación.

A pesar de la simplicidad de la sedimentación es un proceso muy lento además de que se puede producir un deterioro de la biomasa debido a las altas temperaturas. Sin embargo, el proceso es aceptado en gran medida como un método de cosecha viable para microalgas de mayor tamaño como la *Spirulina*.

La ventaja de esta técnica es que no es costosa además de que no se agregan productos químicos potencialmente tóxicos que puedan afectar la biomasa como en el método de floculación (Borowitzka, *et. al.*, 2016; Pragya, *et. al.*, 2013; Rawat, *et. al.*, 2011).

Para la cosecha de microalgas existen más métodos en los que se involucran procesos biológicos, mecánicos y en menor medida basados en la electricidad, pero los aquí mencionados son los utilizados más comúnmente. Es muy frecuente combinar dos o más de estos métodos para obtener una mayor tasa de separación. En la figura 3 se muestra un esquema general del proceso al que se somete el cultivo para la recuperación de biomasa.

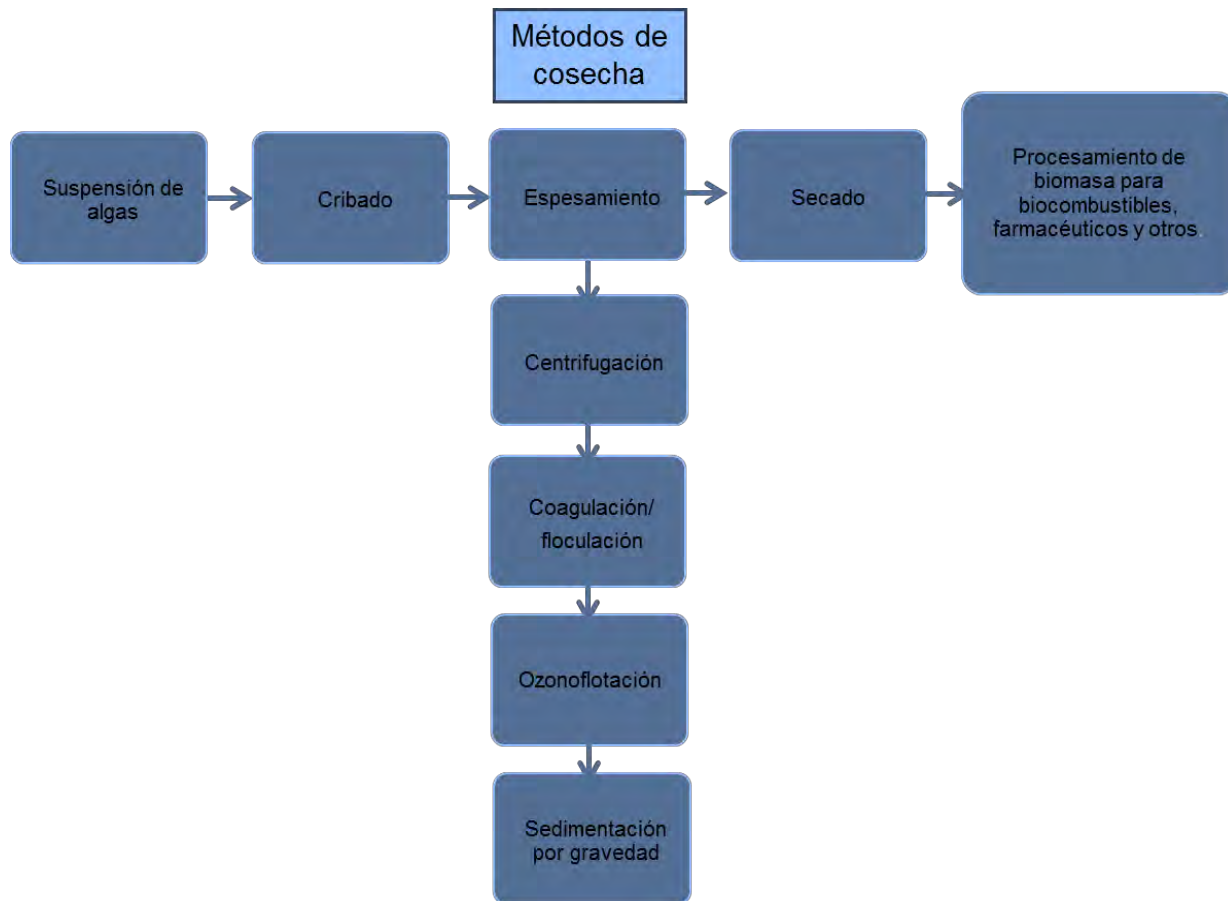


Figura 3: Proceso general para la recuperación de biomasa (Adaptado de Barros, *et. al.*, 2015).

En la tabla 2 se pueden observar las ventajas y desventajas de los métodos de cosecha anteriormente mencionados (Adaptado de Orta, *et. al.*, 2017).

Tabla 2: Ventajas y desventajas de los diferentes métodos de cosecha

Método de cosecha	Ventajas	Desventajas
Centrifugación	<ul style="list-style-type: none"> • Método rápido (minutos) • Eficiencia de recuperación >90% • Puede ser utilizado en una amplia gama de especies de microalgas 	<ul style="list-style-type: none"> • Alto consumo energético • Alto costo operacional
Coagulación-floculación	<ul style="list-style-type: none"> • Método simple y rápido (minutos) • La gama de floculantes disponibles es amplia 	<ul style="list-style-type: none"> • Puede presentarse contaminación química en la biomasa cosechada • Los floculantes pueden ser costosos
Ozonoflotación	<ul style="list-style-type: none"> • Cortos tiempos de operación (minutos) • Eficiencia de recuperación >70% • No requiere la adición de floculantes • Pretratamiento para la extracción metabolitos 	<ul style="list-style-type: none"> • La recuperación de biomasa depende de la especie de microalga y de la concentración inicial del cultivo.
Sedimentación	<ul style="list-style-type: none"> • Bajo costo energético 	<ul style="list-style-type: none"> • Método lento (días) • Posible deterioro de biomasa debido a largos periodos de proceso • Eficiencias de recuperación de biomasa < 20% (1 día); 99% (5 días).

2. ANTECEDENTES

Es vital contar con una tecnología económica, escalable y amigable con el medio ambiente para cosechar biomasa microalgal a fin de lograr que el proceso sea más económico y permita la comercialización de microalgas (Japar, *et. al.*, 2017).

Se han realizado estudios con diferentes técnicas de cosecha para determinar cuál es el mejor método para la recuperación de biomasa de microalgas, sin embargo, no ha sido posible determinar un método universal ya que la elección de la técnica de cosecha depende principalmente del uso final que se le va a dar a la biomasa así como del tipo de microalga que es utilizada.

La sedimentación es un método recomendado debido al bajo costo energético requerido y aunque en general existe muy poca información respecto al uso de la sedimentación como método de cosecha, en trabajos previos se han realizado pruebas para estimar el porcentaje de recuperación de biomasa por esta técnica.

Andrade (2008) efectuó pruebas para evaluar la capacidad de sedimentación para un cultivo unialgal de *Scenedesmus sp.* y un cultivo mixto de las microalgas *Scenedesmus sp.*, *Mycrocystis sp.* y *Chlorella sp.*, ambas cultivadas en agua residual, realizando mediciones periódicas de turbidez, obteniendo como resultado que en el cultivo mixto se logró recuperar el 99.83% de la biomasa algal en un tiempo de 1260 min., lo que corresponde a 21 horas. Mientras que en el cultivo de *Scenedesmus sp.* se obtuvo una sedimentación con un porcentaje de recuperación de 98.95% luego de 7200 min, es decir 5 días.

Por su parte Milledge y Heaven en el 2012, llevaron a cabo una revisión de diferentes métodos de cosecha haciendo énfasis en las características de cada método así como el potencial de cada uno para la producción de biocombustibles, obteniendo como resultado un cuadro de ventajas y desventajas del uso de los siguientes métodos: la sedimentación, floculación, filtración y centrifugación.

Pragya, *et. al.*, 2013, efectuaron una revisión sobre la cosecha, la extracción de petróleo y las tecnologías de producción de biocombustibles a partir de microalgas obteniendo como conclusiones con respecto a la cosecha de microalgas que la elección de la tecnología de cosecha depende de la especie de alga, tamaño, densidad y producto final deseado. Por otra parte, la cosecha de biomasa de microalgas aumenta el costo operativo general de la producción de biocombustibles de microalgas. Por lo tanto, para producir biocombustibles a partir de microalgas de una manera económica es necesario desarrollar más investigaciones que permitan descubrir una tecnología de cosecha eficiente y comercialmente viable.

En el 2014, Barros, *et. al.*, realizó una revisión bibliográfica acerca de los métodos de cosecha de biomasa microalgal en la que presenta las ventajas y desventajas de los siguientes métodos: coagulación-floculación, auto y biofloculación, sedimentación por gravedad, flotación y procesos basados en electricidad, con la finalidad de permitir la selección de un procedimiento adecuado para separar eficazmente la biomasa microalgal.

Valladares, 2014, calculó la velocidad de sedimentación de la microalga *Chlorella sp.* en un medio Guillard o F/2 para la construcción de un sedimentador gravitacional, utilizando un litro de cultivo y midiendo la altura de sedimentación en una probeta cada 15 y 30 minutos, después en intervalos de una hora hasta la sexta hora y en adelante cada dos horas hasta que la altura de sedimentación se mantuvo constante, obteniendo como resultados una velocidad de sedimentación de 2.12×10^{-2} m/h y una eficiencia de sedimentación por gravedad correspondiente al 96.6%.

En el 2016 Cerón *et. al.*, realizaron un estudio en el que compararon tres métodos de cosecha: centrifugación, sedimentación y floculación (utilizando NaOH al 5N como floculante), para cultivos estáticos de *Chlamydomonas sp.*, encontrando que la centrifugación tiene un porcentaje de recuperación del 97% en 5 minutos pero con un elevado consumo energético, la sedimentación del 96% en un periodo de 8 días y finalmente la floculación con la que se recupera un 93% en un lapso de

5 días pero presenta un efecto negativo en el color del conglomerado así como en el contenido de las proteínas.

La importancia del presente trabajo radica en que si bien se encontraron escasas referencias con respecto a la cosecha de microalgas mediante el método de sedimentación, dichas investigaciones se realizaron utilizando como medio de cultivo agua residual o un medio sintético. En la presente tesis se utilizó como medio de cultivo microalgal agua residual y una combinación de agua residual enriquecida con lixiviado. Ambas condiciones de cultivo fueron llevadas a cabo con la finalidad de buscar producir mayor cantidad de biomasa, además de lograr una sinergia entre el tratamiento de desechos como el agua residual y el lixiviado al mismo tiempo en que se obtiene biomasa microalgal valorizable para la producción de biocombustibles. Todo esto aunado a un método de cosecha de bajo costo para la recuperación de la biomasa.

3. HIPÓTESIS

- El cultivo de microalgas en agua residual enriquecida con lixiviado, permitirá aporte de nutrientes y en consecuencia mejorará la producción de la biomasa microalgal, además el lixiviado ayudará a que el proceso de sedimentación sea más efectivo debido a su composición por lo que la biomasa será recuperada en mayor cantidad.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Evaluar la efectividad del método de sedimentación para la recuperación de biomasa microalgal de *Scenedesmus obliquus* y una mezcla de *Scenedesmus obliquus-Desmodesmus spp.* con potencial para la producción de biocombustibles, usando como medio de cultivo agua residual y agua residual enriquecida con lixiviado.

4.2 Objetivos específicos

- 1) Adaptar el cultivo de la microalga *Scenedesmus obliquus* y un cultivo mixto (*Scenedesmus obliquus-Desmodesmus spp.*) para su crecimiento en agua residual enriquecida con lixiviado.
- 2) Evaluar el contenido de carbohidratos y lípidos presentes en la biomasa del cultivo de *Scenedesmus obliquus* y el cultivo mixto (*Scenedesmus obliquus-Desmodesmus spp.*) mediante métodos colorimétricos
- 3) Determinar el efecto del lixiviado en el crecimiento y la cosecha mediante sedimentación de la biomasa microalgal de *Scenedesmus obliquus* y un cultivo mixto (*Scenedesmus obliquus-Desmodesmus spp.*)
- 4) Evaluar las ventajas y desventajas del uso del método de sedimentación para la recuperación de biomasa de un cultivo de *Scenedesmus obliquus* y un cultivo mixto (*Scenedesmus obliquus-Desmodesmus spp.*)

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Ingeniería de la UNAM, en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental (LIA). Para llevar a cabo la evaluación de la efectividad del método de la sedimentación como método de cosecha de microalgas con potencial para la producción de biocombustibles, se utilizaron microalgas con potencial para la producción de biocombustibles, se utilizaron microalgas de la especie *Scenedesmus obliquus*, así como un cultivo mixto de las microalgas *Scenedesmus obliquus-Desmodesmus* spp. Ambas microalgas fueron cultivadas usando como medio de crecimiento agua residual enriquecida con lixiviado y como control agua residual, recuperando la biomasa mediante sedimentación. Así mismo se determinó la remoción de nutrientes del medio de cultivo (agua residual-lixiviado) al final de la cosecha y se estimó la cantidad de carbohidratos y lípidos como productos de valor agregado para la producción de biocombustibles. La metodología general se muestra en la figura 4 y en el apartado siguiente se describe cada una de las etapas.

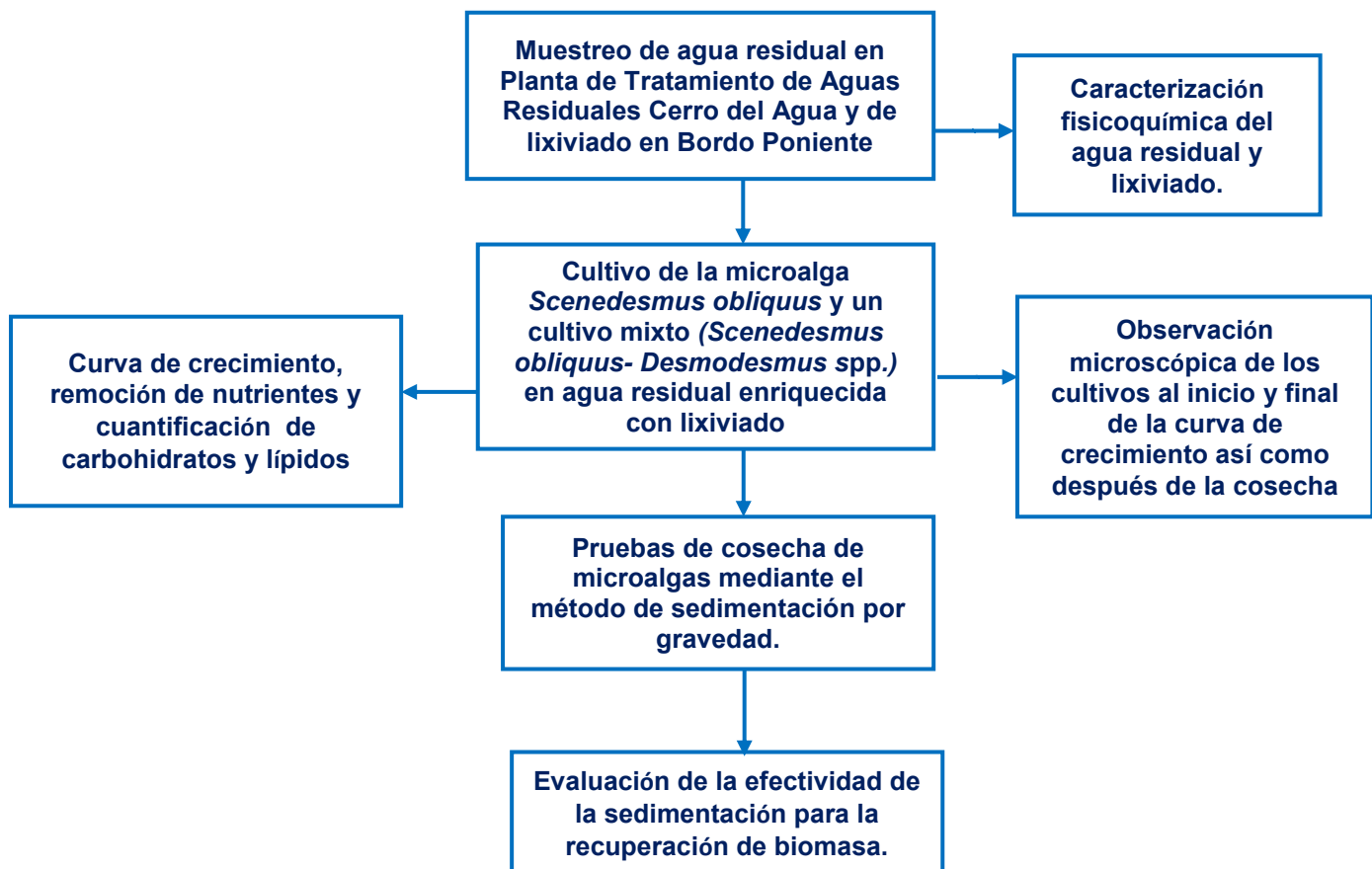


Figura 4: Diagrama general de la metodología.

5.1 Muestreo de agua residual y lixiviado

La muestra de agua residual fue tomada de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales Cerro del Agua (PTAR) ubicada en el campus Ciudad Universitaria de la UNAM, se realizó un único muestreo en el mes de julio del 2017, mientras que el muestreo de lixiviado fue realizado en la etapa III del relleno sanitario Bordo Poniente ubicado en la zona federal del ex Lago de Texcoco, esta muestra fue colectada en el mes de diciembre de 2016. Ambas muestras fueron tomadas en bidones de polietileno con capacidad de 20 L. Para su utilización como medio de cultivo de las microalgas ambas muestras fueron sometidas a un proceso de filtrado para retirar los sólidos, utilizando conos Imhoff y como soporte de filtración, relleno para almohada (guata), posteriormente el agua residual recuperada se filtró al vacío con papel filtro Whatman con tamaño de poro medio, mientras que el lixiviado fue filtrado solamente al vacío con papel Whatman GF/A con tamaño de poro de $1.6\mu\text{m}$.

5.2 Caracterización fisicoquímica de agua residual y lixiviado.

Los parámetros que se determinaron para la caracterización del agua residual y lixiviado fueron pH, alcalinidad, demanda química de oxígeno (DQO), nitratos, nitrógeno amoniacal, ortofosfatos, sólidos suspendidos totales y temperatura (Tabla 3).

