



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

**DESARROLLO DE UN PROCESO HETEROTRÓFICO MICROALGAL PARA**  
**PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL**

TESIS

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

PRESENTA:  
I.Q. DANIELA MONTAÑO SAN AGUSTIN

TUTOR PRINCIPAL:  
DRA. MARÍA TERESA ORTA LEDESMA, INSTITUTO DE INGENIERÍA-UNAM

COMITÉ TUTOR:  
DR. IGNACIO MONJE RAMÍREZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA-UNAM  
DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO, FACULTAD DE QUÍMICA-UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., AGOSTO DE 2020



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.

## **JURADO ASIGNADO**

**Presidente:** Dr. Armando González Sánchez

**Secretario:** Dr. Víctor Manuel Luna Pabello

**Vocal 1:** Dr. Ignacio Monje Ramírez

**Vocal 2:** M.C. Gloria Moreno Rodríguez

**Vocal 3:** Dra. María Teresa Orta Ledesma

### **Lugar donde se realizó la tesis:**

Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería (LIA), Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.

### **TUTOR DE TESIS**

Dra. María Teresa Orta Ledesma

---

**El trabajo experimental fue realizado en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la UNAM que cuenta con certificado de conformidad otorgado por el organismo acreditado Certificación Mexicana, S.C., por haber implementado y mantener un Sistema de Gestión de la Calidad de conformidad con los requisitos de la norma internacional ISO 9001:2015**

**No. de Certificado CMX C SGC 155 2017, válido en el período del 09 de noviembre de 2017 al 09 de noviembre de 2020**



## Índice general

<b>Índice general</b> .....	<b>1</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>3</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>4</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>5</b>
<b>Índice de tablas</b> .....	<b>6</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>7</b>
<b>2. Antecedentes</b> .....	<b>9</b>
<b>3. Marco teórico</b> .....	<b>12</b>
<b>3.1</b> Microalgas, generalidades .....	<b>12</b>
<b>3.2</b> Autotrofia y heterotrofia .....	<b>14</b>
<b>3.3</b> Cultivo heterotrófico de microalgas .....	<b>15</b>
<b>3.4</b> Ventajas del cultivo heterotrófico de microalgas .....	<b>16</b>
<b>3.5</b> Limitaciones del cultivo heterotrófico de microalgas .....	<b>16</b>
<b>3.6</b> Factores que afectan el crecimiento heterotrófico .....	<b>17</b>
<b>3.7</b> Metabolismo en un cultivo heterotrófico .....	<b>20</b>
<b>3.8</b> Cultivo heterotrófico de microalgas en agua residual .....	<b>23</b>
<b>3.9</b> Uso del agua residual porcina en cultivos de microalgas .....	<b>26</b>
<b>4. Justificación</b> .....	<b>29</b>
<b>5. Objetivos</b> .....	<b>30</b>
<b>6. Hipótesis</b> .....	<b>31</b>
<b>7. Metodología</b> .....	<b>32</b>
<b>7.1</b> Agua residual y agua residual porcina.....	<b>33</b>
<b>7.2</b> Determinación de parámetros fisicoquímicos.....	<b>34</b>
<b>7.3</b> Cultivo fototrófico de microalgas en agua residual .....	<b>35</b>
<b>7.4</b> Diseño de experimentos: definición de la concentración de carbono residual a utilizar en el proceso heterotrófico microalgal .....	<b>36</b>
<b>7.5</b> Desarrollo del proceso heterotrófico microalgal .....	<b>39</b>

<b>8. Resultados y análisis</b> .....	<b>41</b>
8.1 Caracterización fisicoquímica del agua residual y del agua residual porcina.....	41
8.2 Cultivo de microalgas en agua residual y porcina para definir la concentración de carbono residual a usar en el proceso heterotrófico microalgal.....	44
8.2.1 Incremento de la concentración de la biomasa microalgal.....	45
8.2.2 Balance de masa de carbono .....	47
8.2.3 Remoción de nutrientes .....	54
8.3 Desarrollo del proceso heterotrófico microalgal en oscuridad....	59
8.3.1 Concentración de biomasa microalgal obtenida mediante el proceso heterotrófico .....	60
8.3.2 Balance de carbono .....	62
8.3.3 Remoción de nutrientes .....	66
<b>9. Conclusiones</b> .....	<b>71</b>
<b>10. Referencias</b> .....	<b>73</b>
<b>Agradecimientos</b> .....	<b>84</b>

## Resumen

Las microalgas usan la fotosíntesis para obtener su alimento generando energía directamente de la radiación del sol; esta característica las designa como organismos autótrofos sin embargo algunas microalgas están integradas fisiológicamente para metabolizar de forma heterótrofa la materia orgánica presente en el medio como fuente de energía y carbono bajo condiciones limitadas de luz. Esta condición favorece el uso de diferentes fuentes de agua residual o de la mezcla de estas para ser aprovechadas y a la vez tratadas por medio del cultivo heterotrófico de microalgas debido a su alto contenido de carbono orgánico y nutrientes como el nitrógeno y fósforo. Este proyecto de tesis se centra en el desarrollo de un proceso heterotrófico microalgal para la producción de biomasa y tratamiento del agua residual; en el cual se utilizó agua residual urbana como medio de cultivo y se le adicionó un volumen determinado de agua residual porcina como fuente de carbono orgánico total (COT) para cultivar un consorcio con predominancia del género *Scenedesmus* sp. bajo condiciones no estériles. En la primera parte se evaluaron tres concentraciones diferentes de COT (21.1, 398.2 y 892.2 mg/L) proveniente del agua residual urbana y el agua residual porcina bajo condiciones de 12:12 horas de luz y oscuridad para determinar la concentración a utilizar en el proceso heterotrófico. La concentración de COT igual a 892.2 mg/L se seleccionó para el desarrollo del proceso heterotrófico debido a que proporcionó una concentración final de biomasa microalgal igual a 1.1 g/L con una remoción del 82.4% de COT y del 97% para la DQO y la DBO<sub>5</sub> a los 21 días de cultivo. Posteriormente, el desarrollo del proceso heterotrófico fue evaluado bajo condiciones de oscuridad y generó una concentración máxima de biomasa de 1.1 g/L al día 14 y de 0.94 g/L al día 21 con una remoción del 81.64% de COT, 83.73% de DQO y 67.17% para la DBO<sub>5</sub>. Así mismo se obtuvo una remoción del 23% para el nitrógeno amoniacal, del 75% de nitratos y del 11.16% de ortofosfatos. Del mismo modo, se decidió evaluar el consorcio microalgal únicamente con agua residual urbana (COT igual a 19.53 mg/L) a modo de control bajo condiciones de oscuridad, pero la concentración de la biomasa disminuyó de 0.5 g/L a 0.42 g/L y no hubo remoción de COT, además la remoción de la DQO y la DBO<sub>5</sub> fueron bajas de 3.7% y 7.2% respectivamente. Estos resultados pueden deberse a que el consorcio microalgal no puede desarrollar la heterotrofia con concentraciones bajas de carbono orgánico, lo que provoca que las microalgas permanezcan inactivas metabólicamente y comiencen a morir después de usar sus productos de reserva. De los resultados obtenidos se concluye que es factible el uso del agua residual porcina como fuente de carbono orgánico para el desarrollo de un proceso heterotrófico microalgal ya que se logró el incremento de la biomasa y la remoción de nutrientes similar a los obtenidos en cultivos heterotróficos con adición de una fuente de carbono exógena y no residual.