Las mediciones fueron realizadas en el equipo HACH (DR 3900), la destilación de nitrógeno amoniacal en el equipo Destillation Unit B-324 Büchi y pH-Temperatura con el potenciómetro Orion (model 420A).

Tabla 3: Métodos analíticos para la determinación de los parámetros fisicoquímicos en agua residual y lixiviado.

Parámetro	Método analítico	Técnica de determinación
pH	Método Electrométrico 4500 HB	Medición directa con potenciómetro.
Alcalinidad total como CaCO₃	Método 3220 B	Titulométrico. Medición de pH hasta 4.5 titulando con H ₂ SO ₄ 0.1 N.
Demanda química de oxígeno	Método 8000 HACH	Colorimétrico. Digestión durante 2 horas y lectura en espectrofotómetro a 620 nm.
Nitratos	Método 8039 HACH	Colorimétrico. Lectura en espectrofotómetro a 500 nm.
Nitrógeno amoniacal	Método Titulométrico 4500-NH ₃ C	Destilación con NaOH y posterior titulación con H ₂ SO ₄ 0.02 N.
Ortofosfatos	Método 8178 HACH	Colorimétrico. Lectura en espectrofotómetro a 530 nm.
Sólidos suspendidos totales	Método 2540 D	Gravimetría. Sólidos secados a una temperatura de 105° C durante 2 horas.
Temperatura	Método Electrométrico	Medición directa con potenciómetro.

*Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales (APHA, 1992)

5.3 Cultivo de microalgas en agua residual enriquecida con lixiviado

Las microalgas utilizadas en este trabajo fueron proporcionadas por el grupo de trabajo de la Doctora María Teresa Orta del Instituto de Ingeniería, quienes aislaron previamente *Scenedesmus* y *Desmodesmus* de una muestra tomada de la planta de tratamiento del Lago Nabor Carrillo, ubicado en la zona del ex-Lago de Texcoco y los adaptaron al medio de cultivo de sólo agua residual para su crecimiento.

Los cultivos de microalgas se llevaron a cabo utilizando botellas de PET de 5 litros que simulan los biorreactores, utilizando agua residual (grupo control) y agua residual enriquecida con lixiviado (grupo experimental), cada uno se realizó por triplicado por lo que se obtuvo un total de 12 cultivos (6 de *Scenedesmus obliquus*: 3 controles y 3 experimentales; 6 del cultivo mixto: 3 controles y 3 experimentales) cuyo volumen fue de 4 litros. La proporción utilizada de lixiviado en los cultivos fue del 10%, esto soportado en lo reportado por Hernández en 2017 quien probó tres concentraciones de lixiviado del 15, 10 y 7% siendo esta última concentración con la que obtuvo un mayor crecimiento de biomasa. Estas proporciones fueron usadas de acuerdo a la concentración de nitrógeno amoniacal del lixiviado quedando en un intervalo de entre 140 y 170 mg/L de nitrógeno amoniacal para un cultivo de *S. obliquus* y uno de *Desmodesmus* spp. Cabe hacer mención que en la presente tesis la proporción del 10% fue la que cumplió con los requerimientos necesarios de nitrógeno amoniacal (154 mg/L) para la producción de biomasa para el cultivo de *S. obliquus* y el cultivo mixto (*S. obliquus*-*Desmodesmus* spp.).

Los cultivos no se iniciaron simultáneamente por cuestión de tiempo, primero se instaló el cultivo de *S. obliquus* control y experimental y 4 días después el cultivo mixto control y experimental.

En la tabla 4 se muestra la composición final de microalgas, agua residual y lixiviado utilizada para cada uno de los cultivos empleados.

Tabla 4: Composición de los cultivos utilizados.

<i>Microalga</i>	Control		Experimental	
	Composición	Proporción (%)	Composición	Proporción (%)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Agua residual-cultivo	50:50	Agua residual-cultivo <i>S. obliquus</i> -lixiviado	50-40-10
Mixto (<i>Scenedesmus obliquus</i>-<i>Desmodesmus</i> spp.)	Agua residual-cultivo	50:50	Agua residual-cultivo <i>S. obliquus</i> -cultivo <i>Desmodesmus</i> spp.-lixiviado	50-20-20-10

Los cultivos se mantuvieron en agitación manual 1 o 2 veces por día y con iluminación artificial mediante lámparas LED de 20 W en un fotoperiodo luz-oscuridad 12:12. En la figura 5 se pueden observar los cultivos utilizados en la fase inicial de la experimentación, se puede apreciar que los cultivos en los que se utilizó lixiviado la coloración es más intensa.



Figura 5: Cultivo de *Scenedesmus obliquus* en agua residual (a) y agua residual enriquecida con lixiviado (b); cultivo mixto con agua residual (c) y agua residual enriquecida con lixiviado (d); todos los cultivos están al inicio de la experimentación.

5.3.1 Curva de crecimiento, remoción de nutrientes y cuantificación de carbohidratos y lípidos

Se realizó una curva de crecimiento para cada uno de los cultivos, así como las curvas de remoción de nutrientes y cantidad de carbohidratos y lípidos presentes en la biomasa.

La medición del crecimiento de los cultivos se realizó mediante Sólidos suspendidos Totales (SST mg/L). De cada biorreactor se tomaron 10 mL de muestra que fueron filtrados con papel Whatman GF/A con la finalidad de que los sólidos quedaran retenidos en el filtro, dicho filtro fue previamente puesto a secar en capachillos en la estufa a 105° C durante 20-25 minutos (figura 6) posteriormente se dejaron enfriar en un desecador 20 minutos para ser pesados; una vez que se tuvo la muestra los filtros fueron colocados nuevamente en la estufa a 105° C un lapso de 2 horas a continuación se dejaron en el desecador el mismo tiempo antes mencionado y finalmente fueron pesados.



Figura 6: Secado de biomasa en estufa a 105° C

En el caso de la realización de las pruebas de remoción de nutrientes se tomó de cada cultivo un volumen total de 150 mL, los cuales fueron filtrados al vacío con papel Whatman GF/A, de este filtrado se tomó el volumen requerido para las

pruebas de alcalinidad, nitratos, nitrógeno amoniacal y ortofostatos con las técnicas mencionadas en la tabla 2.

Durante la duración de la curva también se llevó a cabo la cuantificación de carbohidratos y lípidos, dicho monitoreo se realizó con la finalidad de observar si se presentaba un incremento o una disminución de dichas biomoléculas. La cuantificación de carbohidratos fue hecho por el método colorimétrico de fenol-ácido sulfúrico (Dubois, *et. al.*, 1956), el cual es uno de los métodos más utilizados debido a la facilidad del procedimiento, sensibilidad, rapidez de los resultados y por ser apropiado para cuantificar diferentes azúcares como monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos además de que es un método estable y reproducible. La adición de H_2SO_4 provoca la deshidratación de los carbohidratos con la eliminación de tres moles de agua. Con esta reacción se forman derivados del furfural y el 5-hidroximetilfurfural (HMF), el cual es de gran importancia como precursor de otras biomoléculas útiles en la industria alimentaria y energética. En el caso de pentosas, se produce una deshidratación a furfural y en las hexosas a HMF. La presencia del fenol y su interacción con el HMF facilita la formación de complejos que permiten una coloración dorada a la solución y en consecuencia facilitan la cuantificación de los carbohidratos a través de la espectrofotometría (López, *et. al.*, 2017).

El procedimiento se llevó a cabo tomando 1 mL de muestra y colocándolo en un tubo de ensayo, después se adicionó 1mL de fenol al 5% y finalmente 5 mL de H_2SO_4 concentrado, se homogenizó la muestra y se dejó reposando durante 10 minutos. Posteriormente fue colocada en un baño de agua durante 15 min. Finalmente, se midió la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 490 nm en el espectrofotómetro HACH (DR3900).

Mientras que los lípidos fueron cuantificados por el método de sulfofosfovainillina (Mishra, *et. al.*, 2014), este método permite la cuantificación de lípidos en un medio acuoso lo que no es necesario secar la biomasa. La técnica se fundamenta en la reacción de los lípidos insaturados con ácido sulfúrico para formar iones

carbonio. El ión carbonio reacciona con el grupo carbonilo de la fosfovainillina, esta reacción da como resultado un compuesto de color rosado.

Para la cuantificación de lípidos se agregó una cantidad de biomasa conocida en un tubo de ensayo al cual se le agregaron 2 mL de H₂SO concentrado, después la muestra se calentó a 100° C durante 10 minutos, posteriormente se pasa a un baño de hielo por 5 minutos, a continuación se adicionan 5 mL de sulfofosfovainillina, la muestra se incubó por 15 min a 37° C y finalmente se midió la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 530 nm.

Las mediciones fueron hechas al inicio y durante toda la duración de la curva, dos veces por semana además de que se llevaron a cabo para cada biorreactor por triplicado.

5.3.2 Observación microscópica de los cultivos al inicio y final de la curva de crecimiento

Los cultivos fueron revisados en el microscopio óptico Carl Zeiss (Axio Lab.A1) al inicio y al final de la curva con la finalidad de poder observar si se presentaba alguna modificación en la morfología de las microalgas, además en el cultivo mixto se realizó un conteo en la cámara de Neubauer para conocer la proporción inicial y final de las microalgas de *Scenedesmus obliquus* y *Desmodesmus* spp., tanto en los cultivos de agua residual como en los de agua residual enriquecidos con lixiviado, los conteos fueron hechos por duplicado. Es necesario mencionar que la observación y el conteo no se realizó el mismo día que se hicieron las pruebas sino que se tomaron 10 mL de cada uno de los reactores previamente agitados, se colocaron en un tubo de ensayo y fueron guardados en una cámara fría a 4°C, una vez terminada la parte experimental se llevó a cabo el conteo.

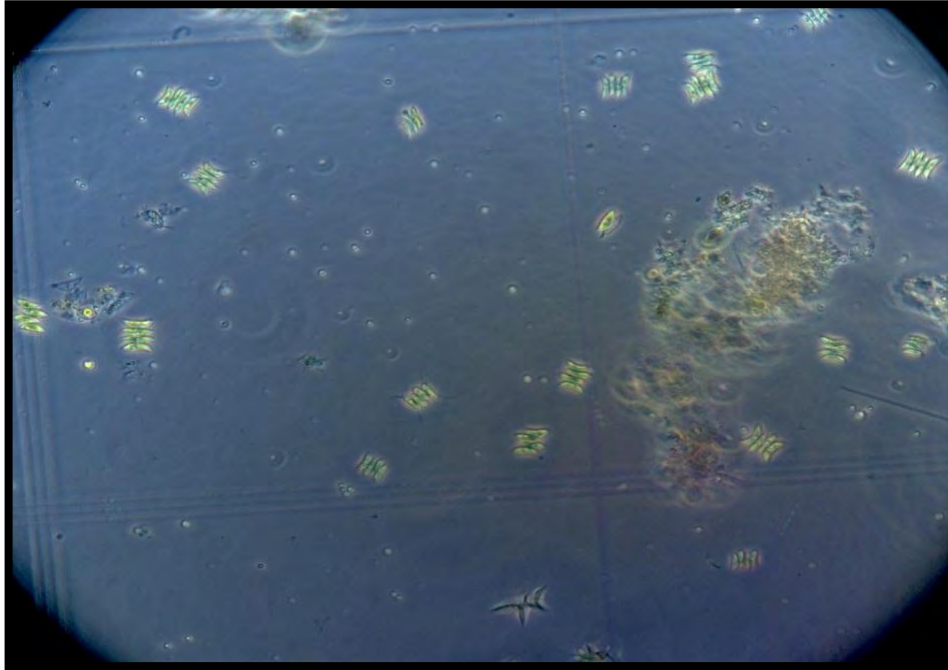


Figura 7: Conteo del cultivo mixto (*S. obliquus* y *Desmodesmus spp.*) en cámara de Neubauer

5.4 Pruebas de cosecha mediante la sedimentación por gravedad

Las pruebas de cosecha de biomasa por el método de sedimentación fueron realizadas en conos Imhoff de acuerdo a la NMX-AA-004-SCFI-2013 utilizando 1 L de cultivo. El método de cosecha por sedimentación se basa en la Ley de Stokes para calcular la velocidad de sedimentación tomando en consideración la aceleración por gravedad, densidad de la partícula, densidad del fluido, diámetro de la partícula y viscosidad del fluido (Borowitzka, *et. al.*, 2016). Tomando en cuenta que las microalgas utilizadas en la presente tesis no son partículas esféricas, la sedimentación se midió realizando lecturas periódicas de turbidez con el equipo Turbidimeter 2100 P, así como el volumen del sedimento, ambas mediciones se realizaron en los mismo intervalos de tiempo, determinando el porcentaje de recuperación de biomasa que se obtuvo en un período de siete días sin tomar en cuenta la velocidad de sedimentación.

Se colocaron seis conos: 3 del cultivo solo con agua residual y 3 del cultivo enriquecido con lixiviado, se midió la altura de los sólidos sedimentados en mL directamente del cono imhoff y la turbidez a los 5 minutos, posteriormente se realizaron las mediciones a los minutos 15, 25, 40, 60, 90, 180, 2880 (2 días), 4320 (3 días), 5760 (4 días) y 10080 (7 días) para *Scenedesmus obliquus* y en el cultivo mixto se realizó la medición en el minuto 4320 (3 días).

Cabe destacar que la sedimentación de los cultivos no se llevó de manera simultánea, primero se sedimentaron los cultivos de *S. obliquus* durante los 7 días (figura 8), una vez que se retiraron y se recuperó la biomasa se colocaron a sedimentar los cultivos mixtos (*S. obliquus-Desmodesmus* spp.) también durante 7 días. Cada prueba fue realizada por triplicado.

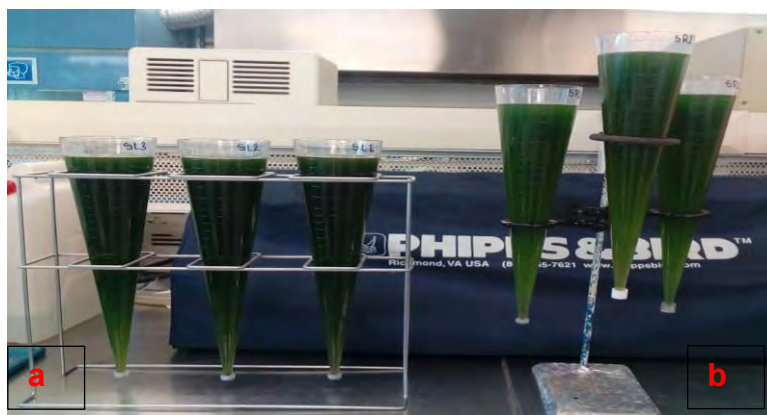


Figura 8: Sedimentación de cultivo de *Scenedesmus obliquus* en conos imhoff, a) agua residual enriquecida con lixiviado; b) agua residual

Después de transcurridos los 7 días se retiró el sobrenadante y se recuperó el sedimento, midiendo en una probeta los mililitros recuperados, posteriormente para realizar las pruebas de SST, carbohidratos y lípidos se hizo una dilución sedimento microalgal-agua destilada (2:14).

En las pruebas de sedimentación también se realizó la observación microscópica de los cultivos antes y después de la cosecha para verificar el estado de la biomasa ya que de acuerdo a Barros, *et. al.* (2015) la biomasa puede sufrir descomposición debido a los largos periodos de sedimentación y los cambios de

temperatura a los que está expuesta, también se llevó a cabo conteo con la cámara de Neubauer para conocer la proporción final de microalgas de *S. obliquus* y *Desmodesmus* spp., en el cultivo mixto estas observaciones se realizaron directamente del sedimento.

Se obtuvo el porcentaje de recuperación de biomasa así como carbohidratos y lípidos presentes en dicha biomasa.

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS

6.1 Caracterización del agua residual y lixiviado

En la tabla 5 se muestran los valores promedio obtenidos en la caracterización del agua residual y lixiviado utilizados en el cultivo de microalgas. Se puede observar la diferencia que existe entre los parámetros del agua residual con respecto al lixiviado, en este último los valores son más elevados. El caso más notorio es el de nitrógeno amoniacal ya que el lixiviado supera la concentración del agua residual casi 40 veces.

Tabla 5: Características fisicoquímicas promedio de agua residual y lixiviado

Parámetro	Agua residual	Lixiviado
pH	7.7 ± 0	8.5 ± 0
Alcalinidad total como CaCO ₃ (mg/L)	15 ± 1.4	1 042 ± 2.8
Demanda química de oxígeno (mg/L)	69.5 ± 7.7	2 094 ± 49.4
Nitratos (mg/L)	8.9 ± 0.4	152.4 ± 19.7
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	26.86 ± 0	1 139.6 ± 35.6
Ortofosfatos (mg/L)	22.74 ± 0.6	34.86 ± 3.6
Sólidos suspendidos totales (mg/L)	195 ± 7.0	870 ± 42.4

En general, el grado de biodegradabilidad de los lixiviados es inversamente proporcional a su edad, siendo más biodegradables los jóvenes y menos los maduros, de acuerdo a la caracterización fisicoquímica obtenida en este trabajo el lixiviado utilizado corresponde a un lixiviado maduro (estabilizado o viejo) (Bhalla, *et. al.*, 2012, Torres, *et. al.*, 2014)

6.2 Cultivo de microalgas en agua residual enriquecida con lixiviado

6.2.1 Curva de crecimiento

Se obtuvieron gráficas de SST (mg/L) para determinar el crecimiento del cultivo de *S. obliquus* y del cultivo mixto (*S. obliquus-Desmodesmus* spp.)

En la figura 9 se puede observar que el crecimiento en el cultivo de *S. obliquus* es similar en ambos medios, obteniendo en el de agua residual una concentración de 630 mg/L y para el medio enriquecido con lixiviado 685 mg/L, mientras que en la figura 10 se aprecia el crecimiento del cultivo mixto, en agua residual fue de 515 mg/L y en agua residual enriquecida con lixiviado fue de 610 mg/L.

En este trabajo se trató de replicar las concentraciones de nitrógeno amoniacal utilizadas por Hernández (2017) quien realizó experimentos con diferentes porcentajes de lixiviado siendo el porcentaje del 7% con el que logró que se generaran 1.260 g/L para un cultivo de *Desmodesmus* spp. y 1.185 g/L para un cultivo de *S. obliquus* en un periodo de 28 días. En la presente tesis no fue posible utilizar este porcentaje del 7% debido a que se determinó que el lixiviado presentó una concentración menor de nitrógeno amoniacal, por lo que se ocupó lixiviado al 10% (154 mg/L de nitrógeno amoniacal para ambos cultivos) para poder iniciar en una concentración similar de nitrógeno amoniacal al 7% (167 mg/L *Desmodesmus* spp. y 145 mg/L en *S. obliquus*).