## Abstract

Microalgae use photosynthesis to obtain their food by generating energy directly from the sun's radiation. This characteristic designates them as autotrophic organisms. However, some microalgae are physiologically integrated to metabolize heterotrophically using organic matter as a source of energy and carbon under limited light conditions. This condition favors the use of different sources of wastewater or mixture to be used and treated at the same time by means of heterotrophic microalgae cultivation due to its high content of organic carbon and nutrients such as nitrogen and phosphorous. This project of thesis focuses on the development of a microalgal heterotrophic process for biomass production and wastewater treatment. In which urban wastewater was used as a culture medium and a certain volume of swine wastewater was added as a source of total organic carbon (TOC) to grow a consortium with a predominance of *Scenedesmus* sp. under non-sterile conditions. In the first part, three different concentrations of TOC (21.1, 398.2 and 892.2 mg / L) from urban wastewater and swine wastewater were evaluated under conditions of 12:12 hours of daylight and night exposure to determine the concentration to be used in the heterotrophic process. The TOC concentration equal to 892.2 mg / L was selected for the development of the heterotrophic process because it provided a final concentration of microalgal biomass equal to 1.1 g / L with a removal of 82.42% of TOC and 97% for COD and BOD<sub>5</sub>. Subsequently, the development of the heterotrophic process was evaluated under dark conditions and generated a maximum biomass concentration of 1.1 g / L on day 14 and 0.94 g / L on day 21 with a removal of 81.64% TOC, 83.73% COD and 67.17% for BOD<sub>5</sub>. Likewise, a removal of 23% was obtained for ammoniacal nitrogen, 75% of nitrates and 11.16% of orthophosphates. Control cultures were also performed under dark conditions but the culture medium was only urban wastewater (19.53 mg / L of TOC). The biomass concentration decreased from 0.5 g / L to 0.42 g / L and there was no removal of TOC, COD and BOD<sub>5</sub> removal were low of 3.7% and 7.2% respectively. These results can be due to the microalgae consortium unable develop heterotrophy with low concentrations of organic carbon, causing it to remain metabolically inactive and begin to die after using its reserve products. Finally, from the results obtained, it is concluded that the use of swine wastewater as a source of organic carbon is feasible for the development of a microalgal heterotrophic process since an increase in biomass yield and removal of nutrients similar to those obtained were achieved in heterotrophic cultures with the addition of an exogenous and non-residual source of organic carbon.

## Índice de figuras

Figura 1. Diagrama de la metodología aplicada.....	32
Figura 2. Reproducción del consorcio microalgal en agua residual. ....	36
Figura 3. Esquema de instalación de los cultivos.....	38
Figura 4. Fotografía de los cultivos dentro del estante.....	38
Figura 5. Esquema de instalación de los cultivos en condiciones de oscuridad.....	39
Figura 6. Unidades experimentales empleadas en el cultivo bajo condiciones de oscuridad. ....	39
Figura 7. Muestras tomadas para su caracterización fisicoquímica. ....	40
Figura 8. Contenido de biomasa en los cultivos de microalgas medido como SST (mg/L). ....	45
Figura 9. Curvas de carbono (CT, CI y COT) y SST para el cultivo Control 1.....	47
Figura 10. Gráfica de curvas de carbono y SST para el cultivo Concentración 1....	49
Figura 11. Gráfica de curvas de carbono y SST para el cultivo Concentración 2....	51
Figura 12. Monitoreo de los parámetros fisicoquímicos de los cultivos Control 1. ..	55
Figura 13. Monitoreo de los parámetros fisicoquímicos de los cultivos Concentración 1.....	56
Figura 14. Monitoreo de los parámetros fisicoquímicos de los cultivos Concentración 2.....	56
Figura 15. Monitoreo del pH durante el periodo de cultivo. ....	57
Figura 16. Contenido de biomasa en los cultivos de microalgas bajo condiciones de oscuridad. ....	60
Figura 17. Curvas de carbono y SST para el cultivo <i>Control 2</i> bajo condiciones de oscuridad. ....	62
Figura 18. Curvas de carbono y SST para el cultivo Concentración 2 bajo condiciones de oscuridad. ....	64
Figura 19. Monitoreo de los parámetros fisicoquímicos de los cultivos Control 2 bajo condiciones de oscuridad. ....	67
Figura 20. Monitoreo de los parámetros fisicoquímicos para los cultivos con la Concentración 2 bajo condiciones de oscuridad.....	68
Figura 21. Monitoreo del pH para los cultivos bajo condiciones de oscuridad. ....	70