La cantidad de biomasa generada con lixiviado al 10% puede considerarse baja en comparación con el del 7% a pesar de tener concentraciones similares de nitrógeno amoniacal. Al respecto, se ha reportado que el lixiviado tiene efectos tanto positivos como negativos sobre el cultivo. Cheung *et. al.*, (1993) trabajaron con diferentes porcentajes de lixiviado para observar el efecto del lixiviado sobre las microalgas y reportan que para el género de *Scenedesmus* a partir de concentraciones de 143 mg/L de nitrógeno amoniacal se inhibe el crecimiento microalgal. Por su parte Zhao, *et. al.*, (2014) utilizando *Chlorella pyrenoidosa* obtuvieron la máxima cantidad de biomasa con una concentración de 183 mg/L de

nitrógeno amoniacal, sin embargo, también reportan que a una mayor concentración se presenta un efecto inhibitorio en el crecimiento. La baja producción de biomasa de la presente tesis puede deberse principalmente a la coloración de los cultivos y no a la concentración de nitrógeno amoniacal ya que a mayor porcentaje de lixiviado el cultivo presenta una coloración café oscuro bastante intenso, lo que perjudica directamente la penetración de luz al cultivo afectando la actividad fotosintética, lo que probablemente contribuiría a la inhibición del crecimiento de las microalgas (Zhao, *et. al*, 2014).

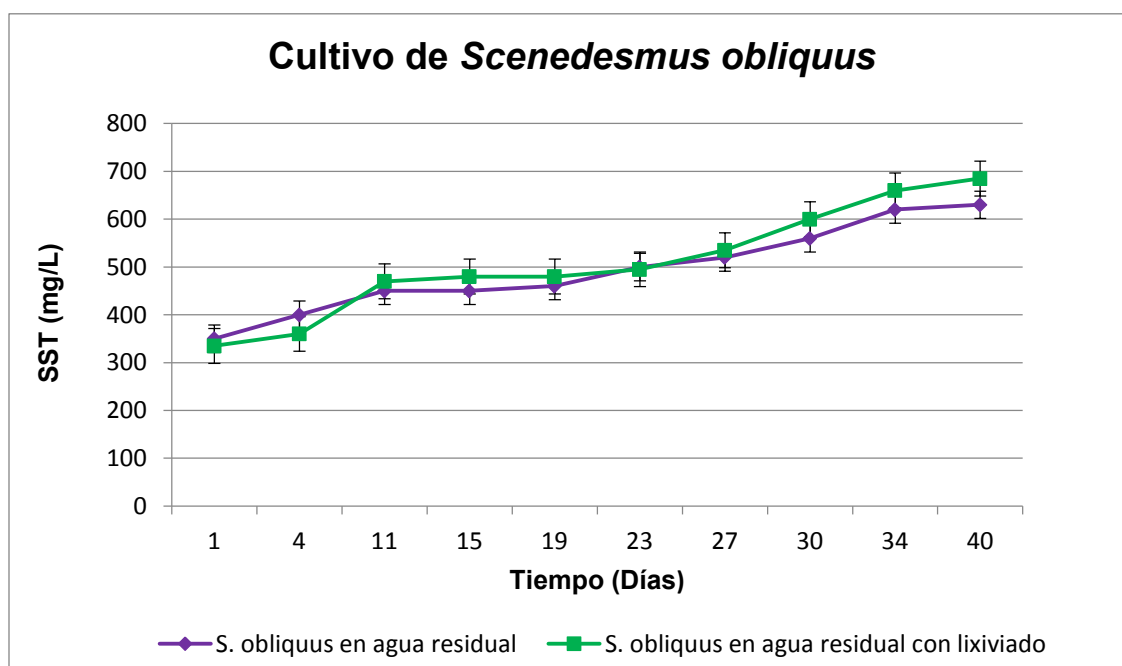


Figura 9: Curva de crecimiento de *S. obliquus* en agua residual y agua residual enriquecida con lixiviado

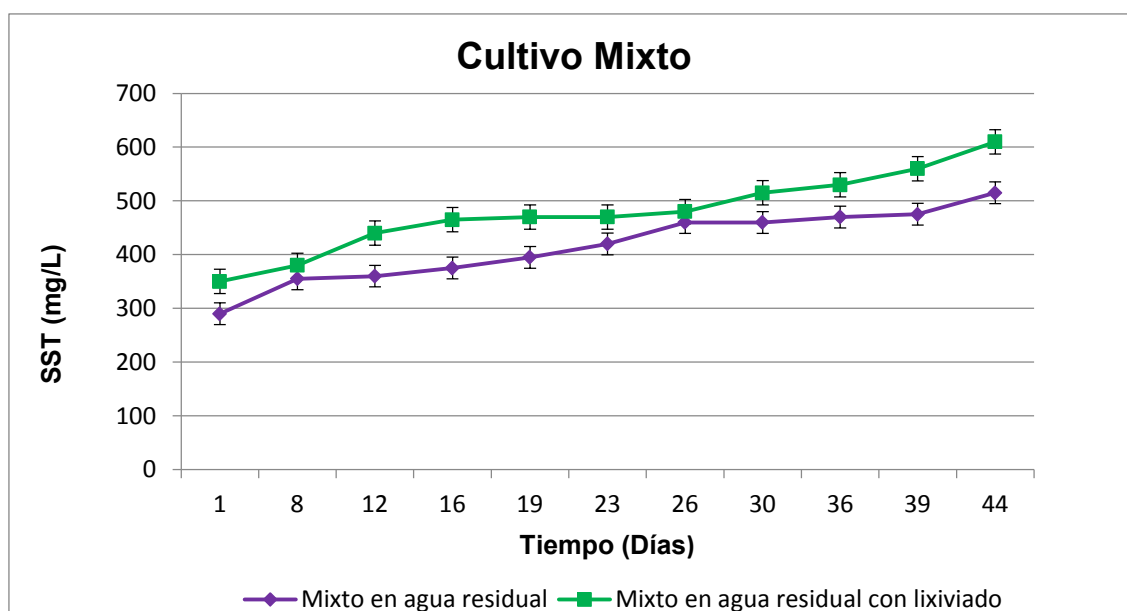


Figura 10: Curva de crecimiento de cultivo mixto (*S. obliquus-Desmodesmus spp.*) en agua residual y agua residual enriquecida con lixiviado

En la siguiente tabla (6) se puede observar la máxima concentración de biomasa alcanzada al momento de detener la curva de crecimiento así como la productividad de cada uno de los cultivos.

Tabla 6: Biomasa y productividad de los cultivos de *S. obliquus* y cultivos mixtos.

Cultivo	Biomasa (g/L)	Productividad (g/L*d)
<i>S. obliquus</i> en agua residual	0.630	0.038
<i>S. obliquus</i> en agua residual con lixiviado	0.685	0.038
Mixto en agua residual	0.515	0.041
Mixto en agua residual con lixiviado	0.610	0.042

6.2.2 Remoción de nutrientes

Los resultados obtenidos con respecto a la remoción de nutrientes se muestra en las figuras 11-12 para el cultivo de *S. obliquus* y 13-14 para el cultivo mixto, se puede observar que conforme se incrementa la biomasa, los nutrientes van disminuyendo, siendo el nitrógeno amoniacal el primero en ser asimilado por las microalgas. Al ser la principal fuente de nitrógeno, la remoción fue del 100 % para el cultivo de *S. obliquus* en ambos medios de cultivo mientras que en el cultivo mixto en agua residual la remoción fue del 100 % en tanto que en agua residual enriquecida con lixiviado la remoción fue del 85.45%.

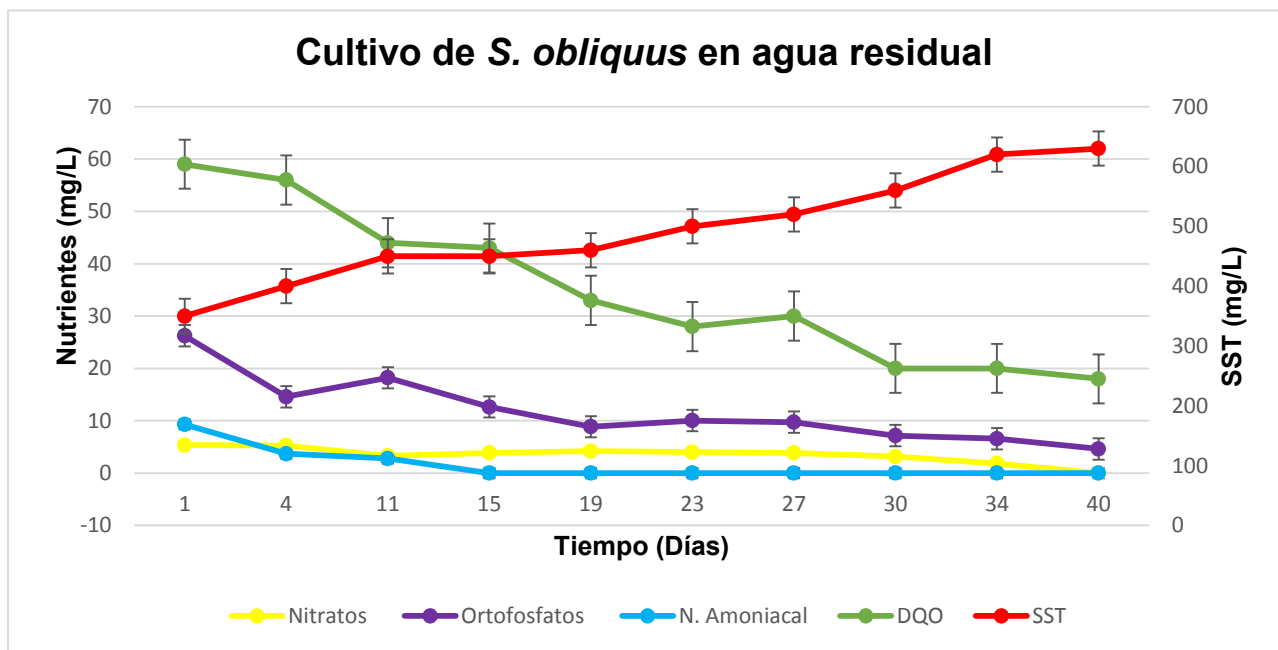


Figura 11: Remoción de nutrientes en el cultivo de *S. obliquus* en agua residual

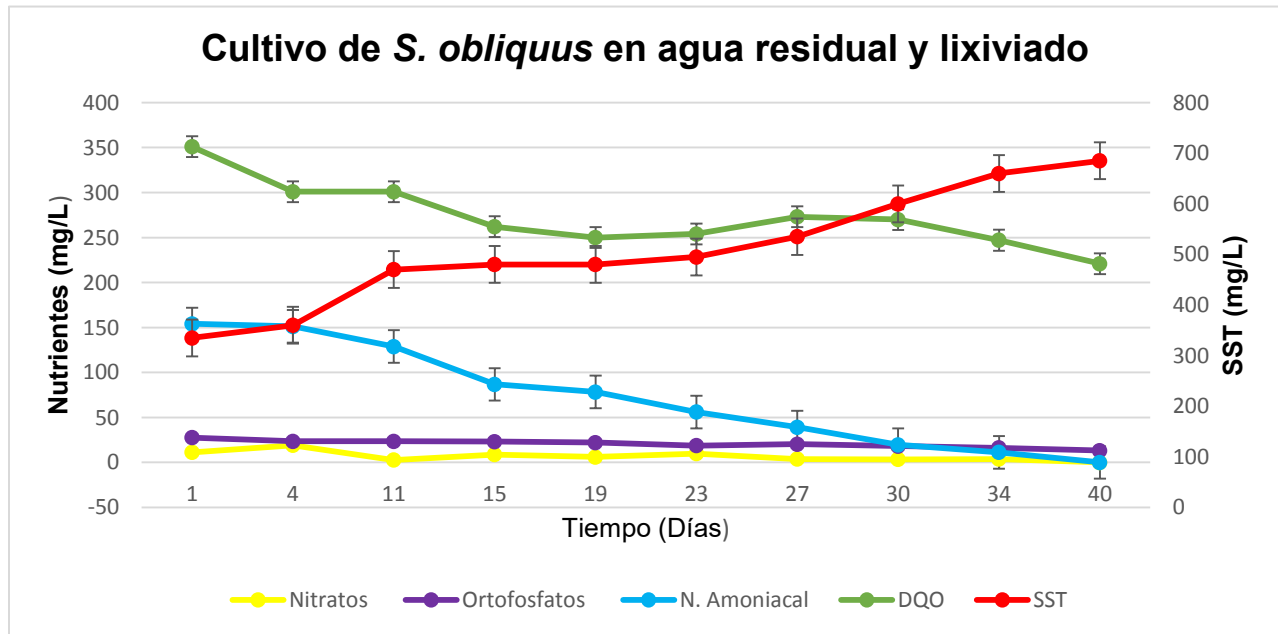


Figura 12: Remoción de nutrientes en el cultivo de *S. obliquus* en agua residual enriquecida con lixiviado

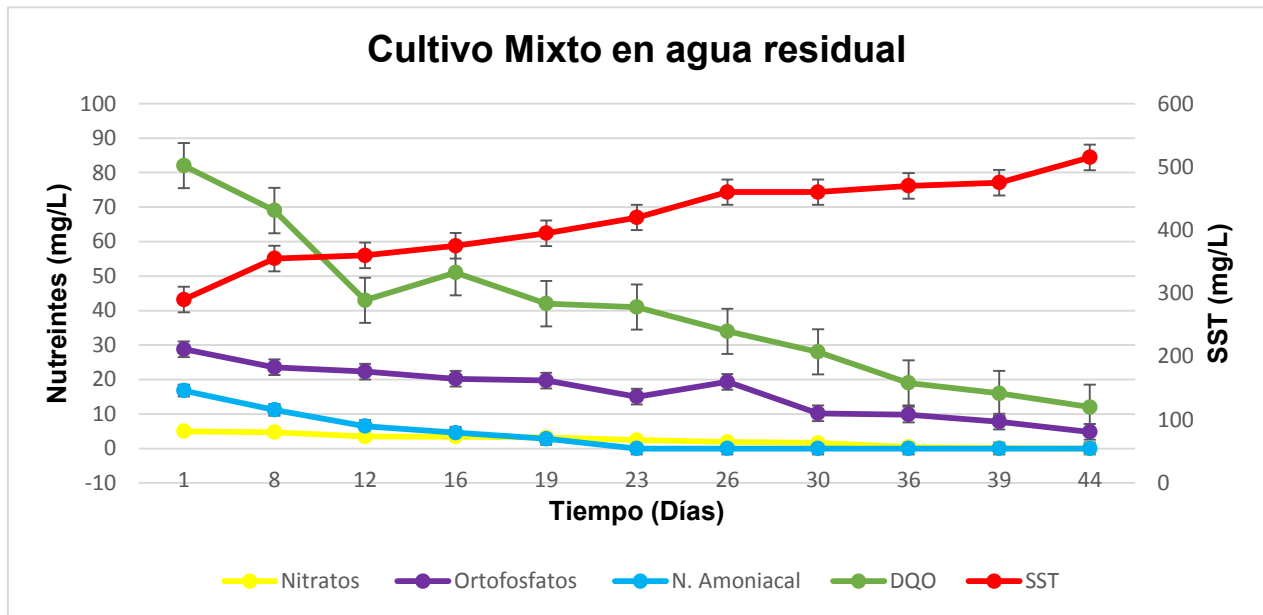


Figura 13: Remoción de nutrientes en el cultivo mixto (*S. obliquus-Desmodesmus* spp.) en agua residual

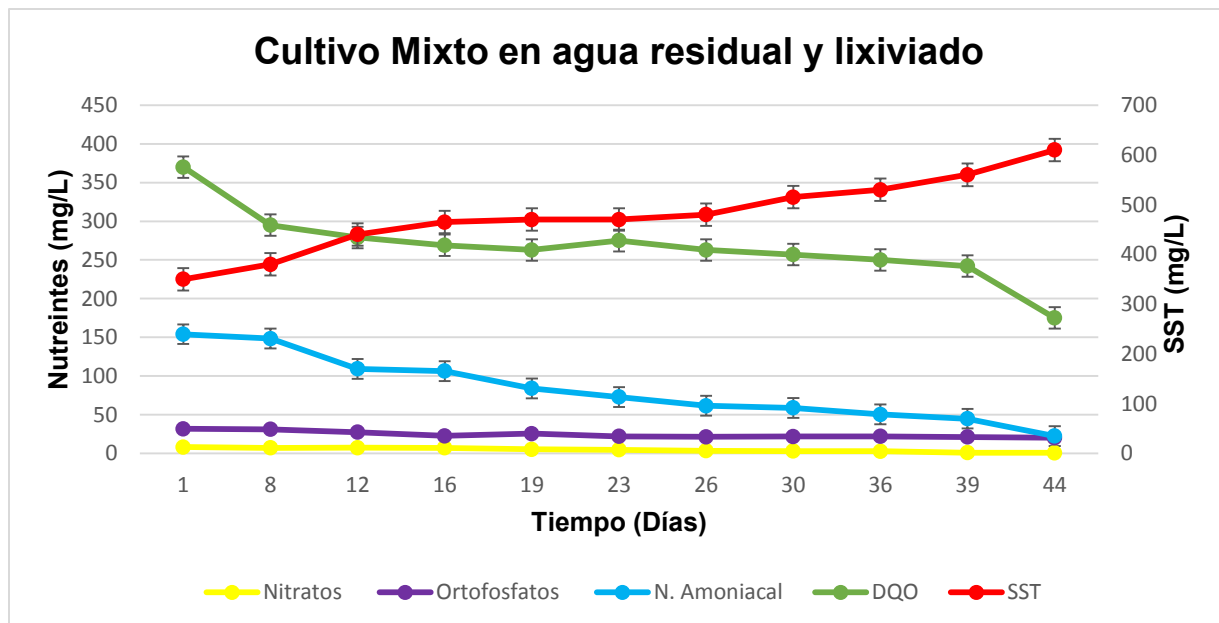


Figura 14: Remoción de nutrientes en el cultivo mixto (*S. obliquus* -*Desmodesmus* spp.) en agua residual enriquecida con lixiviado

Samori *et. al.*, (2013) utilizando *Desmodesmus communis* y un consorcio con predominancia de especies del género de *Scendesmus* y *Desmodesmus* en agua residual urbana obtuvieron porcentajes de 100% de remoción de nitrógeno amoniacal y ortofosfatos. En la presente tesis los porcentajes de remoción de ortofosfatos fueron mucho menores, con un 62% para *S. obliquus* y un 65% para el cultivo mixto en agua residual, en el caso del nitrógeno amoniacal en ambos casos la remoción fue del 100%, esto en los cultivos en el que el medio era solo agua residual (grupo control). Mientras que Zhang, *et. al.*, (2014) trabajaron con un cultivo de *S. obliquus* obteniendo como resultado una remoción de 100% para nitrógeno y fósforo.