## Índice de tablas

Tabla 1. Cultivos heterotróficos de microalgas.....	10
Tabla 2. Cambio de pH, fuentes de energía y carbono en las vías metabólicas autótrofas y heterótrofas.....	14
Tabla 3. Eliminación de nutrientes en agua residual por microalgas.....	25
Tabla 4. Caracterización fisicoquímica de agua residual porcina.....	27
Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos. ....	34
Tabla 6. Condiciones de los cultivos (diseño de experimentos).....	37
Tabla 7. Características fisicoquímicas de las aguas residuales.....	41
Tabla 8. Caracterización fisicoquímica inicial de los medios de cultivo.....	44
Tabla 9. Concentración de biomasa y productividades obtenidas a los 21 días de cultivo.....	46
Tabla 10. Balance de masa de los cultivos Control 1.....	48
Tabla 11. Balance de masa de los cultivos Concentración 1. ....	50
Tabla 12. Balance de masa de los cultivos Concentración 2. ....	52
Tabla 13. Remoción de los nutrientes en los cultivos.....	54
Tabla 14. Caracterización fisicoquímica inicial de los medios de cultivo para en el proceso heterotrófico microalgal.....	59
Tabla 15. Concentración de biomasa y productividad de los cultivos a los 21 días bajo condiciones de oscuridad.....	61
Tabla 16. Balance de masa de los cultivos Control 2 bajo condiciones de oscuridad. ....	63
Tabla 17. Balance de masa para Concentración 2 bajo condiciones de oscuridad.....	65
Tabla 18. Remoción de nutrientes bajo condiciones de oscuridad.....	66
Tabla 19. Cultivos heterotróficos de microalgas para el tratamiento de aguas residuales. ....	69

## 1. Introducción

Una alternativa para contribuir en la solución de la crisis mundial derivada de un abastecimiento insuficiente de agua para satisfacer los requerimientos humanos, comerciales y agrícolas; además de la necesidad de desarrollar biocombustibles debido a la creciente demanda de energía y al agotamiento de los recursos fósiles, es el cultivo de microalgas en aguas residuales aplicado como un tratamiento biológico terciario y como una alternativa para producir biocombustibles a partir de su biomasa (Mata, 2010; Bhatnagar *et al.*, 2011; Gonçalves, 2017; Li *et al.*, 2019).

Este proceso es posible debido a que las microalgas son microorganismos capaces de asimilar los nutrientes orgánicos e inorgánicos presentes en el agua residual permitiendo el ahorro de agua y nutrientes en su cultivo (Salama *et al.*, 2017; Barroso *et al.*, 2019).

La forma más común para cultivar las microalgas en agua residual ha sido el cultivo autótrofo a través de su capacidad fotosintética, estas utilizan la luz solar y el CO<sub>2</sub> disponible en la atmósfera como fuente de energía y carbono respectivamente. Sin embargo, esta forma de cultivo presenta algunas desventajas como el suministro óptimo de luz y su costo asociado. (Hu *et al.*, 2018). Para dar solución a esta limitante se tiene como alternativa el cultivo heterotrófico de microalgas, que en contraste con la autotrofia no requiere de luz, y utiliza compuestos orgánicos preformados en el ambiente como fuente de carbono y energía (Guldhe *et al.*, 2017; Venkata *et al.*, 2015).

Sin embargo, la composición típica de carbono orgánico presente en el agua residual doméstica es de 290 mg/L (Metcalf y Eddy, 2014). Esta cantidad de carbono orgánico no es suficiente para que se desarrolle un proceso heterotrófico microalgal si se compara con las cantidades utilizadas en estudios previos sobre cultivos heterotróficos donde se han evaluado hasta 10 g/L o más de carbono orgánico adicionado como glucosa principalmente (Kim *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2011; Morales-Sánchez *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2017; Ramsundar *et al.*, 2017; Sheng *et al.*, 2017 y Shen *et al.*, 2019).

La adición de una fuente de carbono orgánico como la glucosa representa un costo asociado que no brinda un proceso integral al aplicar el cultivo de microalgas como

un tratamiento biológico para el agua residual y la producción de biomasa; sin embargo, existen otros tipos de aguas residuales que se caracterizan por su alto contenido de carbono orgánico como las generadas en la industria porcina.

El manejo no adecuado de los residuos de la crianza de cerdos representa un grave problema para la salud humana y el medio ambiente debido a que las aguas residuales porcinas contienen un alto nivel de sólidos orgánicos en suspensión, nutrientes (principalmente nitrógeno) y varios compuestos tóxicos como metales pesados, antibióticos y hormonas. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación estima que durante el periodo del 2010 al 2017, cada año se criaron cerca de mil millones de cerdos para el mercado mundial de alimentos lo que generó una producción de nitrógeno que superaba los 7 mil millones de kilogramos por año (Cheng *et al.*, 2020). Así mismo, la Confederación de Porcicultores Mexicanos (2019) publicó que en el año 2019 el consumo per cápita de carne de cerdo para México fue 16.8 kg/persona/año, sin embargo, se estima que para el año 2021 incremente al 17.2 kg/persona/año. Debido al incremento en el consumo mundial de carne de cerdo es necesario plantear alternativas que permitan disminuir o tratar los efluentes procedentes de esta actividad.

A partir de lo anterior se propone desarrollar un proceso heterotrófico microalgal con predominancia de *Scenedesmus* sp. en agua residual y agua residual porcina. Utilizar el agua residual porcina como fuente de carbono orgánico permitirá dar un uso a un residuo que provoca severos daños al medio ambiente con la ventaja de que no implica ningún costo asociado (Nagarajan *et al.*, 2019). El objetivo de adicionar agua residual porcina es aumentar la cantidad de carbono orgánico disuelto en el medio y así favorecer la heterotrofia en el cultivo sin requerir adicionar otra fuente de carbono orgánico.

## 2. Antecedentes

Las microalgas son capaces de crecer de forma heterotrófica esto se refiere a que pueden usar únicamente carbono orgánico como fuente de energía y carbono para su reproducción en ausencia de luz (Liu *et al.*, 2011).

Las microalgas pueden utilizar diferentes fuentes de carbono orgánico, incluidos azúcares, hidratos de carbono hidrolizados, melaza residual, acetato y glicerol, así como carbono orgánico presente en las aguas residuales (Mohan *et al.*, 2015; Pérez-García *et al.*, 2011). A partir de esto, es que el cultivo heterotrófico de microalgas puede integrarse al tratamiento de aguas residuales para dar solución de forma simultánea a algunas de las limitaciones que presenta este tipo de cultivo como el alto costo de los nutrientes y la alta demanda de agua dulce que se requiere (Bhatnagar *et al.*, 2011; Salama *et al.*, 2017). Las aguas residuales son un medio de cultivo excelente de bajo costo y de libre acceso para el crecimiento de diversas microalgas debido a que contienen macro y micronutrientes que favorecen su crecimiento.

Sin embargo, la concentración de carbono orgánico presente en el agua residual, rara vez es suficiente para que se desarrolle la heterotrofia, debido a ello se han realizado estudios en los que se ha encontrado que la adición de una fuente exógena de carbono orgánico contribuye a impulsar el crecimiento heterotrófico de las microalgas; la fuente más utilizada ha sido la glucosa en cultivos de algas verdes como *Chlorella* y *Scenedesmus* (Shen *et al.*, 2017; Ramsundar *et al.*, 2017; Morales-Sánchez *et al.*, 2015; Devi *et al.*, 2012 y Liu *et al.*, 2011).

En la Tabla 1 se presentan estudios donde se muestra que ciertas especies de microalgas tienen la capacidad de asimilar el carbono orgánico presente en el medio de cultivo con concentraciones de biomasa microalgal mayores a 0.5 g/L. Por ejemplo, *Tribonema minus* se cultivó en medio de cultivo BG-11 con la adición de 80 g/L de glucosa durante seis días bajo condiciones de oscuridad y se obtuvo 30.8 g/L de biomasa (Zhou *et al.*, 2017).

Tabla 1. Cultivos heterotróficos de microalgas.

Autor	Especie de microalga	Medio de cultivo	Periodo de cultivo	Fuente de carbono	Biomasa
Caporgno <i>et al.</i> , 2019	<i>Chlorella protothecoides</i>	Medio de cultivo Basal Bold (BBM) modificado estéril.	5	Glucosa (10 g/L)	4.33 g/L (1.06 g/Ld)
Di Caprio <i>et al.</i> 2019	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Medio BG-11 con adición de antibióticos	6	Glucosa: 5 g/L	1.1 g/L (0.21 g/Ld)
Walls <i>et al.</i> , 2019	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Agua residual no estéril	8	Glucosa: 10 g/L	0.98 g/L (0.11 g/Ld)
Shen <i>et al.</i> , 2019	<i>Botryococcus</i> sp.	Medio BG-11 con adición de 5 mg/L de Cr(IV) estéril	7	-Acetato de sodio 1%v/v -Etanol 1%v/v -Metanol 1%v/v	6.04 g/L (1.0 g/Ld) 2.69 g/L (0.43 g/Ld) 0.68 g/L (0.10 g/Ld)
Spennati <i>et al.</i> , 2019	<i>Arthrospira platensis</i> y <i>Chlorella vulgaris</i> .	Agua residual de producción vinícola y medio de cultivo Basal Bold (BBM)	15	DQO: 23.26 g/L	2.22 g/L (0.07 g/Ld)
Ren <i>et al.</i> , 2018	<i>Scenedesmus</i> sp.	Agua residual de melaza fermentada de tipo butirato	6	DQO: 725 mg/L	1.01 g/L (0.19 g/Ld)
Ramsundar <i>et al.</i> , 2017	<i>Chlorella sorokiniana</i>	-Influyente de aguas residuales estéril -Concentrado de tanque anaerobio estéril	8	Glucosa: 5 g/L	0.495 g/L (0.06 g/Ld) 0.610 g/L (0.08 g/Ld)
Shen <i>et al.</i> , 2017	<i>Scenedesmus</i> sp.	Licor de mezclado no estéril	10	TOC: 79 mg/L	0.43 g/L (0.02 g/Ld)
Zhou <i>et al.</i> , 2017	<i>Tribonema minus</i>	Medio BG-11	6	Glucosa: 80 g/L	30.8 g/L (5.86 g/L)
Wang <i>et al.</i> , 2015	<i>Chlorella vulgaris</i>	Agua porcina diluida 20 veces en agua destilada, estéril	14	DQO: 1064 mg/L	1.49 g/L (1.26 g/Ld)
Beevi <i>et al.</i> , 2014	<i>Chlorococcum</i> sp.	Efluente lácteo no estéril	15	Glicerol residual (6%)	1.94 g/L (0.13 g/Ld)
Morales-Sánchez <i>et al.</i> , 2013	<i>Neochloris oleabundans</i>	Medio mineral (Bold's Basal Medium; BBM) estéril	5	Glucosa: 10 g/L	2.3 g/L (0.47 g/Ld)
Ren <i>et al.</i> , 2013	<i>Scenedesmus</i> sp.	Medio BG-11 estéril	6	Glucosa: 10 g/L NaNO <sub>3</sub> : 0.6 g/L	3.46 g/L (0.67 g/Ld)
Liu <i>et al.</i> , 2011	<i>Chlorella zofingiensis</i>	Medio de cultivo líquido Kuhl estéril	14	Glucosa: 30 g/L	9.7 g/L (0.64 g/L)
Zhou <i>et al.</i> , 2012	<i>Auxenochlorella protothecoides</i>	Licor de concentrado de lodos primarios y secundarios estéril	7	TOC: 960 mg/L	1.12 g/L (0.20 g/Ld)

Como se observa en la Tabla 1, en la mayoría de los casos estudiados se adicionó una fuente de carbono orgánico exógena, principalmente la glucosa. Debido a esto, se plantea el uso de aguas residuales con alto contenido de materia orgánica como fuente de carbono orgánico principalmente, como es el caso del agua residual

porcina. El agua residual porcina tiene un alto contenido de carbono orgánico, nitrógeno (particularmente nitrógeno amoniacal) y fósforo, nutrientes que también están presentes en el agua residual, aunque en menor proporción y que corresponden a los principales nutrientes utilizados por las microalgas para su crecimiento.

A partir de lo anterior, en este estudio se desarrollará un proceso heterotrófico microalgal utilizando como medio de cultivo agua residual urbana obtenida de la Planta de Tratamiento de Agua Residual de Ciencias Políticas ubicada en Ciudad universitaria en la UNAM (PTAR FCPyS-UNAM) y como fuente de carbono orgánico agua residual porcina obtenida de una granja, ubicada en la Alcaldía de Milpa Alta, Ciudad de México, cuyo principal proceso productivo es la engorda de cerdos.

### 3. Marco teórico

#### 3.1 Microalgas, generalidades

En la ficología aplicada, el término microalgas se refiere a las algas microscópicas *sensu stricto* y las bacterias fotosintéticas oxigénicas, es decir, las cianobacterias, anteriormente conocidas como Cyanophyceae (Richmond y Hu, 2013).