En el caso de los cultivos enriquecidos con lixiviado, Lin, *et. al.*, en el 2007 realizaron experimentos con las microalgas *C. pyrenoidosa* y *C. snowiae* para determinar si el tratamiento de lixiviado es viable utilizando microalgas tolerantes al nitrógeno, reportando que el máximo crecimiento lo tuvieron con el lixiviado al 10%, y porcentajes de remoción de más del 60 % para $N-NH_4^+$, DQO y ortofosfatos. Zhao, *et. al.*, (2014) utilizando *C. pyrenoidosa* y como medio de

cultivo lixiviado diluido en agua residual tuvieron una remoción de más del 95% para ortofosfatos y 99 % para N-NH_4^+ . Mientras que Sforza, *et. al.*, en el 2015 trabajaron con *Acutodesmus obliquus* y lixiviado en estado puro y en concentraciones de 50, 34, 25, 10 % diluido en agua desionizada, encontrando que en el lixiviado puro no hubo crecimiento por lo que no se tomaron en cuenta los nutrientes, en cuanto a nitrógeno la remoción vario entre 30-97%, mientras que para el fósforo siempre fue > 90%, los mejores resultados en cuanto a remoción fueron obtenidos en el cultivo cuya concentración fue de lixiviado al 10%.

En este trabajo los porcentajes de remoción en cuanto a nitrógeno son similares a los reportados en la literatura siendo el cultivo mixto enriquecido con lixiviado el que tuvo una menor remoción de N-NH_4^+ con el 85%, que aun así la remoción se encuentra por arriba de lo reportado por Lin, *et. al.*, que fue del 60%. Mientras que para los ortofosfatos la máxima remoción fue del 83% para el cultivo mixto en agua residual y la más baja fue del 36% para el cultivo mixto enriquecido con agua residual, esto pudo deberse a la composición del lixiviado o al tipo de asimilación que tuvo la microalga con respecto al fósforo.

De acuerdo a la literatura los géneros de microalgas más utilizados para el tratamiento de aguas son *Scendesmus*, *Desmodesmus* y *Chlorella* también se han reportado otros géneros como *Nannochloropsis* y algunas cianobacterias filamentosas como *Fischerella* y *Spirulina* (Park, *et. al.*, 2010; Su, *et. al.*, 2012).

Aunque en este trabajo los porcentajes de remoción para fósforo no fueron tan altos como los reportados en la bibliografía, especialmente en los cultivos enriquecidos con lixiviado, las microalgas cumplen con la función de tratar el agua.

En la tabla 7 se puede apreciar de manera resumida los resultados obtenidos con respecto a la remoción de nutrientes para cada uno de los cultivos.

Tabla 7: Remoción de nutrientes

Cultivo	Condición	Nitratos			Ortofosfatos			N. Amoniacal			DQO		
		Inicio (mg/L)	Final (mg/L)	Remoción (%)	Inicio (mg/L)	Final (mg/L)	Remoción (%)	Inicio (mg/L)	Final (mg/L)	Remoción (%)	Inicio (mg/L)	Final (mg/L)	Remoción (%)
Cultivo de <i>S. obliquus</i>	Agua residual	5.35 ± 4.59	0	100	26.24 ± 7.55	4.62 ± 0.02	62.31	9.3 ± 0.28	0	100	59 ± 9.19	18 ± 2.82	69.49
	Agua residual enriquecida con lixiviado	11.3 ± 0.70	0	100	27.59 ± 0.68	13.24 ± 0.42	50.92	154 ± 0.07	0	100	351 ± 7.07	221 ± 6.36	37.03
Cultivo Mixto	Agua residual	5 ± 4.10	0	100	28.8 ± 1.41	4.81 ± 0.21	83.29	16.8 ± 0.14	0	100	82 ± 13.43	12 ± 2.82	85.36
	Agua residual enriquecida con lixiviado	8.1 ± 0.28	0.8 ± 0	90.12	31.75 ± 0.16	20.07 ± 0.29	36.78	154 ± 0.07	22.40 ± 0	85.45	370 ± 2.82	175 ± 14.14	52.70

6.2.3 Cuantificación de carbohidratos y lípidos

Se cuantificaron los carbohidratos y lípidos a partir de la biomasa obtenida a lo largo de la curva de crecimiento, el porcentaje de carbohidratos y lípidos para el cultivo de *S. obliquus* se muestran en la figura 15, mientras los porcentajes correspondientes para el cultivo mixto se puede observar en la figura 16.

Hernández (2017), realizó cuantificación de carbohidratos y lípidos a un cultivo de *S. obliquus* y uno de *Desmodesmus* spp. que tenían como medio agua residual y lixiviado a los cuales indujo a limitación de nutrientes retirando el medio, con lo que alcanzó un 30% de carbohidratos y 16% de lípidos en el cultivo experimental de *S. obliquus* y 30% de carbohidratos y 14% de lípidos en cultivo experimental. Para el cultivo de experimental de *Desmodesmus* spp. se alcanzó la cantidad de 41% de carbohidratos y 20% de lípidos y en el cultivo control 25% de carbohidratos y 15% de lípidos. Mientras que en los resultados obtenidos en este trabajo la cantidad alcanzada al finalizar la curva de crecimiento fue de 18% de carbohidratos y 13% de lípidos en el cultivo de *S. obliquus* control y 20% de carbohidratos y 6% de lípidos para el cultivo experimental, es importante mencionar que la cantidad de lípidos al inicio de la curva de crecimiento es más alta que al final (figura 15). En el caso del cultivo mixto control fue de 17% para carbohidratos y 14% para lípidos en tanto que para el cultivo experimental fue de 31% de carbohidratos y 9% para lípidos (figura 16).

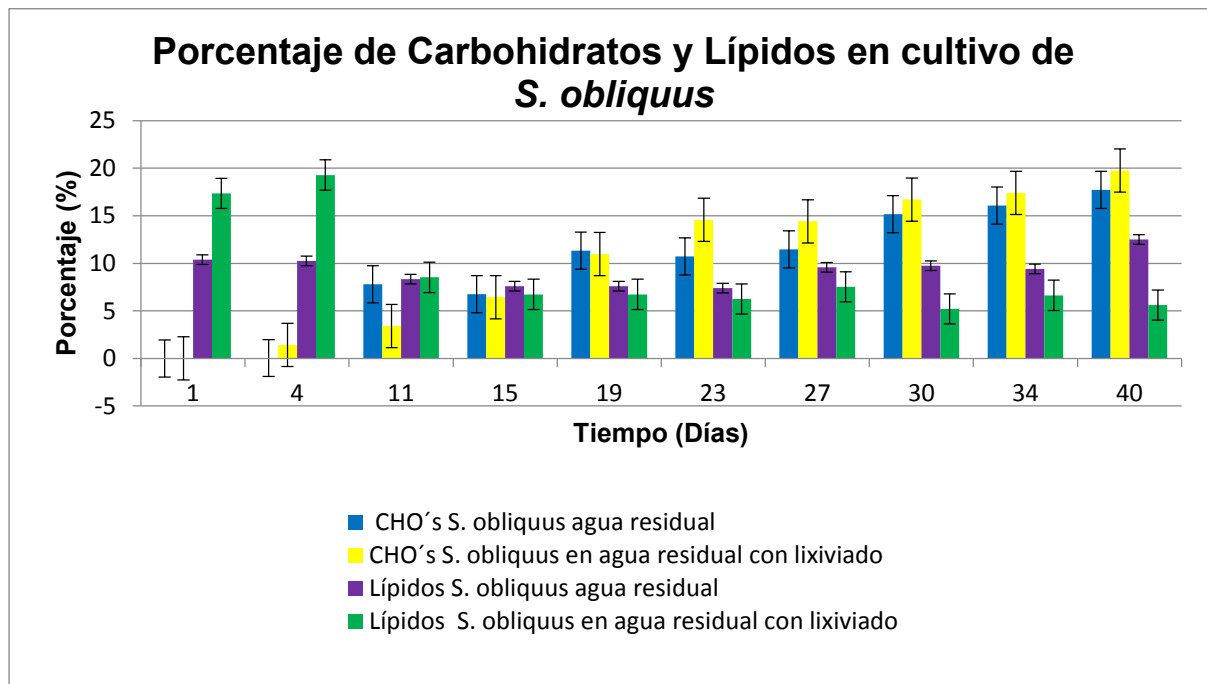


Figura 15: Porcentaje de carbohidratos y lípidos del cultivo de *S. obliquus* en agua residual y agua residual enriquecida con lixiviado

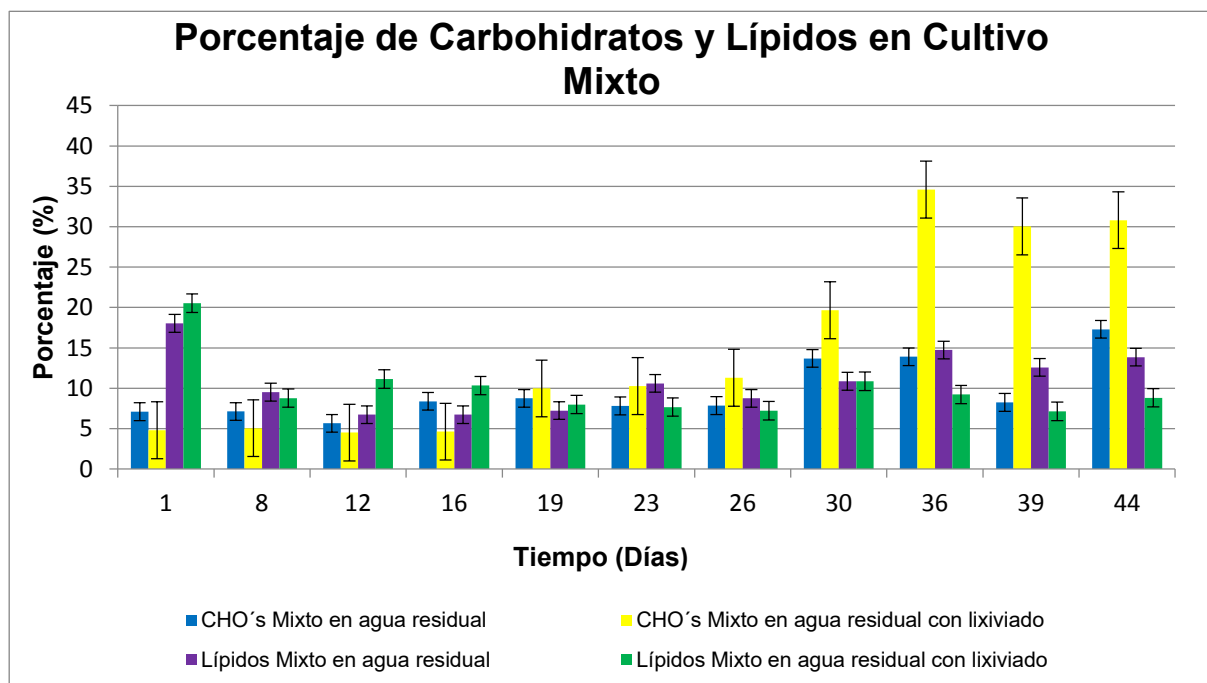


Figura 16: Porcentaje de carbohidratos y lípidos del cultivo mixto en agua residual y agua residual enriquecida con lixiviado

6.2.4 Observación microscópica al inicio y final de la curva

Se hicieron observación al microscopio de los cultivos al inicio y final de la curva de crecimiento, para determinar si se presentaba algún cambio morfológico en las microalgas.

En la figura 17 se puede ver el cultivo de *S. obliquus* en agua residual y agua residual enriquecida con lixiviado, en ambos casos se aprecia que la microalga se encuentra en forma unicelular. Mientras que en la figura 18 se observa que las formas unicelulares pasan a ser cenobios de 4 y hasta de 8 células, además de que se observó la presencia de otra microalga la cual fue identificada como *Nannochloropsis*. Se llevó a cabo un conteo para conocer cuál era la proporción en la que se encontraban ambas microalgas y en el cultivo control se obtuvo una proporción *S. obliquus* de 95% y 5% de *Nannochloropsis* y en el cultivo experimental fue de 90% y 10% respectivamente.

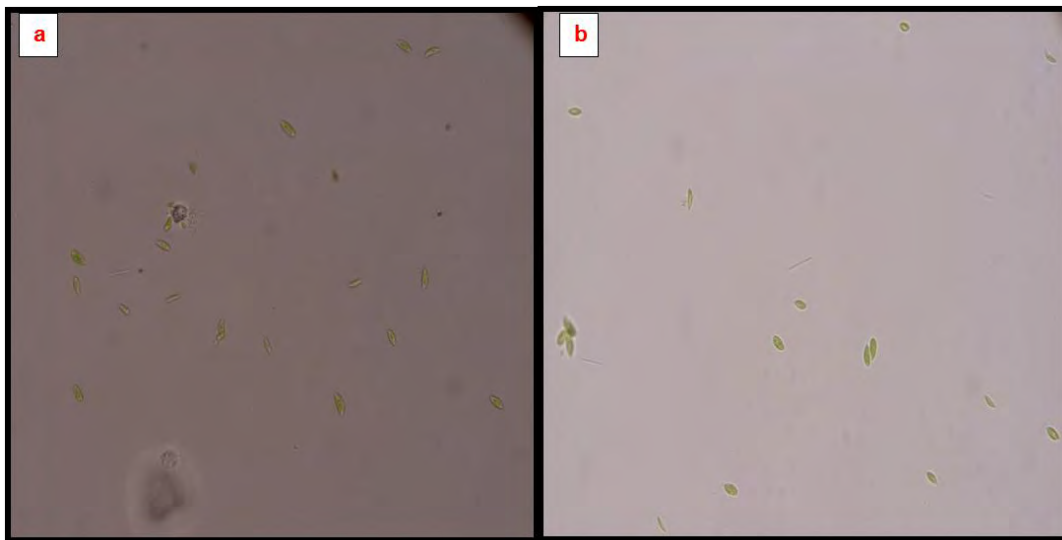


Figura 17: Cultivo de *S. obliquus* en agua residual (a) y agua residual enriquecida con lixiviado (b) al inicio de la curva de crecimiento

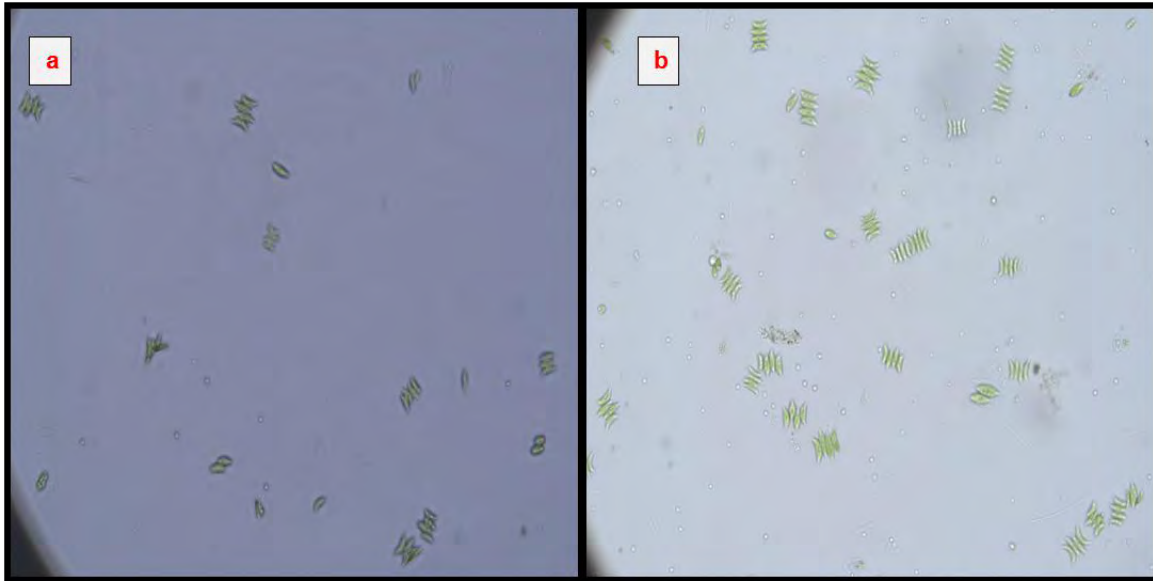


Figura 18: Cultivo de *S. obliquus* en agua residual (a) y agua residual enriquecida con lixiviado (b) al final de la curva de crecimiento

Para el caso del cultivo mixto se realizó un conteo para conocer la proporción en la que iniciaba cada microalga. Teniendo como resultado que para el cultivo control (agua residual) el porcentaje de *S. obliquus* fue de 60% y de *Desmodesmus* spp. fue de 40% mientras que para el cultivo experimental (agua residual enriquecido con lixiviado) la proporción fue de 70% y 30% respectivamente. Las formas dominantes al inicio de la curva de crecimiento de *S. obliquus* fueron unicelulares y de *Desmodesmus* spp. fueron cenobios de dos células con espinas (figura 19).

Al finalizar la curva de crecimiento se puede observar que en el cultivo control *S. obliquus* pasó a cenobios de 4 células y *Desmodesmus* spp. se mantuvo en cenobios de 2 células con espinas, mientras que en el cultivo experimental se mantuvieron las mismas formas que al comienzo, unicelulares para *S. obliquus* y cenobios de 2 células con espinas para *Desmodesmus* spp. (figura 20). Así mismo se observó la presencia de la microalga *Nannochloropsis*, así como el desplazamiento de *S. obliquus* a *Desmodesmus* spp. por lo que se realizó un conteo para conocer la proporción final de las 3 microalgas presentes en el cultivo. En el cultivo control la proporción fue 84%:4%:12% de *S. obliquus*, *Desmodesmus*

spp. y *Nannochloropsis*, mientras que en el cultivo experimental fue de 86%:9%:5% respectivamente.