Las cianobacterias tienen una estructura de células procariotas donde el ADN se encuentra libre en el citoplasma junto con las membranas fotosintéticas y no está rodeado por una membrana, además de que no tienen orgánulos unidos a la membrana citoplasmática a diferencia de las microalgas que poseen una estructura de células eucariotas (Richmond, 2013; Singh y Saxena, 2015; Acién *et al.*, 2017).

Las microalgas eucariotas tienen un núcleo definido unido a la membrana citoplasmática, que contiene la mayor parte del genoma distribuido en un conjunto de cromosomas y el nucléolo. Su citoplasma está dividido en compartimentos y orgánulos unidos a la membrana como la pared celular, mitocondrias, cloroplastos que contienen clorofila y otros pigmentos; así como vacuolas, centriolos entre otros dedicados a funciones específicas (Brock, 2009; Vieira-Costa *et al.*, 2014).

Los sistemas actuales para su clasificación taxonómica se basan en los siguientes criterios principales: tipos de pigmentos, naturaleza química de los productos de almacenamiento y constituyentes de la pared celular. Los criterios adicionales tienen en cuenta los siguientes caracteres citológicos y morfológicos: aparición de células flageladas, estructura de los flagelos, esquema y ruta de división nuclear y celular (Barsanti y Gualtieri, 2014; Richmond y Hu, 2013).

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos capaces de realizar la fotosíntesis oxigénica. En la mayoría de los hábitats funcionan como los principales productores de la cadena alimenticia, produciendo materia orgánica a partir de la luz solar, dióxido de carbono y agua, además de generar oxígeno necesario para el metabolismo de los organismos consumidores (Lee, 2008). Aunque, éstos microorganismos son fotoautótrofos, también pueden crecer en condiciones mixotróficas o heterótrofas (Acién *et al.*, 2017).

Las microalgas se distribuyen principalmente en los cuerpos de agua, desde manantiales de agua dulce hasta lagos salados, con tolerancia para un amplio rango

de pH, temperatura, turbidez y concentración de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. Sin embargo, también pueden ser subaéreas cuando están expuestas a la atmósfera en lugar de estar sumergidas (Barsanti y Gualtieri, 2014). Aunque generalmente son de vida libre, un cierto número de microalgas viven en asociación simbiótica con una variedad de otros organismos (Richmond y Hu, 2013).

Los métodos de reproducción en microalgas pueden ser vegetativos mediante la división de una sola célula o la fragmentación de una colonia, asexuales por la producción de esporas móviles o sexuales por la unión de gametos (Barsanti y Gualtieri, 2014). Su composición general es de lípidos (9.5–42%), carbohidratos (17–57%) y proteínas (20–50%), en proporciones que varían según las especies y las condiciones de crecimiento (Barroso *et al.*, 2019).

En general, se ha estimado que existen alrededor de 200,000-800,000 especies (incluidas las cianobacterias) de las cuales se describen 50,000 especies (Mata *et al.*, 2010; Gaignard *et al.*, 2019). Estos microorganismos tienen gran potencial biotecnológico para producir sustancias valiosas a partir de su biomasa como alimentos para la acuicultura, aves de corral y aplicaciones en la farmacéutica; además de que contribuyen a la mitigación de CO<sub>2</sub>, el tratamiento de aguas residuales y la producción de biocombustibles (Junying *et al.*, 2013; Acién *et al.*, 2017; Garrido-Cardenas *et al.*, 2018).

### 3.2 Autotrofia y heterotrofia

La autotrofia se refiere a la capacidad de ciertos microorganismos de producir sustancias orgánicas a partir de nutrientes inorgánicos basados en la energía extraída de la luz, en contraste con la heterotrofia que no requiere de luz y utiliza materia orgánica preformada en el ambiente como fuente de energía y de carbono (Singh y Saxena, 2015; Stevenson *et al.*, 1996).

En resumen, en la Tabla 2 se presenta el cambio de pH y las fuentes de energía y carbono en cada una de las vías metabólicas autótrofa y heterotrófica.

Tabla 2. Cambio de pH, fuentes de energía y carbono en las vías metabólicas autótrofas y heterotróficas.

Tipo de cultivo	Fuente de energía	Fuente de carbono	Metabolismo y pH
Autótrofo	Luz	Inorgánica	$H_2O + HCO_3^- \rightarrow C(\text{biomasa}) + 1/O_2 + 3OH^-$ : pH incrementa <i>Ec. 1</i>
Heterótrofo	Orgánica	Orgánica	$(1 + \alpha)CH_2O + O_2 \rightarrow C(\text{biomasa}) + \alpha CO_2 + (1 + \alpha)H_2O$ : pH decrece <i>Ec. 2</i>

Fuente: (Chojnacka y Marquez-Rocha, 2004; Kim *et al.* 2013).

Gran cantidad de las microalgas usan la fotosíntesis para obtener su alimento generando energía directamente de la radiación del sol; esta característica las designa como organismos autótrofos. Su fotosíntesis se basa principalmente en el ciclo de Calvin en el que la ribulosa-1,5-bisfosfato reacciona con el CO<sub>2</sub> para sintetizar ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA), que se consume durante la producción de glucosa y otros metabolitos (John *et al.*, 2011; Singh y Saxena, 2015). Sin embargo, la mayoría de las microalgas están integradas fisiológicamente para metabolizar de forma autótrofa y heterotrófica.

Aunque las microalgas emplean el metabolismo autótrofo con mayor frecuencia y eficiencia, la heterotrofia facultativa puede ser un mecanismo de supervivencia importante para aquellas que estén en condiciones limitadas de luz (Stevenson *et al.*, 1996).

En resumen, para las microalgas la autotrofia es el modo principal de nutrición y la heterotrofia es un medio para la adquisición de carbono cuando la luz es limitante (Barsanti y Gualtieri, 2014).

### 3.3 Cultivo heterotrófico de microalgas

Algunas microalgas pueden crecer heterotróficamente en ausencia de luz al reemplazar la fijación de CO<sub>2</sub> atmosférico, propio de los cultivos autótrofos, por fuentes de carbono orgánico disuelto en el medio de cultivo. En los cultivos autótrofos, las microalgas asimilan el carbono inorgánico en forma de carbohidratos, mientras que bajo condiciones heterotróficas lo asimilan principalmente en grasas y proteínas (Perez-Garcia *et al.*, 2011; Mohan *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2018).