Los cambios que pueden realizar las microalgas en cuanto a la formación o desintegración de cenobios se conocen como plasticidad fenotípica y se da como respuesta a las condiciones ambientales. Por ejemplo, el exceso de nitrógeno provoca que predominen las formas unicelulares y la pérdida de espinas, como en el caso del presente trabajo en el cultivo mixto enriquecido con lixiviado el nitrógeno amoniacal no fue consumido por completo lo que permitió que las células de *S. obliquus* conservaran su forma unicelular, por el contrario la limitación de nitrógeno permite que predominen los cenobios de 2 a 8 células como en el caso de los otros tres cultivos que se quedaron sin una fuente de nitrógeno y las células formaron cenobios de 4 y hasta de 8 (Lürling, 2003; Hernández, 2017). En los cuadros dentro de las fotografías se puede observar los cenobios de 2 células de *Desmodesmus* spp.

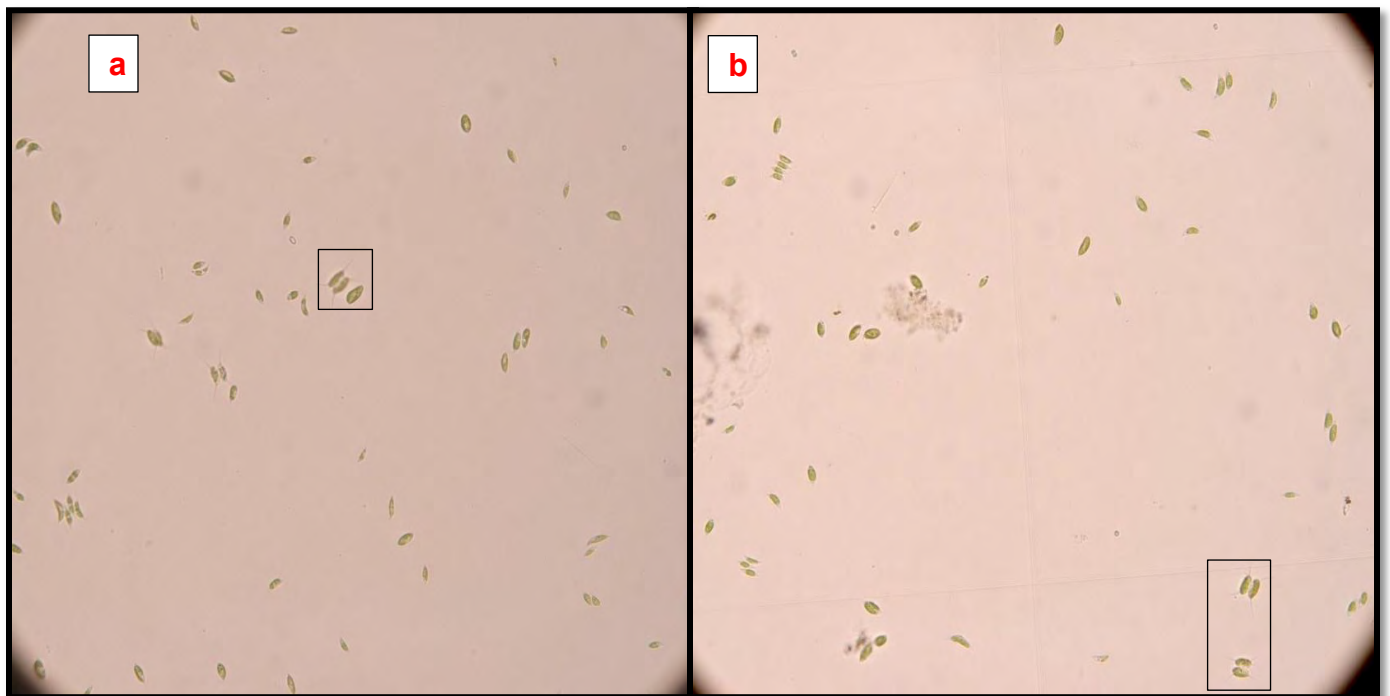


Figura 19: Cultivo Mixto (*S. obliquus-Desmodesmus* spp.) en agua residual (a) y agua residual enriquecida con lixiviado (b) al inicio de la curva de crecimiento

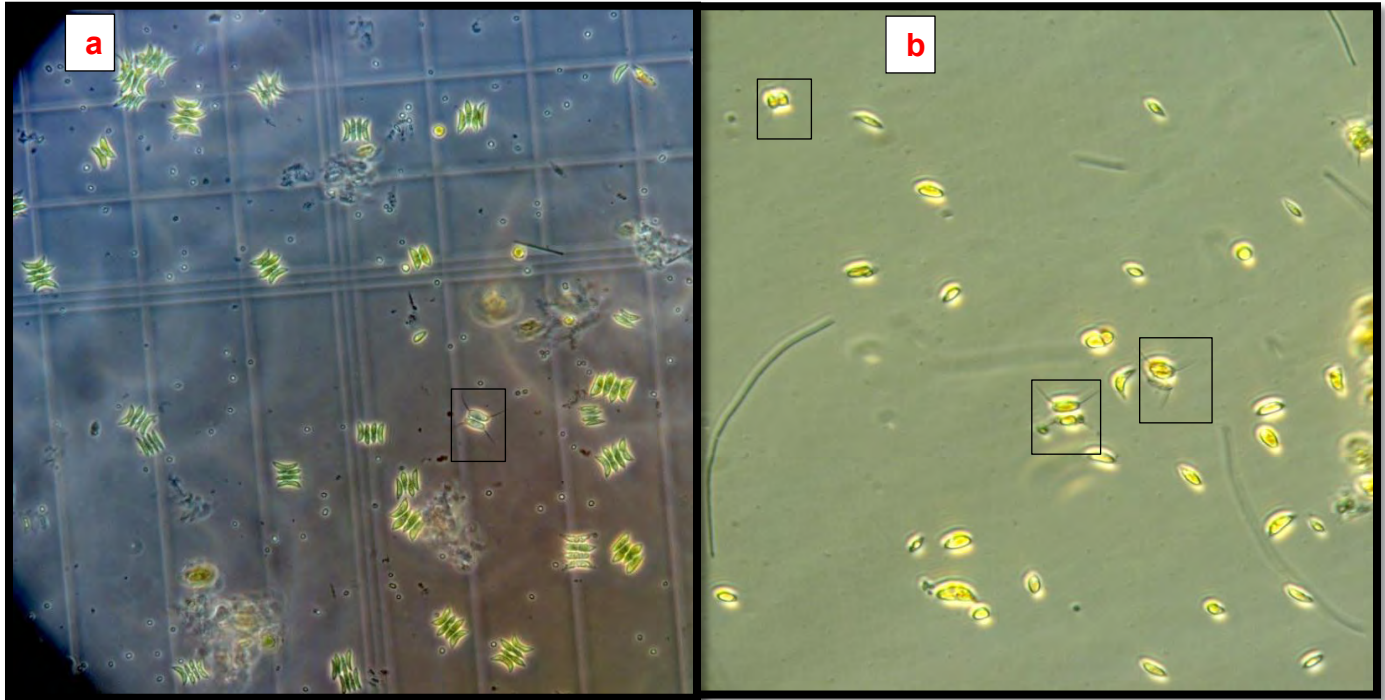


Figura 20: Cultivo Mixto en agua residual (a) y agua residual enriquecida con lixiviado (b) al final de la curva de crecimiento ambas con la presencia de *Nannochloropsis*

6.2.5 Observación microscópica después de la cosecha

También se realizó observación microscópica después del cosechado de las microalgas, en la figura 21 se puede observar el cultivo de *S. obliquus* (control y experimental) y en la figura 22 el cultivo mixto (control y experimental), la muestra para realizar la observación fue tomada directamente del sedimento recuperado.

Se puede observar en la figura 21 que siguen predominando los cenobios de 4 células y se observó que aún persiste la presencia de *Nannochloropsis* por lo que también se realizó un conteo para conocer la proporción de los cultivos: 97% de *S. obliquus* y 3% de *Nannochloropsis*, en el cultivo control y 95% de *S. obliquus* y 5% de *Nannochloropsis* en el cultivo experimental.

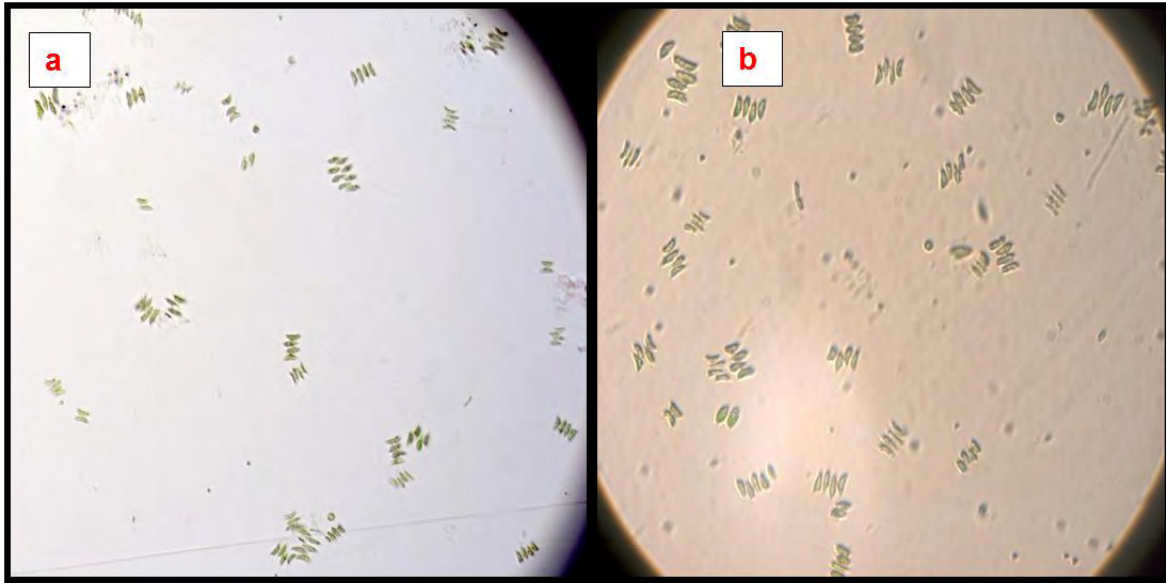


Figura 21: Cultivo de *S. obliquus* en agua residual (a) y en agua residual enriquecida con lixiviado (b)

En el cultivo mixto (figura 22) también se mantuvieron las formas celulares que tenía el cultivo antes de la cosecha, en el cultivo control *S. obliquus* con cenobios de 4 células y *Desmodesmus* spp. se mantuvo en cenobios de 2 células con espinas, mientras que en el cultivo experimental se mantuvieron las mismas formas que al comienzo, unicelulares para *S. obliquus* y cenobios de 2 células con espinas para *Desmodesmus* spp. En este punto también se realizó un conteo ya que como se menciona anteriormente en estos cultivos *S. obliquus* desplazó casi en su totalidad a *Desmodesmus* spp., quedando las proporciones de la siguiente manera: en el cultivo control *S. obliquus* 97%, *Desmodesmus* spp. 2% y *Nannochloropsis* 1%, y en el cultivo experimental *S. obliquus* 96%, *Desmodesmus* spp. 2% y *Nannochloropsis* 2%.

González (2010) realizó experimentos acerca la influencia de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en las interacciones competitivas entre *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*, obtenido como resultados que *C. vulgaris* es el competidor más fuerte y el nitrógeno es el nutriente que más afecta el crecimiento poblacional de las dos especies lo que provoca que se presente la competencia inter-

específica que lleva a la exclusión de una de las dos especies. En este caso el competidor más fuerte fue *S. obliquus* ya que se adaptó mejor en ambos medios.

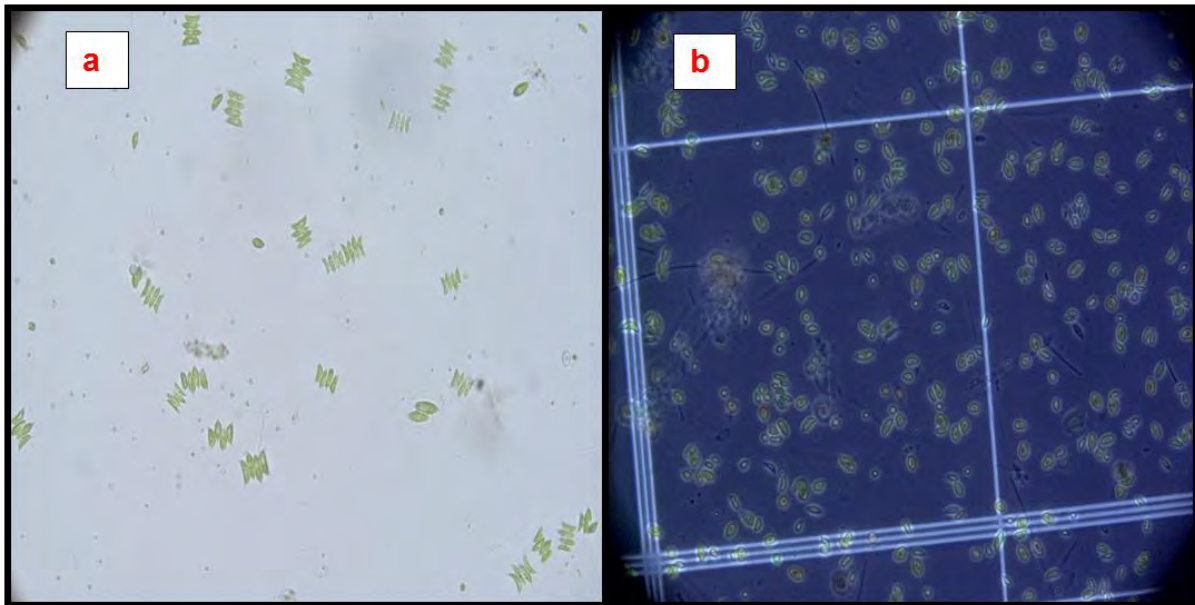


Figura 22: Cultivo de Mixto (*S. obliquus-Desmodesmu spp.*) en agua residual (a) y en agua residual enriquecida con lixiviado (b).

6.3 Pruebas de cosecha mediante sedimentación por gravedad

6.3.1 Mediciones periódicas de turbidez

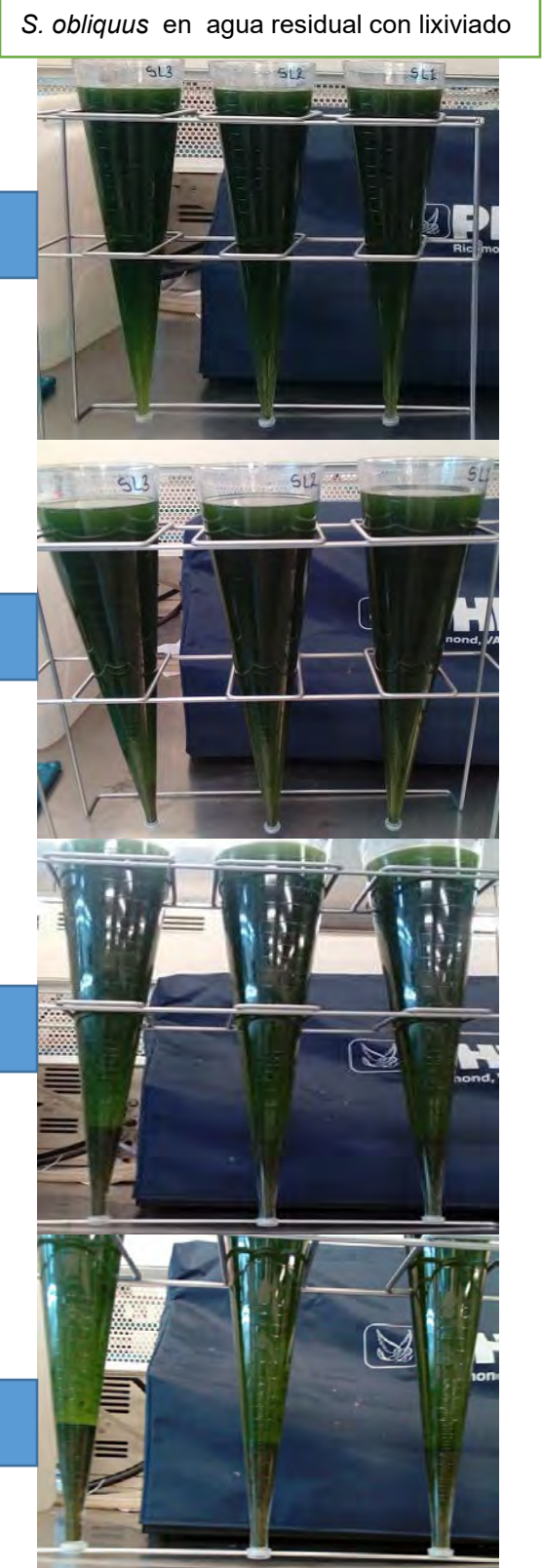
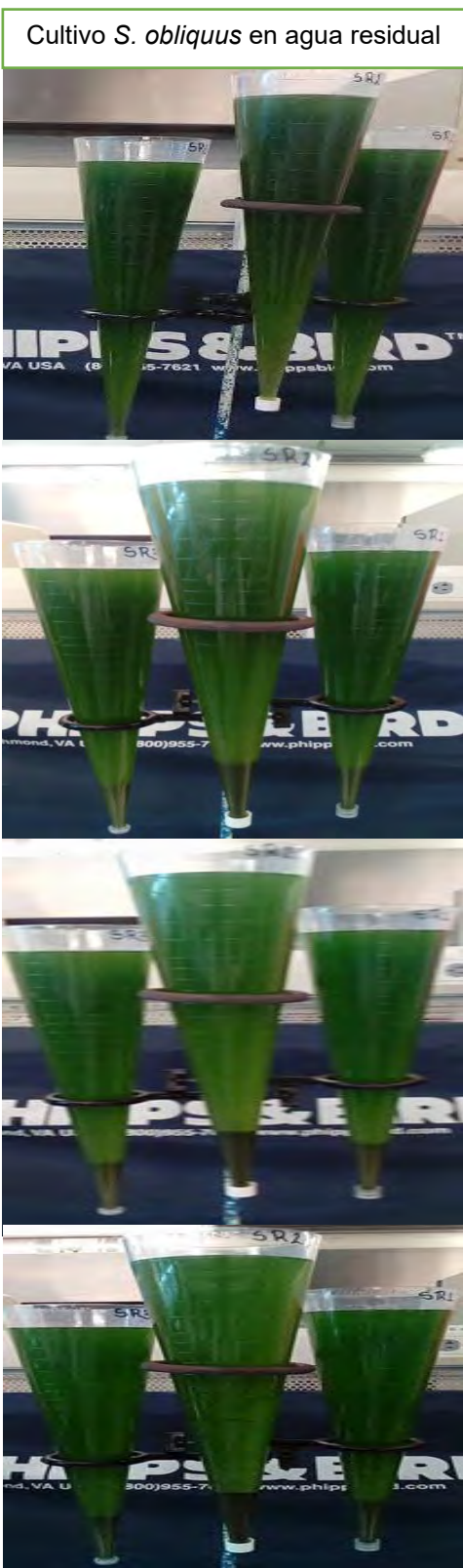
En las figuras 23 y 24 se puede observar, el proceso de sedimentación que tuvo una duración de 7 días (10080 minutos), se evaluó la capacidad de sedimentación de las microalga *S. obliquus* y un cultivo mixto (*S. obliquus-Desmodesmus spp.*) sin la adición de ningún tipo de sustancia química midiendo la turbidez y el volumen de la biomasa sedimentada en los tiempo mencionados anteriormente. Las mediciones de volumen permitieron observar que el sedimento empieza a ser estable una vez transcurridos aproximadamente 60 minutos, sin embargo, a lo largo de los 7 días de sedimentación se pudo observar que se sigue sedimentando el cultivo aunque no sea muy perceptible a simple vista. A través de las mediciones de turbidez fue posible determinar de mejor manera como es que los

cultivos se sedimentaron ya que se tomó una muestra directamente del sobrenadante.

Se puede ver que al final del proceso de sedimentación el agua no queda completamente libre de microalgas, esto puede deberse principalmente a la presencia de *Nannochloropsis* ya que al ser la de menor tamaño tarda más en sedimentar, por lo que se puede inferir que es la que se encuentra en el sobrenadante dando todavía el color verde al agua.

Como ya se había mencionado en la parte de metodología el cultivo de *S. obliquus* y el cultivo mixto no fueron sedimentados simultáneamente por esta razón la curva de crecimiento del cultivo mixto fue de más tiempo.

En la figura 23 se muestra el proceso de sedimentación del cultivo de *S. obliquus* en agua residual y agua residual enriquecida con lixiviado, mientras que en la figura 24 se observa el proceso del cultivo mixto en agua residual y agua residual enriquecida con lixiviado durante los 7 días.



t=0

t=15
min.

t=60
min.

t=180
min.

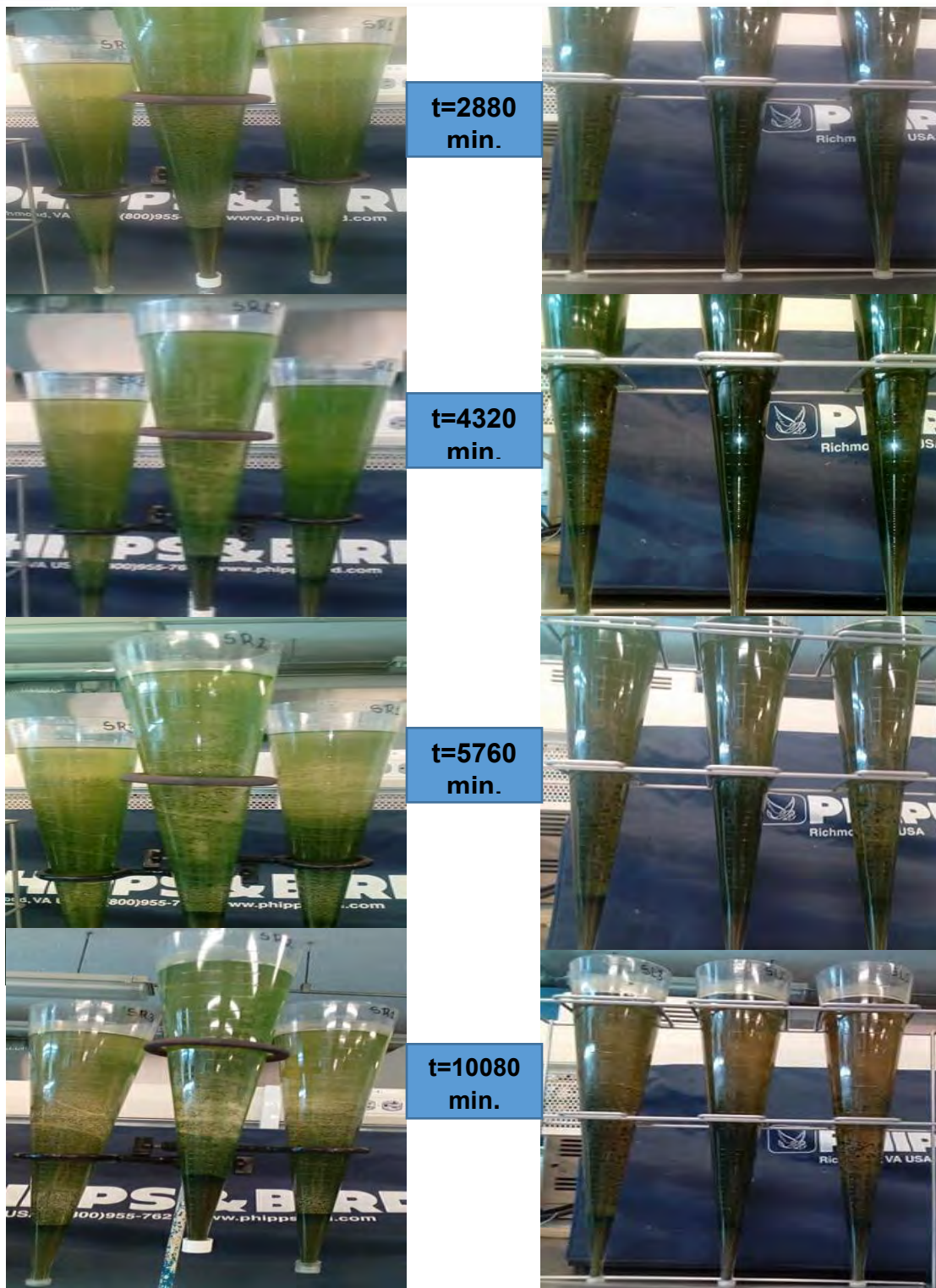


Figura 23: Proceso de sedimentación de *Scenedesmus obliquus* en agua residual y agua residual enriquecida con lixiviado durante un periodo de 7 días

Cultivo Mixto en agua residual



t=0 min.



t=60
min.

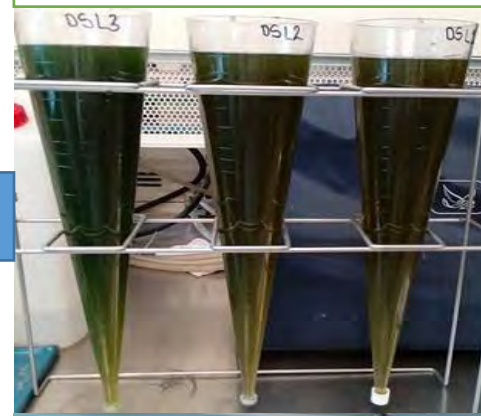


t=180
min.



t=2880
min.

Cultivo Mixto en agua residual con
lixiviado



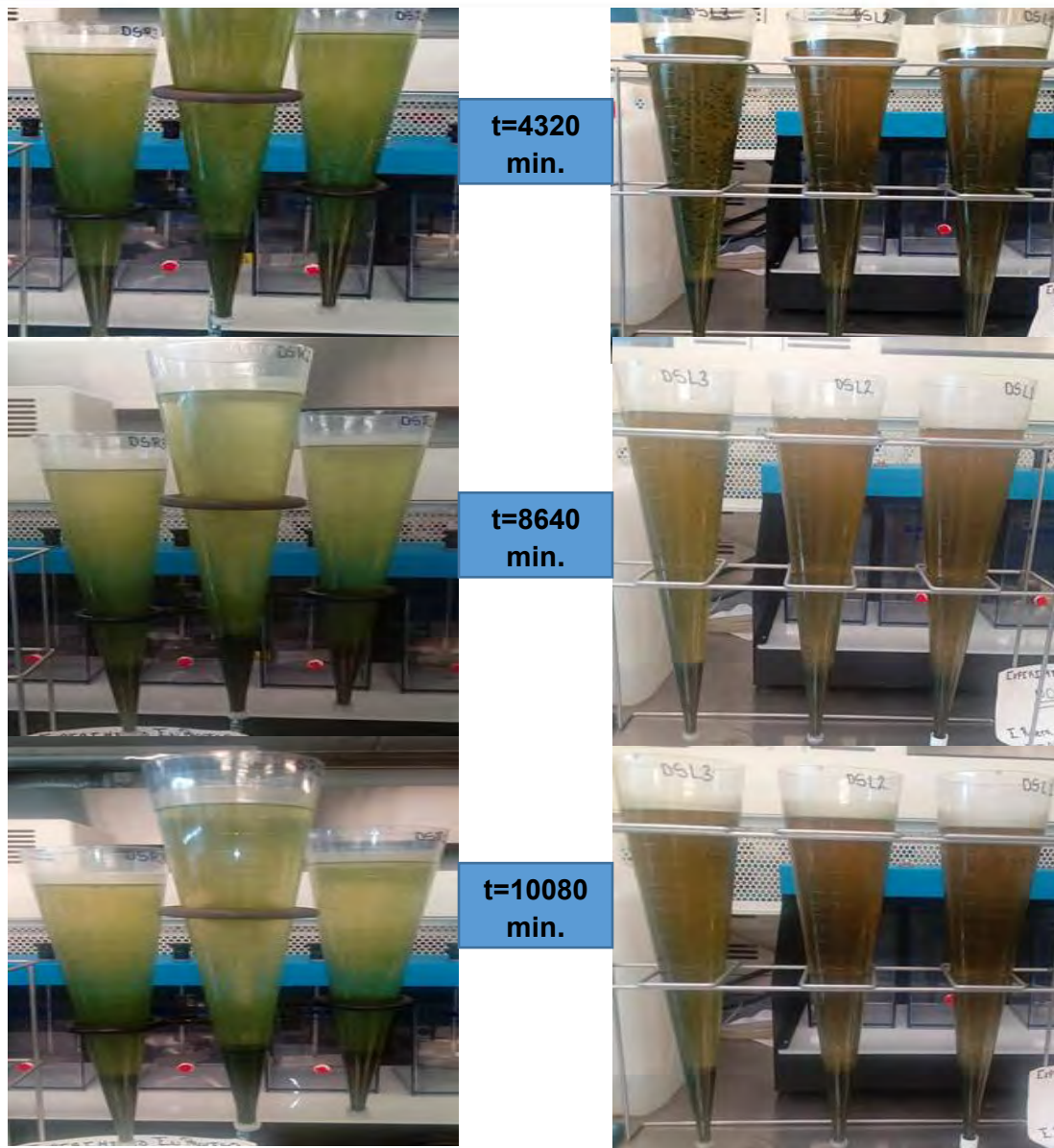


Figura 24: Proceso de sedimentación de cultivo mixto (*S. obliquus-Desmodesmus* spp.) en agua residual y agua residual enriquecida con lixiviado durante un periodo de 7 días

6.4 Evaluación de la efectividad de la sedimentación para la recuperación de biomasa

6.4.1 Curvas de sedimentación de *S. obliquus* y cultivo mixto

Las pruebas de sedimentación por gravedad fueron llevadas a cabo tanto en el cultivo de *S. obliquus* en agua residual y en agua residual enriquecida así como el cultivo mixto (*S. obliquus-Desmodesmus* spp.) midiendo la turbidez y el volumen sedimentado cada cierto tiempo.

En la figura 25 se puede observar la sedimentación del cultivo de *S. obliquus* mediante las mediciones de turbidez, la sedimentación se llevó a cabo más rápido en el cultivo de agua residual, sin embargo, y aunque en la figura 26 se puede observar que también tuvo un mayor volumen de sedimento, no indica que la sedimentación y la recuperación de biomasa es mejor en este cultivo que en el experimental ya que cuando sedimentan a veces tienden a dejar pequeños espacios en el fondo del cono imhoff lo que provoca que se vea más biomasa.

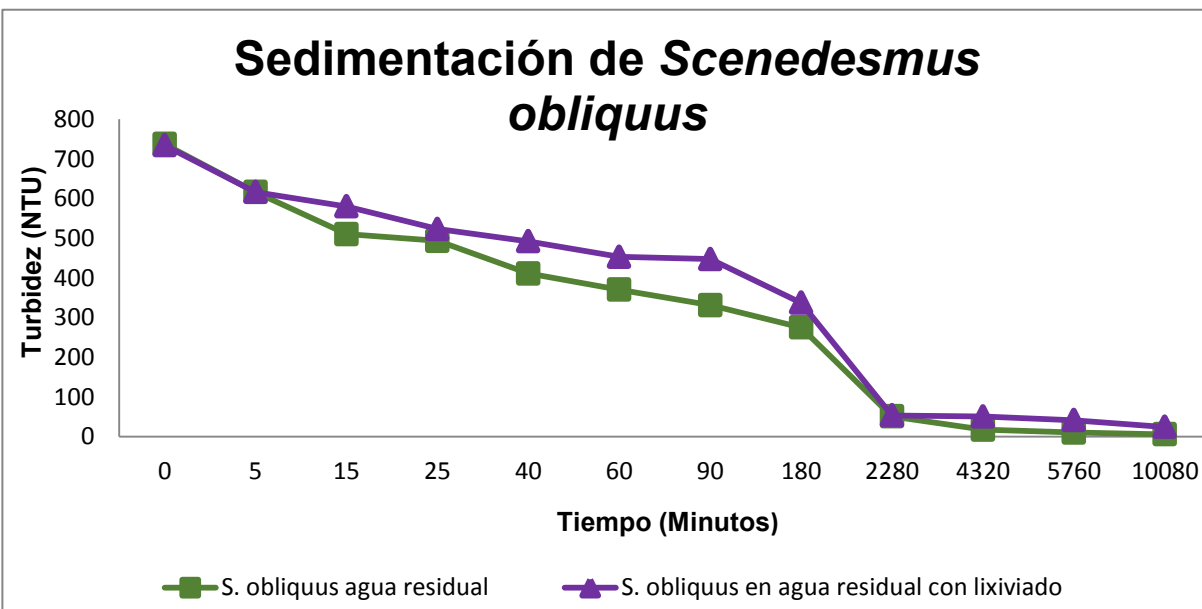


Figura 25: Sedimentación mediante mediciones de turbidez del cultivo de *S. obliquus* en agua residual y en agua residual enriquecida con lixiviado en un periodo de 7 días.

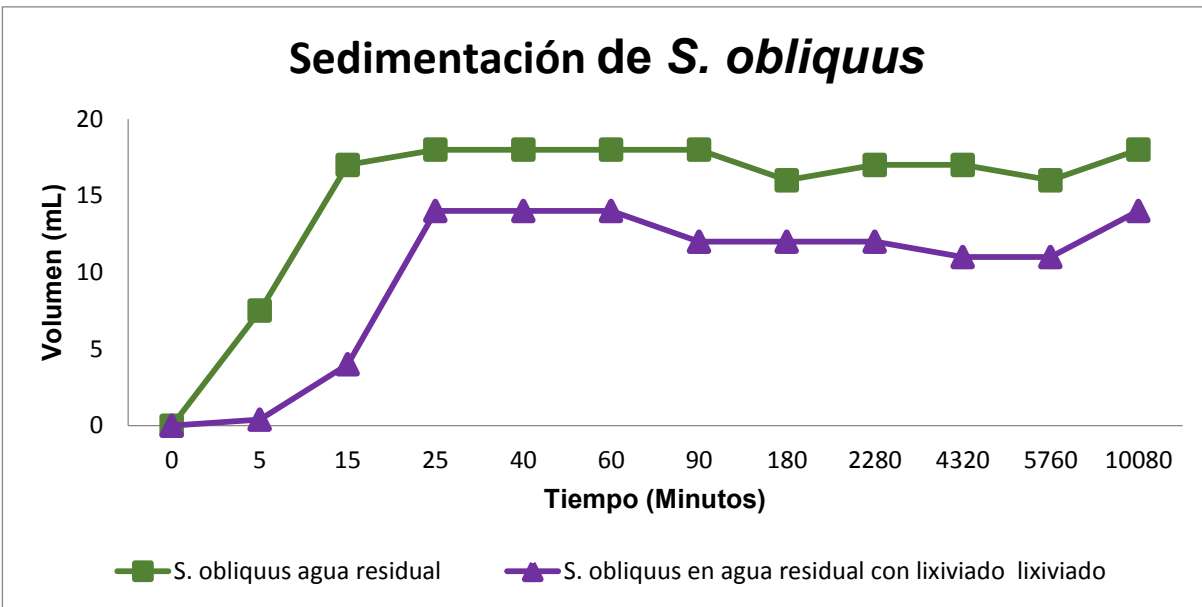


Figura 26: Sedimentación mediante mediciones de volumen sedimentado del cultivo de *S. obliquus* en agua residual y en agua residual enriquecida con lixiviado en un periodo de 7 días.

En el caso del cultivo mixto ocurre un comportamiento similar al del cultivo de *S. obliquus*, la sedimentación se llevó a cabo de manera más rápida en el cultivo control y tuvo una mayor cantidad de sedimento (figuras 27 y 28).

Sin embargo, para determinar en qué cultivo se obtuvo una mayor cantidad de biomasa una vez que se cosecho la biomasa se prosiguió a medir el sedimento recuperado en una probeta para poder saber los porcentajes de recuperación de biomasa. Para determinar si hubo diferencia significativa entre los cultivos control (agua residual) y los cultivos experimentales (agua residual enriquecida con lixiviado) se realizó un análisis de varianza y los resultados obtenidos se explican en el siguiente punto.