Para que se desarrolle un cultivo heterotrófico se requiere que las microalgas tengan un mecanismo por el cual la célula pueda captar y asimilar de forma efectiva las fuentes de carbono orgánico disueltas en el medio. Uno de los mecanismos es la difusión pasiva (osmotrofia) que ocurre en ciertas células de microalgas permeables cuando las concentraciones de carbono orgánico disuelto son altas (Stevenson *et al.*, 1996). Así mismo, la fagotrofia es otro mecanismo utilizado que trata de la ingesta de bacterias y otras células como presas particuladas (Barsanti y Gualtieri, 2014).

Así mismo, se requieren las siguientes características para que una especie de microalga pueda ser cultivada de forma heterotrófica son (Droop, 1974; Morales-Sánchez *et al.*, 2015 y Hu *et al.*, 2018).:

- a. Capacidad de división celular y metabolismo activo en ausencia de luz.
- b. Capacidad de utilizar una variedad de fuentes de carbono orgánico, lo que provoca la utilización de residuos de biomasa lignocelulósica y otros materiales como fuente de carbono.
- c. Capacidad para adaptarse a los cambios ambientales bruscos.
- d. Capacidad para resistir el estrés hidromecánico debido a la agitación.

El cultivo de microalgas bajo condiciones heterotróficas permite que las células de microalgas crezcan más rápido, acumulen una biomasa densa y aceite lipídico, en menos tiempo que los cultivos fototróficos esto debido a que la luz no necesita

penetrar sobre las células; esto proporciona un método de cultivo viable económicamente porque se obtiene mayor producción de biomasa (Mohan *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2017).

El cultivo heterotrófico se ha utilizado con éxito para la producción de biomasa de microalgas con alto contenido de lípidos. Se encontró que el contenido de lípidos en las células de la microalga heterotrófica *C. protothecoides* es del 55%, cuatro veces más alto que en el cultivo autótrofo bajo condiciones similares (Salama *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2006).

### 3.4 Ventajas del cultivo heterotrófico de microalgas

Las principales ventajas de cultivar microalgas en condiciones heterótrofas se resume a continuación (Hu *et al.* 2018; Zhou *et al.*, 2017 y Perez-Garcia *et al.*, 2011):

1. Se supera el problema del suministro óptimo de luz para el cultivo debido a que no depende de las condiciones climáticas ni estacionales.
2. Las microalgas que tienen la capacidad de crecer en un medio heterotrófico pueden metabolizarse en ausencia de luz o en condiciones oscuras, utilizando carbono orgánico como fuente de energía y carbono.
3. Densidades celulares altas que simplifican la recolección de la biomasa.
4. El cultivo heterótrofo se puede llevar a cabo en fermentadores convencionales a escala industrial, que ofrecen un mejor control sobre los parámetros del proceso como el pH, la temperatura, los niveles de oxígeno y la fuente de carbono.

### 3.5 Limitaciones del cultivo heterotrófico de microalgas

Algunas de las principales limitaciones que se presentan en el desarrollo de los cultivos heterótrofos es que hay un número limitado de especies de microalgas que pueden crecer de forma heterótrofa; además de que aumentan los costos debido a la adición de un sustrato orgánico. Así mismo, puede haber inhibición del crecimiento por exceso del sustrato orgánico y ocurre contaminación y competencia por otros microorganismos principalmente las bacterias debido a que tienen tasas de crecimiento superiores a las microalgas (Chen, 1996; Perez-Garcia *et al.*, 2011; Di Caprio *et al.* 2019). Sin embargo, cuando se emplean efluentes residuales como

medio de cultivo para las microalgas, la presencia de bacterias puede contribuir a la degradación de contaminantes orgánicos y a la liberación de elementos necesarios para formas biodisponibles de nitrógeno y fósforo favoreciendo el crecimiento de las microalgas (Di Caprio et al. 2019, Samo *et al.*, 2018; Ramanan *et al.*, 2016)

### 3.6 Factores que afectan el crecimiento heterotrófico

Las microalgas, como cualquier otro microorganismo, requieren de condiciones de cultivo adecuadas para su crecimiento. Las principales variables son la cantidad de nutrientes disponibles en el medio de cultivo, incluyendo la fuente de carbono, el pH, la temperatura y el mezclado. A continuación, se describen aspectos generales de estas variables.

#### Nutrientes

Los componentes principales de la biomasa de las microalgas son el carbono y oxígeno (30% –50% en peso seco), hidrógeno (3%-7% en peso seco), nitrógeno. (4%–9% en peso seco), fósforo (1%-3% en peso seco), y cantidades menores de otros elementos como azufre, potasio, magnesio y calcio (Acién *et al.*, 2017). En general el crecimiento y la productividad de un cultivo de microalgas depende de la cantidad y calidad de éstos nutrientes presentes en el medio de cultivo (Chiu *et al.*, 2015).

Sin embargo, el carbono, nitrógeno y fósforo (C, N y P) son los elementos principales ya que integran la composición química de las microalgas al constituir los cuatro grandes grupos de biomoléculas: proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos que por sí solos forman el 97% de su biomasa. Debido a esto, en un cultivo de microalgas se busca mantener la relación de molar C: N: P igual a 106:16:1 observada para el fitoplancton para una producción óptima de biomasa (Redfield, 1934; Fraga y Pérez, 1990; Reynolds, 2006; Ptacnik *et al.*, 2010).

La glucosa es la principal fuente de carbono orgánico disuelto utilizada en los cultivos heterotróficos de mayor contenido de energía por mol que otro sustrato; por ejemplo, la microalgas debido a que se obtienen tasas mucho más altas de crecimiento que con cualquier otro sustrato esto se debe a que la glucosa produce 2.8 kJ/mol de energía en comparación con 0.8 kJ/mol de acetato que es otra fuente de carbono

orgánico comúnmente utilizada (Boyle & Morgan, 2009; Perez-Garcia *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2018). También se ha utilizado el glicerol como fuente de carbono, el cual también funciona como osmolito para mantener el equilibrio osmótico celular y no es perjudicial para las microalgas incluso en concentraciones altas. Otras fuentes de carbono orgánico que pueden consumir las microalgas son sacarosa, lactosa y fructosa (Lee *et al.*, 2018).