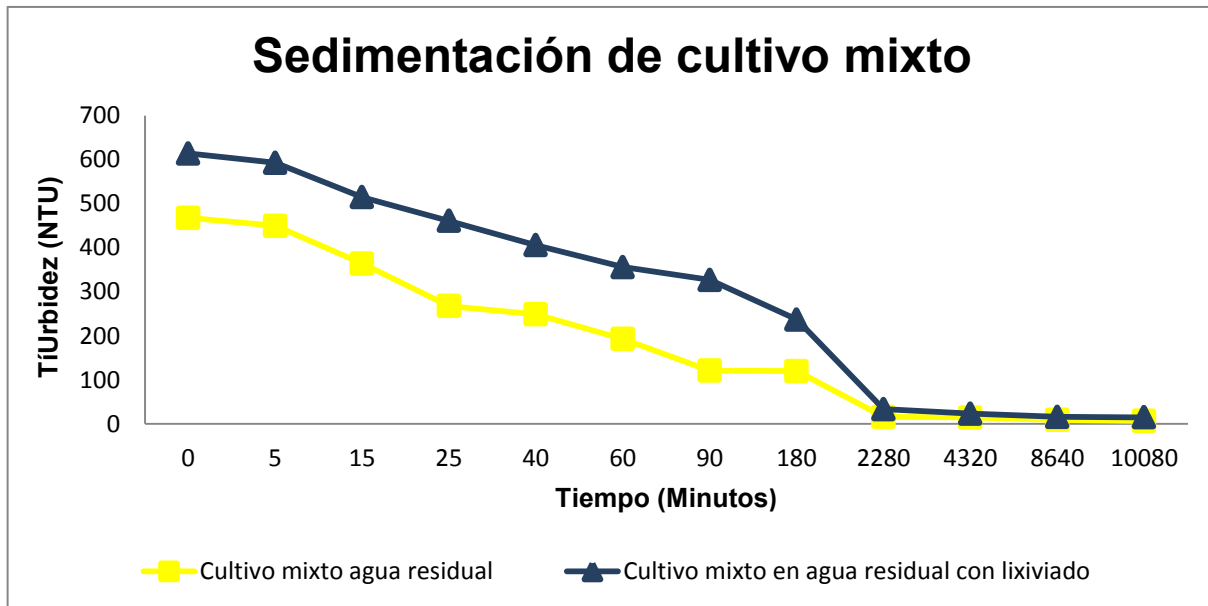


Figura 27: Sedimentación mediante mediciones de turbidez del cultivo Mixto (*S. obliquus-Desmodesmus* spp.) en agua residual y en agua residual enriquecida con lixiviado en un periodo de 7 días.

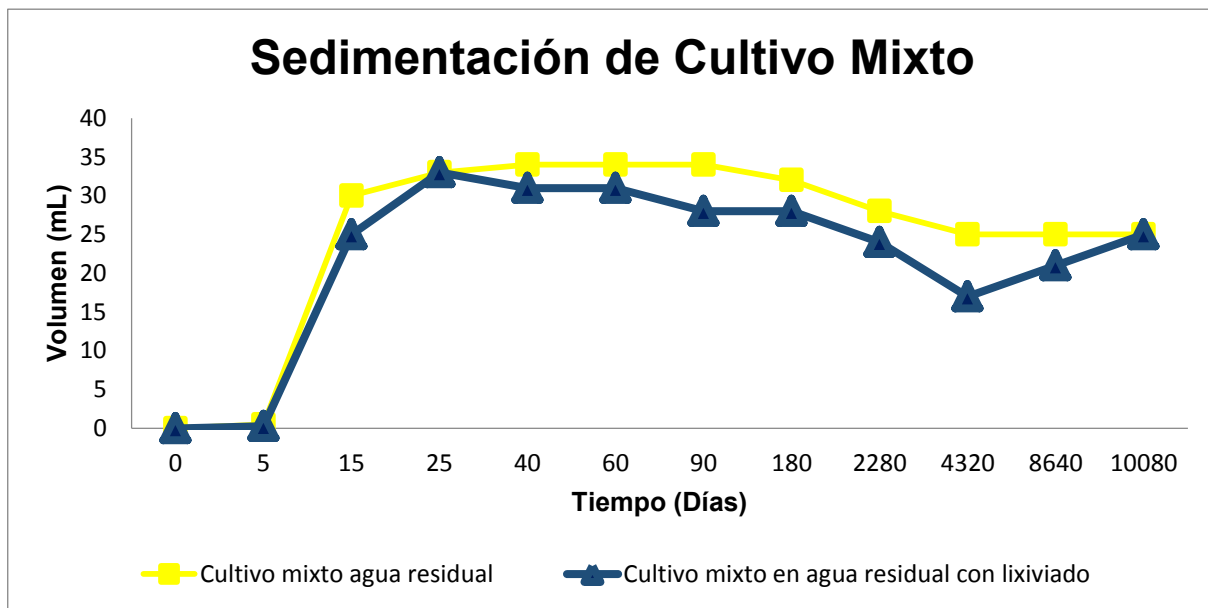


Figura 28: Sedimentación mediante mediciones de volumen sedimentado del cultivo de (*S. obliquus-Desmodesmus* spp.) en agua residual y en agua residual enriquecida con lixiviado en un periodo de 7 días

6.4.2 Porcentaje de recuperación de biomasa, carbohidratos y lípidos

En la tabla 8 se muestran los porcentajes de recuperación de biomasa de cada uno de los cultivos así como el porcentaje de carbohidratos y lípidos presentes en la biomasa recuperada.

Se puede observar que a pesar de que la sedimentación se llevó a cabo de manera más rápida y se acumuló más biomasa en los cultivos control el porcentaje de biomasa que se recuperó fue 1% más en los cultivos experimentales

Tabla 8: Porcentajes de recuperación de biomasa, carbohidratos y lípidos por litro de cultivo

		BIOMASA	CHO'S	LÍPIDOS
Cultivo	Condición	Recuperación (%)	Recuperación (%)	Recuperación (%)
Cultivo de <i>S. obliquus</i>	Agua residual	36	34	9
	Agua residual enriquecida con lixiviado	37	39	11
Cultivo Mixto	Agua residual	72	33	10
	Agua residual enriquecida con lixiviado	73	25	9

Para comprobar estadísticamente si los experimentos realizados presentaban diferencias significativas respecto a los porcentajes de recuperación de biomasa, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 5%. Se compararon los resultados del cultivo de *S. obliquus* considerando como variable la condición de cultivo, es decir, cuando se usó únicamente agua residual y utilizando agua residual enriquecida con lixiviado. El ANOVA (tabla 9) indicó que no hubo diferencia significativa cuando se utiliza medio de cultivo agua residual o agua residual enriquecida con lixiviado al 10% para la especie *S. obliquus*, por lo

tanto para éste caso el lixiviado no tuvo una aportación importante de nutrientes que permitiera incrementar la producción de biomasa.

Tabla 9. ANOVA para porcentaje de recuperación de biomasa en cultivos de *S. obliquus*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	2.56107	1	2.56107	0.11	0.7517
Intra grupos	89.1983	4	22.2996		
Total (Corr.)	91.7593	5			

*Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Porcentaje entre un nivel de Cultivo y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Un comportamiento muy similar fue observado para en caso del cultivo mixto *S. obliquus-Desmodesmus* spp., para el cual el ANOVA (tabla 10) indicó que no hubo diferencia significativa entre utilizar agua residual y agua residual enriquecida con lixiviado al 10%.

Tabla 10. ANOVA para porcentaje de recuperación de biomasa en el cultivo Mixto (*S. obliquus-Desmodesmus* spp.)

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1.41135	1	1.41135	0.67	0.4585
Intra grupos	8.40613	4	2.10153		
Total (Corr.)	9.81748	5			

*Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Porcentaje entre un nivel de Cultivo y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Los resultados de ANOVA obtenidos comparando por separado cada especie, al no encontrar diferencia significativa dieron la pauta para llevar a cabo un ANOVA utilizando como variables de respuesta tanto las condiciones de cultivo (agua residual y agua residual enriquecida con lixiviado) como los tipos de cultivo (*S.*

obliquus y mixto *S. obliquus-Desmodesmus* spp.), éste análisis estadístico (tabla 11) indicó que sí había diferencias significativas.

Tabla 11. ANOVA para porcentaje de recuperación de biomasa

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3963.94	3	1321.31	108.30	0.0000
Intra grupos	97.6044	8	12.2006		
Total (Corr.)	4061.55	11			

*Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Porcentaje entre un nivel de Cultivo y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Al encontrar diferencias significativas se hizo la prueba de Tukey a las medias de los tratamientos. Se obtuvo que los cultivos mixtos fueron significativamente diferentes, confirmándose que en estos se recuperó una mayor cantidad de biomasa. Para el caso de los carbohidratos y lípidos también se realizaron análisis de varianza por separado y en conjunto, sin embargo, en ninguno de los casos se encontraron diferencias estadísticamente significativas ni entre las condiciones ni entre los cultivos (ver anexo).

Con respecto a los resultados obtenidos de la cosecha de biomasa, el porcentaje de recuperación no fue el esperado, ya que en el presente trabajo en el cultivo de *S. obliquus* en agua residual solo se obtuvo un 36% y 37% para el medio que contenía lixiviado y en el cultivo mixto se obtuvo 72% y 73% respectivamente, en un lapso de 10080 minutos, es decir, 7 días. Lo reportado en la bibliografía por Andrade (2008) quien efectuó pruebas para evaluar la capacidad de sedimentación para un cultivo unialgal de *Scenedesmus* sp. y un cultivo mixto de las microalgas *Scenedesmus* sp., *Mycrocystis* sp. y *Chlorella* sp., ambas cultivadas en agua residual, realizando mediciones periódicas de turbidez, indica que en el cultivo mixto se logró recuperar el 99.83% de la biomasa algal en un tiempo de 1260 min, es decir, en 21 horas y el cultivo de *Scenedesmus* sp. se obtuvo un porcentaje de recuperación de 98.95% luego de 7200 min, es decir 5

días; en tanto que, Valladares (2014), calculó la velocidad de sedimentación de la microalga *Chlorella* sp. en un medio Guillard o F/2, midiendo la altura de sedimentación en una probeta obteniendo como resultados una velocidad de sedimentación de 2.12×10^{-2} m/h y una eficiencia de sedimentación por gravedad correspondiente al 96.6%. Por otro lado, en el 2016 Cerón *et. al.*, realizaron un estudio en el que compararon tres métodos de cosecha (utilizando NaOH al 5N como floculante), para cultivos estáticos de *Chlamydomonas* sp., alcanzando con el método de sedimentación un porcentaje de recuperación 96% en un periodo de 8 días.

Se esperaba que los porcentajes de biomasa recuperada fueran más altos principalmente en los cultivos que contenían lixiviado, debido a la elevada cantidad de CaCO_3 que posee y que puede ser utilizado como floculante, sin embargo, como se puede ver en los porcentajes de recuperación no se presenta diferencia entre la biomasa recuperada en los cultivos con agua residual (controles) a la biomasa recuperada de los cultivos enriquecidos con lixiviado (experimentales), sin embargo aunque el medio de cultivo influye en el proceso de sedimentación también se puede decir que la especie de microalga afecta directamente la sedimentación, pues como se ve en los resultados obtenidos la cantidad de biomasa recuperada fue mayor en el cultivo mixto por casi el doble que la recuperada de los cultivos de *S. obliquus*.

Si bien se esperaba que en los cultivos con lixiviado fuera mayor la cantidad de biomasa por la presencia de carbonato, lo que pudo haber ocurrido en los cultivos con agua residual para que igualaran a los cultivos con lixiviado es que las microalgas hayan presentado auto-floculación debido al incremento del pH. Este proceso puede ocurrir naturalmente en cultivos de microalgas expuesto a la luz solar (en días cálidos y soleados) con suministro limitado de CO_2 , ya que a través de la fotosíntesis las microalgas eliminan el CO_2 disuelto en el medio de cultivo, aumentando su valor de pH (Barros, *et. al.*, 2015).

Andrade (2008) realizó experimentos con *Scenedesmus* sp. sobre el efecto de los diferentes valores de pH y demostró que no se presenta floculación a pH entre 5.0

y 7.5; mientras que, a valores de pH alrededor de 8.5 casi el 95% de la biomasa de algas podría ser removida.

Como se puede observar en las figuras 29 y 30 el pH se va incrementando conforme pasan los días principalmente en los cultivos de agua residual llegando a un pH de 10, lo que pudo haber provocado la auto-floculación en dichos cultivos, esta podría ser la razón por la cual se tuvo la misma de recuperación de biomasa tanto en los cultivos control como en los experimentales, mientras que el pH de los cultivos enriquecidos con lixiviado alcanza un máximo de 9 no quedando muy alejado del estándar de pH para un cultivo de microalgas que es de 7.5 a 8.5.

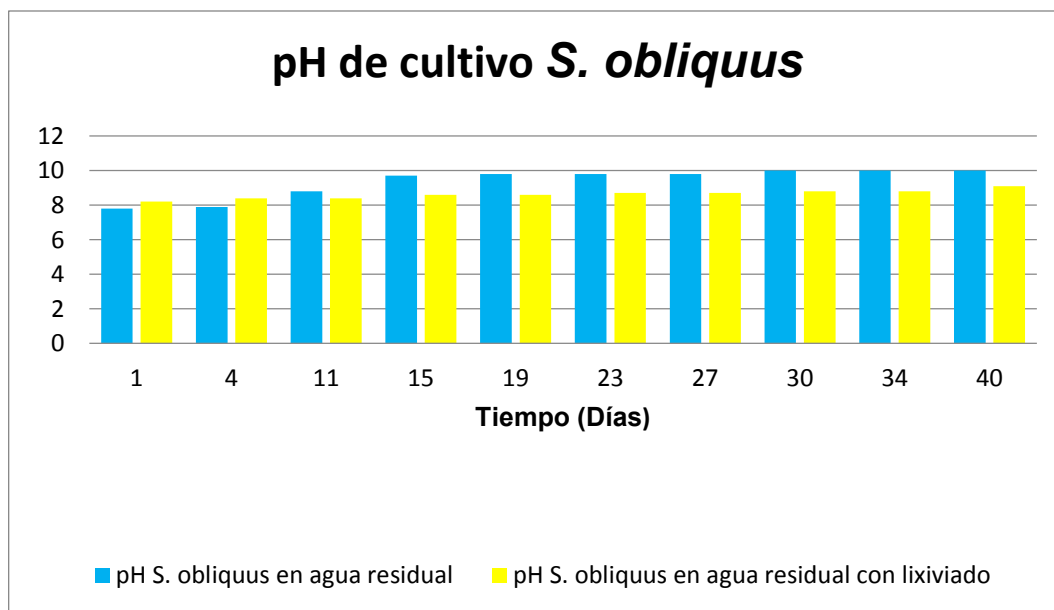


Figura 29: pH de *S. obliquus* en agua residual y en agua residual enriquecida con lixiviado

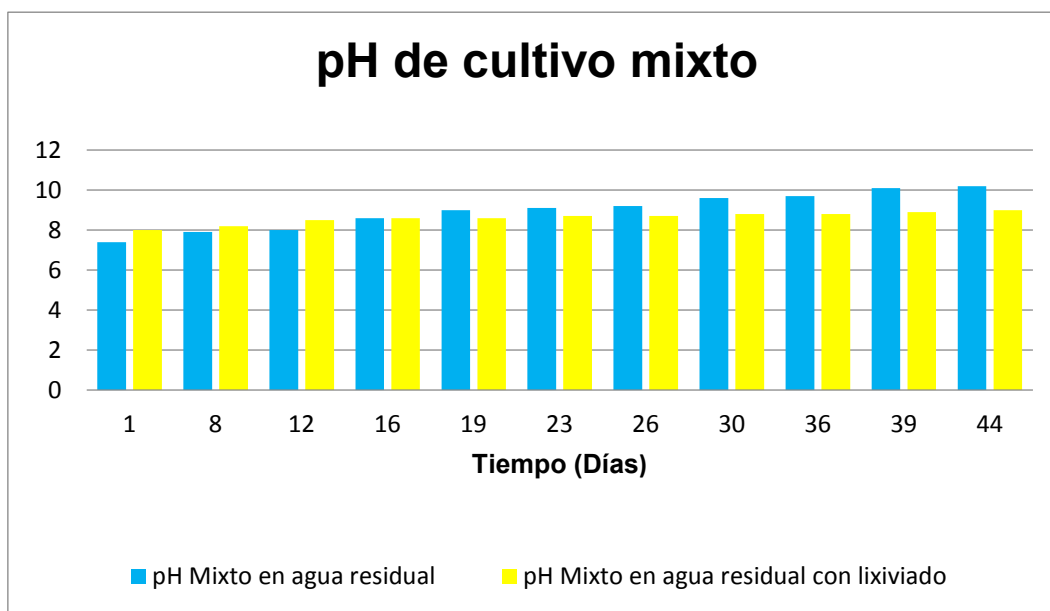


Figura 30: pH del cultivo Mixto (*S. obliquus-Desmodesmus* spp.) en agua residual y en agua residual enriquecida con lixiviado

El proceso de sedimentación en el presente trabajo resultó más efectivo al utilizar un cultivo mixto *S. obliquus-Desmodesmus* spp. ya que fue posible recuperar cantidades de biomasa mayores al 70%. Sin embargo, los porcentajes de recuperación de biomasa cuando se usaron cultivos con predominancia de la microalga *S. obliquus* fueron mucho menores (entre 36 y 37%), por lo que resulta relevante ahondar en investigaciones respecto a las variables de influencia, además de la especie de microalga, que afectan la recuperación de biomasa en los cultivos de *S. obliquus*.

6.4.3 Ventajas y desventajas del uso de la sedimentación como método de cosecha

Basándose en el cuadro de ventajas y desventajas de Orta, *et. al.*, 2017, se pueden establecer las ventajas y desventajas que tuvo el uso de la sedimentación como método de cosecha en este trabajo.

Tabla 12: Ventajas y desventajas del uso de la sedimentación como método de cosecha

SEDIMENTACIÓN	
Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Es un método que tiene un costo energético prácticamente nulo ➤ No fue necesario agregar alguna sustancia química para lograr la sedimentación ➤ La biomasa no sufrió ningún daño pese al largo tiempo de exposición ➤ El cultivo no se contaminó a pesar de que se encontraba expuesto al medio 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ El método es lento ➤ Dependiendo de la microalga utilizada es el porcentaje de recuperación de biomasa. ➤ El porcentaje de recuperación no fue el esperado a pesar del tiempo en sedimentación (7 días)

Pese a que en la literatura se reporta (Rawat, *et. al.*, 2011) que la biomasa puede sufrir deterioro por las variaciones de temperatura o contaminación debido al tiempo de exposición al medio, en el presente trabajo se pudo comprobar mediante la observación microscópica de los cultivos que ninguno de éstos efectos sucedió, si bien se encontró la presencia de *Nannochloropsis*, ésta se dio durante el periodo de duración de la curva de crecimiento y no durante el tiempo en el que los cultivos estuvieron en sedimentación.