El nitrógeno y el fósforo son elementos limitantes en el cultivo de microalgas y su proporción N: P se utiliza como un indicador importante, sí el valor es muy alto significa restricción de P y un valor muy bajo implica que el suministro de N es escaso (Junying *et al.*, 2013). Por ejemplo, para el cultivo de *Chlorella Pyrenoidosa* bajo condiciones heterotróficas se ha utilizado como fuente de nitrógeno diferentes concentraciones de nitrato de sodio (Sachdeva *et al.*, 2016).

### Temperatura

Para las microalgas, como para cualquier otro microorganismo, la temperatura es un factor que afecta su crecimiento y supervivencia; a temperaturas muy altas puede ocurrir la desnaturalización proteica, colapso de la membrana y lisis térmica, y a temperaturas muy frías se puede presentar la gelificación provocando que no haya crecimiento. Para evitar un efecto negativo incluso la muerte celular es importante tener conocimiento acerca de las temperaturas cardinales que son: la temperatura mínima, óptima y máxima que permiten el crecimiento sin causar daños (Brock, 2009).

En el caso particular de las microalgas la temperatura influye directamente en su crecimiento a través de cambios en sus actividades metabólicas, en la cinética de las enzimas, conformación de estructuras vitales e incluso en el predominio de las especies. En general, el aumento de la temperatura está asociado a una alta asimilación de nutrientes (Singh *et al.*, 2015).

El rango de tolerancia de temperatura es diferente para cada especie de microalga. Por ejemplo, en agua dulce *Chlorella* y *Scenedesmus* pueden crecer en el intervalo de 5°C-35°C, con una temperatura óptima de crecimiento de 25°C y 30°C respectivamente (Junying *et al.*, 2013).

### Potencial de hidrógeno: pH

El rango de pH para la mayoría de las especies de algas cultivadas es entre 7 y 9, con un rango óptimo de 8.2 a 8.7, aunque hay especies que habitan en ambientes más ácidos o básicos (Barsanti y Gualtieri, 2014). Por ejemplo, *Scenedesmus* sp. pudo crecer bien en un amplio rango de pH de 4-11 al ser cultivada bajo condiciones heterotróficas (Ren *et al.*, 2013). Así mismo, *Chlorella sorokiniana* fue estudiada bajo condiciones heterotróficas y se determinó que tiene la capacidad de crecer en el rango de pH de 5-9 (Kim *et al.*, 2013).

El pH en los cultivos de microalgas es importante en la regulación de la absorción de nutrientes esenciales, incluido el nitrato y el fosfato, así como en la ionización de los metabolitos bioquímicos, la precipitación de los fosfatos, la solubilidad y la disponibilidad de elementos traza; además de que el pH regula el predominio de las especies dentro de poblaciones mixtas de microalgas (Acién *et al.*, 2017). En el caso de los cultivos heterótrofos las microalgas utilizan carbono orgánico y producen CO<sub>2</sub>, lo que puede provocar una disminución del pH (Kim *et al.*, 2013).

### Mezclado

La suficiente turbulencia de los cultivos de microalgas minimiza el gradiente de los nutrientes y evita la sedimentación celular que puede limitar el rendimiento de las células. La mezcla debe ser suave y dependiendo de la escala del sistema de cultivo puede proporcionarse mediante varios métodos desde la agitación manual diariamente, hasta el burbujeo de aire con bombas o la agitación mecánica mediante bombas (Brindley *et al.*, 2004; Barsanti y Gualtieri, 2014 y Singh *et al.*, 2015).

Sin embargo, la aireación o agitación excesiva mediante dispositivos neumáticos y mecánicos pueden producir daño celular si las microalgas son susceptibles a las fuerzas de corte mecánicas e hidrodinámicas, lo que afecta al rendimiento del cultivo reduciendo su crecimiento. Los factores que determinan el daño asociado al esfuerzo de corte son el tipo de microalgas, su tamaño celular, la composición y grosor de la pared celular, la intensidad y la naturaleza del esfuerzo de corte y la adecuación de las condiciones de cultivo a las que están expuestas las células (Acién *et al.*, 2017; Brindley *et al.*, 2004).

### 3.7 Metabolismo en un cultivo heterotrófico

En modo heterotrófico, el carbono orgánico adquirido por las microalgas se cataboliza o degrada, de forma similar a las bacterias. La presencia de enzimas metabolizadoras de carbono en las microalgas refleja su modo metabólico básico: almacenan el carbono y lo fijan en forma de polímeros como el almidón y luego se descompone y se utiliza en condiciones oscuras para el crecimiento de la biomasa y la división celular. El almidón proporciona glucosa para la ruta central de carbohidratos, ya sea la ruta Embden-Mayerhoff-Parnas (ruta EMP o glucólisis) o la ruta de Fosfato de Pentosas (PPP), produciendo NADH y ATP. Bajo condiciones aeróbicas una vez que la glucosa se ha convertido en piruvato, se metaboliza a través de la respiración la cual ocurre con la oxidación completa de la glucosa a CO<sub>2</sub> a través de EMP, PPP y el Ciclo del Ácidos Tricarboxílicos (ciclo TCA o Ciclo de Krebs) y el ATP se genera por fosforilación oxidativa (Boyle y Morgan, 2009; Perez-Garcia *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2018).

La ecuación 3 presenta, en resumen, el proceso de la respiración celular que como se menciona con anterioridad se refiere a la degradación completa de la materia orgánica donde se consume oxígeno y se produce CO<sub>2</sub>, es un proceso exergónico y parte de la energía química que se libera se recupera en forma de ATP.



La tasa de respiración de cualquier sustrato orgánico está íntimamente orientada al crecimiento y la división celular. Las tasas de respiración endógena y de captación de O<sub>2</sub> varían a lo largo del ciclo celular (Lloyd, 1974, Perez-Garcia *et al.*, 2011).

Esta respiración oscura desempeña dos funciones principales en las microalgas: (a) sirve como fuente exclusiva de energía para el mantenimiento y la biosíntesis en ambientes oscuros y (b) proporciona esqueletos de carbono esenciales para la biosíntesis en cualquier condición de crecimiento (Geider y Osborne, 1989; Perez-Garcia *et al.*, 2011).