7. CONCLUSIONES

1. Se determinó que utilizar lixiviado al 10% pese a que cumple con los requerimientos de nitrógeno amoniacal de 154 mg/L, afecta la producción de biomasa, esto se atribuye a la coloración marrón que tomaron los cultivos y que impidió el paso de luz lo que afectó el proceso de fotosíntesis, sin embargo, se logró tratar el lixiviado diluido en agua residual obteniendo porcentajes de remoción de nitrógeno amoniacal hasta del 100%.
2. La sedimentación depende de directamente de la especie de microalga utilizada, ya que en función de su tamaño se verá afectada la velocidad de sedimentación.
3. El método de sedimentación para la cosecha de microalgas no influye en el porcentaje de recuperación de carbohidratos y lípidos ya que se obtienen porcentajes similares antes y después de la cosecha utilizando cultivos de la especie *S. obliquus* y cultivos mixtos de *S. obliquus* con el género *Desmodesmus* spp.
4. El lixiviado no influyó en el método de cosecha por sedimentación, ya que el porcentaje de biomasa cosechada es muy similar tanto en agua residual como en agua residual enriquecida con lixiviado.
5. La sedimentación es un buen método de cosecha para la recuperación de biomasa microalgal ya que se obtuvieron porcentajes de recuperación hasta del 73% en cultivos mixtos de *S. obliquus*-*Desmodesmus* spp. sin que se alterará el estado de la biomasa.
6. La principal ventaja de la sedimentación como método de cosecha es el costo energético es prácticamente nulo, ya que en los 7 días que estuvieron en sedimentación los cultivos no existió gasto energético.
7. La principal desventaja del uso de la sedimentación es el tiempo, ya que en comparación con otros métodos en los que la biomasa se recupera en horas o incluso minutos, la sedimentación puede llevarse días como el caso del presente estudio.

8. LITERATURA CITADA

1. Aboal, M. (2012). *Ficha de Taxón-Desmodesmus*. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Recuperado de:
http://eportal.mapama.gob.es/id_tax/ficha/buscador/2/585
2. American Public Health Association. (1992). Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. APHA.
3. Andrade, C. (2008). Tratamiento terciario de aguas residuales mediante el uso de la microalga *Scenedesmus sp.* en cultivo discontinuo. (Tesis de Maestría). Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.
4. Ayala, S. (2015). Microalgas: aplicaciones e innovaciones en el tratamiento de aguas contaminadas y la producción de biocombustibles. Universidad de los Andes, Colombia. DOI: <https://doi.org/10.13140/rg.2.1.2672.1441>
5. Band, C. (1999). Efecto de la composición bioquímica de microalgas sobre el valor nutritivo de dos cepas de Artemia (Tesis Doctoral) Instituto Politécnico Nacional, México.
6. Barros, A., Gonçalves, A., Simões, M., y Pires, J. (2015). Harvesting techniques applied to microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, 1489-1500. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.09.037>
7. Bermeo, I. (2011). Estudio del cosechado de cultivos de microalgas en agua residual mediante técnicas de centrifugado. Universidad Particular Técnica de Loja, España.
8. Bhalla, B., Saini, M. y Jha, M. (2012). Characterization of Leachate from Municipal Solid Waste (MSW) Landfilling Sites of Ludhiana, India: A Comparative Study. *International Journal of Engineering Research and Applications*. 2(6), 732-745.
9. Borowitzka, M., Beardall, J. y Raven, J. (2016). The Physiology of Microalgae. Reino Unido. Springer. pp. 681.

10. Cerón, V., Madera, C. y Peña, M. (2015). Uso de lagunas algales de alta tasa para tratamiento de aguas residuales. *Ingeniería y Desarrollo*, 33(1). 98-125.
11. Chen, C., Zhao, X., Yen, H., Ho, S., Cheng, C., Lee, D., Bai, F. y Chang, J. (2013). Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal*, 78, 1-10.
12. Cheung, K., Chu, L. y Wong, M. (1993). Toxic effect of landfill leachate on microalgae. *Water, Air, and Soil Pollution*, 69(3-4), 337-349.
13. Christenson, L., y Sims, R. (2011). Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology advances*, 29(6), 686-702. Recuperado de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073497501100070X>
14. Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P. y Smith F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*. 28(3). 350-356. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
15. Espinosa de Aquino, W., Goddard, M., Gutiérrez, C., y Bonfil, C. (2009). Los biocombustibles. *¿Cómo ves?*, (123). 10-14. Recuperado de: <http://www.comoves.unam.mx/assets/revista/123/los-biocombustibles.pdf>
16. Fernández, L., Montiel, J., Millán, A., y Badillo, J. (2012). Producción de biocombustibles a partir de microalgas. *Ra Ximhai*, 8(3). 101-115. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/pdf/461/46125177011.pdf>
17. García, F., González, J., Fernández, J. y Ación, F. (2012). Valorización de biomasa de microalgas: Aprovechamiento de proteínas, carbohidratos y lípidos. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal* 3(2), 147-161.
18. García, J., Pavía, M., García, J., Chirivella, J. y Serrano, A. (2017). Principios de Biotecnología y Bioingeniería en el cultivo de microalgas: importancia, problemas tecnológicos, tipos y sistemas de cultivos, crecimiento, factores limitantes, selección, aislamiento, escalado y

- caracterización bioquímica. *Nereis: revista iberoamericana interdisciplinar de métodos, modelización y simulación*, (9), 115-130.
19. Garibay, A., Vázquez, R., Sánchez, M., Serrano, L. y Martínez, A. (2009). Biodiesel a partir de microalgas. *BioTecnología*. 13 (3). 38-61. Recuperado de: http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2009_3/Biodiesel.pdf
 20. González, L. (2010). Influencia de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en las interacciones competitivas entre *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
 21. Gouveia, L. (2011). Microalgae as a Feedstock for Biofuels. (pp. 1-69). *Springer*, 1-69. DOI: 10.1007/978-3-642-17997-6_1.
 22. Gupta, S., Malik, A. y Bux, F. (2017). Algal Biofuels: Recent Advances and Future Prospects. Springer International Publishing. pp. 466.
 23. Hernández, A. (2017). Efecto de las condiciones de cultivo en la composición bioquímica y producción de biomasa de un consorcio de microalgas cultivadas en agua residual y lixiviado. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
 24. Hernández, A. y Labbé, I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49(2), 157-173. DOI 10.4067/S0718-19572014000200001
 25. Huichapa, A. y Bernal, A. (2015). Combinación de un proceso fisicoquímico y biológico para el tratamiento de lixiviados provenientes de un sitio de disposición final de RSU. *JÓVENES EN LA CIENCIA*, 1(2), 1414-1418.
 26. Japar, A., Mutmainnah A., Sobri, M. y Mohd, N. (2017). Application of Different Techniques to Harvest Microalgae. *Transactions on Science and Technology*, 4(2). 98-108. Recuperado de: <https://www.transectscience.org/pdfs/vol4/no2/4x2x98x108.pdf>
 27. Lin, L., Chan, G., Jiang, B. y Lan, C. (2007). Use of ammoniacal nitrogen tolerant microalgae in landfill leachate treatment. *Waste management*, 27(10), 1376-1382.

28. López, X., Taramuel, A., Arboleda C., Segura, F. y Restrepo L. (2017). Comparación de métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales. *Revista cubana de Química*. 29(2), 180-198.
29. Lüring, M. (2003). Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. *International Journal of Limnology: Annales de Limnologie*, 39(2), 85-101. DOI: <http://dx.doi.org/10.1051/limn/2003014>
30. Maciel, C. (2009). Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio exterior. México: Economía Informa, UNAM, 63-89.
31. MALGAS. (2014). Guía; Oportunidades de negocio alrededor de las microalgas. AST Ingeniería S.L. España. 1-88.
32. Mata, T, Martins, A. y Caetano, N. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(1), 217-232.
33. Milledge, J. y Heaven, S. (2013). A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production. *Reviews in Environmental Science and BioTechnology*, 12(2), 165-178. DOI 10.1007/s11157-012-9301-z
34. Mishra, S., Suh, W., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M. y Yang, J. (2014). Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource Technology*. 155. 330-333. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.12.077
35. Mustafa, E., Phang, S. y Chu, W. (2012). Use of an algal consortium of five algae in the treatment of landfill leachate using the high-rate algal pond system. *Journal of applied phycology*, 24(4), 953-963. DOI 10.1007/s10811-011-9716-x
36. Norma Oficial Mexicana NMX-AA-004-SCFI-2013, Análisis de agua-medición de sólidos sedimentables en aguas naturales, residuales y residuales tratadas-método de prueba. DOF: 13/11/2013
37. Norma Oficial Mexicana NOM-083-SEMARNAT-2003, Especificaciones de protección ambiental para la selección del sitio, diseño, construcción,

- operación, monitoreo, clausura y obras complementarias de un sitio de disposición final de residuos sólidos urbanos y de manejo especial. DOF: 20/10/2004.
38. Olivares, R. (2010). Producción de aceites para usos industriales a partir de la microalga *Scenedesmus obliquus*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de El Salvador, El Salvador.
39. Orta, M., Monje, I. y Yáñez, I. (2012). Saline landfill leachate disposal in facultative lagoons for wastewater treatment. *Environmental Technology*, 33(2), 247-255.
40. Orta, M., Monje, I., Velasquez, S., Rodriguez, V., y Yáñez I. (2017). Ozone for Microalgae Biomass Harvesting from Wastewater. *Ozone: Science & Engineering*, 39(4), 264-272. DOI:10.1080/01919512.2017.1322488
41. 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 *Scenedesmus sp.* *Bioresource technology*, 101(22), 8649-8657
42. Peralta, Y., Pardo, Y., Canchila, H. y Kafarov, V. (2012). Implementación de la metodología de síntesis y análisis de procesos a la etapa de cosecha de microalgas para la producción de biodiesel. *Prospectiva*, 10(1). 132-144. Recuperado de: <http://ojs.uac.edu.co/index.php/prospectiva/article/viewFile/405/37>
43. Pittman, J., Dean, A., y Osundeko, O. (2011). The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource technology*, 102. 17-25. Recuperado de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410010163>
44. Pragma, N., Pandey, K., y Sahoo, P. K. (2013). A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 24, 159-171.
45. Rawat, I., Kumar, R., Mutanda, T. y Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, 88(10), 3411-3424.

46. Richards, R. y Mullins, B. (2013). Using microalgae for combined lipid production and heavy metal removal from leachate. *Ecological modelling*, 249, 59-67.
47. Richmond, A. (2004). Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Reino Unido. Blackwell Science.
48. Salinas, E. y Gasca, V. (2009). Los biocombustibles. *El Cotidiano*. 157(10). 75-82. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/pdf/325/32512739009.pdf>
49. Samori, G., Samori, C., Guerrini, F. y Pistocchi, R. (2013). Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a batch culture system in view of urban wastewater treatment: Part I. *Water Research*. 47(2), 791-801.
50. Santos, A., González, Y. y Martín, C. (2014). Uso y aplicaciones potenciales de las algas. *Anales de mecánica y electricidad*. 91(1). 20-Recuperado de: http://www.revista-anales.es/web/n_24/pdf/seccion_13.pdf.
51. Sanz, E. (2016). Evaluación del potencial de producción de biocombustibles a partir de microalgas. (Tesis de Licenciatura). Universidad de Valladolid, España.
52. SEMARNAT. (2014). El medio ambiente en México. (En línea). Disponible en:
http://apps1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_resumen14/06_agua/6_2_3.html
53. SENER. (2016). Evaluación rápida del uso de energía en las ciudades. (En línea). Disponible en: <https://www.gob.mx/sener/documentos/evaluacion-rapida-del-uso-de-energia-en-las-ciudades-mediante-la-implementacion-de-trace-en-ciudades-de-la-republica-mexicana>
54. SENER. (2017). Balance Nacional de Energía 2016. (En línea). Disponible en:
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/284340/Balance_Nacional_de_Energ_a_2016.pdf

55. Serna, F., Barrera, L. y Montiel. (2011). Impacto Social y Económico en el Uso de Biocombustibles. *Journal of Technology .Management & Innovation*. 6(1), 100-114.
56. Sforza, E., Mohammed-Hassan K., Sharif, A. y Bertucco A. (2015). Exploitation of urban landfill leachate as nutrient source for microalgal biomass production. *Chemical Engineering Transactions*, 43.
57. Su, Y., Mennerich, A. y Urban, B. (2012). Comparison of nutrient removal capacity and biomass settleability of four high-potential microalgal species. *Bioresource Technology*. 124. 157-162. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.037>
58. Tapia, L., Acevedo, J, Araméndiz, H. y Ararat J. (2015). La sostenibilidad en el diseño de cadenas de suministro de biocombustibles. *Revista Ingenierías Universidad de Medellín*, 14(26). 57-72.
59. Torres, P, Ho, L., Ojeda, C., Martínez, J., y Castaño, Y. (2014). Influencia de la edad de lixiviados sobre su composición físico-química y su potencial de toxicidad. *Revista UDCA Actualidad y Divulgación Científica*, 17(1). 245-255.
60. Valeriano, M., Monje, I., Ledesma, M., Fadrique, J. y Velásquez, S. (2016). Harvesting microalgae using ozoflotation releases surfactant proteins, facilitates biomass recovery and lipid extraction. *Biomass and Bioenergy*, 95, 109-115. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.09.020>
61. Valladares, F. (2014). Diseño de una planta de extracción de aceite a partir de microalgas (*Chlorella sp.*). (Tesis de licenciatura). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
62. Vera, P., Mendoza, A. y Villalobos, J. (2013). Manejo y disposición de los residuos sólidos no peligrosos en el municipio de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. *Estudios ambientales y riesgos naturales: Aportaciones del sureste de México III*. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, México.
63. Zhang, C., Zhang, Y., Zhuang, B., & Zhou, X. (2014). Strategic enhancement of algal biomass, nutrient uptake and lipid through statistical optimization of nutrient supplementation in coupling *Scenedesmus obliquus*-

like microalgae cultivation and municipal wastewater treatment. *Bioresource technology*, 171, 71-79.

64. Zhao, X., Zhou, Y., Huang, S., Duanyang Q., Schideman, L., Chai, X. t Zhao, Y. (2014). Characterization of microalgae-bacteria consortium cultured in landfill leachate for carbon fixation and lipid production. *Bioresource technology*, 156, 322-328.

9. ANEXO

Con los resultados obtenidos del porcentaje de recuperación de biomasa, carbohidratos y lípidos y con la ayuda del programa STATGRAPHICS Centurion, se realizó el análisis de varianza (ANOVA), la prueba de Tukey y la prueba de Shapiro-Wilk (normalidad), para cada uno de los casos, los resultados se muestran a continuación.

9.1 Pruebas de porcentaje de recuperación de biomasa

En este apartado se muestra la tabla de ANOVA del porcentaje de recuperación de biomasa para los cuatro cultivos con las dos diferentes condiciones.

Tabla ANOVA para porcentaje de recuperación de biomasa.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	3963.94	3	1321.31	108.30	0.0000
Intra grupos	97.6044	8	12.2006		
Total (Corr.)	4061.55	11			

*Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Porcentaje entre un nivel de Cultivo y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Al encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los cultivos se procedió a realizar la prueba de Tukey para determinar los cultivos con diferencias.

Tabla de Prueba de Tukey para porcentaje de recuperación de Biomasa

<i>Contraste</i>	<i>Sig</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
Mixto AR - Mixto LIX	.	-0.97	9.12974
Mixto AR - <i>S. obliquus</i> LIX	*	35.1933	9.12974
Mixto AR - <i>S. obliquus</i> AR	*	36.5	9.12974
Mixto LIX - <i>S. obliquus</i> LIX	*	36.1633	9.12974
Mixto LIX - <i>S. obliquus</i> AR	*	37.47	9.12974
<i>S. obliquus</i> LIX - <i>S. obliquus</i> AR		1.30667	9.12974

* Indica una diferencia significativa.

Y finalmente se realizó la prueba de Shapiro-Wilk para observar la distribución de los datos.

Tabla de Prueba de Shapiro-Wilk para porcentaje la recuperación de Biomasa

<i>Prueba</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0.765787	0.00300011

*Debido a que el valor-P más pequeño de las pruebas realizadas es menor a 0.05, se puede rechazar la idea de que Porcentaje proviene de una distribución normal con 95% de confianza.

9.2 Pruebas de porcentaje de carbohidratos

Tabla ANOVA para porcentaje de carbohidratos en el cultivo de *S. obliquus*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	47.4891	1	47.4891	0.71	0.4476
Intra grupos	268.46	4	67.115		
Total (Corr.)	315.949	5			

*Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Porcentaje entre un nivel de Cultivo y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla ANOVA para porcentaje de carbohidratos en el cultivo mixto (*S. obliquus-Desmodemus spp.*)

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	74.6948	1	74.6948	5.45	0.0799
Intra grupos	54.8671	4	13.7168		
Total (Corr.)	129.562	5			

*Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Porcentaje entre un nivel de Cultivo y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Como en el caso de la biomasa al no encontrarse diferencias significativas al analizar los cultivos por separado, se llevó a cabo una ANOVA, en la cual fueron

considerados los cuatro cultivos en ambas condiciones, la tabla se muestra a continuación y siguió sin encontrarse diferencia estadísticamente significativa.

Tabla ANOVA para porcentaje de carbohidratos

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	238.685	3	79.5616	1.97	0.1974
Intra grupos	323.327	8	40.4159		
Total (Corr.)	562.012	11			

*Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Porcentaje entre un nivel de Cultivo y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Al no encontrarse diferencias significativas no se realizó prueba de Tukey pero si la prueba de Shapiro-Wilk.

Pruebas de Shapiro-Wilk para porcentaje de carbohidratos

<i>Prueba</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0.935875	0.417136

*Debido a que el valor-P más pequeño de las pruebas realizadas es mayor ó igual a 0.05, no se puede rechazar la idea de que Porcentaje proviene de una distribución normal con 95% de confianza.

9.3 Prueba de porcentaje de lípidos

Al igual que en los carbohidratos se realizó ANOVA por separado para cada cultivo, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, por lo que se hizo una prueba ANOVA para los cuatro cultivos, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas.

Tabla ANOVA para porcentaje de lípidos en cultivo *S. obliquus*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	5.51042	1	5.51042	1.26	0.3237
Intra grupos	17.4305	4	4.35762		
Total (Corr.)	22.9409	5			

*Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Porcentaje entre un nivel de Cultivo y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla ANOVA para Porcentaje de lípidos en cultivo Mixto (*S. obliquus-Desmodemus spp.*)

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	3.1104	1	3.1104	1.67	0.2664
Intra grupos	7.4698	4	1.86745		
Total (Corr.)	10.5802	5			

*Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Porcentaje entre un nivel de Cultivo y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla ANOVA para porcentaje de lípidos

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	9.63583	3	3.21194	1.03	0.4288
Intra grupos	24.9003	8	3.11253		
Total (Corr.)	34.5361	11			

*Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Porcentaje entre un nivel de Cultivo y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Pruebas de Shapiro-Wilk para porcentaje de lípidos

<i>Prueba</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0.851023	0.0351901

*Debido a que el valor-P más pequeño de las pruebas realizadas es menor a 0.05, se puede rechazar la idea de que Porcentaje proviene de una distribución normal con 95% de confianza.