### Asimilación de carbono orgánico

Una de las características más importantes para que las microalgas que se encuentran limitadas de luz puedan ser cultivadas de forma heterotrófica es que sean capaces de metabolizar diferentes fuentes de carbono orgánico, como el acetato, lactato, etanol, ácidos grasos saturados, glicolato, glicerol, hexosas (como la glucosa y fructosa), pentosas (xilosa, arabinosa), disacáridos (lactosa, sacarosa y celobiosa) y aminoácidos. Por lo tanto, se esperaría que las fuentes de carbono utilizadas por las microalgas en condiciones de oscuridad se transformen en intermedios de carbono en las principales rutas metabólicas, reemplazando las moléculas producidas fotosintéticamente (Morales- Sánchez *et al.*, 2015).

Por ejemplo, de las vías utilizadas para la descomposición de la glucosa solo la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) y la ruta de las Fosfato Pentosas (PPP) se han mostrado en las microalgas; predominado en el crecimiento heterótrofo la ruta PPP que tiene la finalidad de la obtención de azúcares de cinco átomos de carbono, la ribosa-5-fosfato y la coenzima reducida NADPH necesarios para la biosíntesis de ácidos nucleicos y ácidos grasos (Mohan *et al.*, 2015, Perez-Garcia *et al.*, 2011).

Otro sustrato utilizado en el estudio de los cultivos heterotróficos es el glicerol el cual se convierte en gliceraldehído 3-fosfato, que forma piruvato a través de la vía EMP para después entrar en el ciclo de Ácidos Carboxílicos TCA (Spennati *et al.*, 2019; Perez-Garcia *et al.*, 2011). Otro ejemplo es el acetato que una vez dentro de las células de microalgas, en el citosol, inicia su asimilación por la acetilación de coenzima A por la sintetasa de acetil-CoA para formar acetil coenzima A (acetil-CoA) en una reacción catalizada de un solo paso utilizando una sola molécula de ATP. Esto es especialmente importante porque varias microalgas pueden utilizarlo como única fuente de carbono en bajas concentraciones (por ejemplo, para *Cryptocodinium cohnii* no más de 1g/L) además de que es un sustrato fácilmente disponible y económico derivado de muchas aplicaciones industriales y su uso no impone severas restricciones al cultivo de microalgas (Morales-Sánchez *et al.* 2015; Perez-Garcia *et al.* 2011; Droop, 1974).

### Asimilación del nitrógeno

Después del carbono, el nitrógeno es cuantitativamente el elemento más importante que contribuye a la materia seca de las células de microalgas, con un peso seco del 1 al 10%. El metabolismo del carbono y el nitrógeno están ligados en las microalgas porque comparten: el carbono orgánico suministrado directamente y la energía generada en el ciclo del TCA y la cadena de transporte de electrones.

En general, el orden de uso de una fuente de nitrógeno por parte de la mayoría de las especies de microalgas es el siguiente:

amonio> urea> nitrato> nitrito

El amonio se considera la fuente de nitrógeno preferida para las microalgas debido a que requiere menos energía para su absorción y su asimilación proporciona los bloques de construcción para la síntesis de compuestos orgánicos de nitrógeno, como aminoácidos, nucleótidos, clorofilas, poliaminas y alcaloides (Coruzzi, 2003; Perez-Garcia *et al.*, 2011; Pancha *et al.*, 2014 y Monfet y Unc, 2017).

Respecto al nitrato, la oscuridad puede tener un efecto negativo en su asimilación. La mayoría de las microalgas asimilan el nitrato más rápidamente en la luz que en la oscuridad. El nitrato es asimilado por las microalgas y transportado a través de su membrana celular y luego es reducido a amoníaco (Crawford *et al.*, 2000).

Así mismo, los compuestos de nitrógeno orgánico permiten obtener rendimientos comparables a los obtenidos con amonio y nitrato, aunque las tasas de crecimiento varían dependiendo de la fuente de nitrógeno orgánico y carbono; así como la especie de microalga.

### 3.8 Cultivo heterotrófico de microalgas en agua residual

En México la disponibilidad de agua renovable per cápita es de 3692 m<sup>3</sup>/hab./año, pero se estima que para el año 2030 en algunas regiones hidrológicas del país alcance niveles cercanos o incluso inferiores a los 1000 m<sup>3</sup>/hab./año, lo que se califica como una condición de escasez (EAM, 2016). Una de las acciones que se deberá tomar para hacer frente a la disminución de la disponibilidad del agua es incrementar el volumen de agua residual tratada y su reúso.

Las aguas residuales pueden definirse como una combinación de los residuos de materiales orgánicos e inorgánicos naturales, así como compuestos antropogénicos provenientes de las descargas de usos municipales, comerciales, de servicio, agrícolas, pecuarios, domésticos, incluyendo fraccionamiento y en general de cualquier otro uso, así como la mezcla de ellas (NOM-001-SEMARNAT-1996). Cuando el agua residual no tratada se acumula y se deja que se vuelva séptica, la descomposición de la materia orgánica que contiene conducirá a condiciones molestas, incluida la producción de gases malolientes. Así mismo, las aguas residuales también contienen nutrientes, que pueden estimular el crecimiento de las plantas acuáticas y otros microorganismos, especialmente bacterias, virus y protozoos además de contener compuestos tóxicos que potencialmente pueden ser mutagénicos o carcinogénicos (Metcalf y Eddy, 2014; Abdel-Raouf *et al.*, 2012). Por estas razones, el tratamiento inmediato, así como su reutilización es necesaria para proteger la salud pública y el medio ambiente. Sin embargo, el tratamiento requerido para un agua residual depende de los requerimientos de calidad para la descarga del efluente. En la actualidad, las operaciones y procesos de la unidad se agrupan para proporcionar varios niveles de tratamiento: primario, secundario y avanzado (o terciario).

En un tratamiento primario, una porción de los sólidos suspendidos y la materia orgánica es eliminada del agua residual, posteriormente éste efluente es tratado en una segunda etapa donde se elimina la mayoría de la materia orgánica residual, sólidos suspendidos y nutrientes (nitrógeno y fósforo); a esta etapa se le conoce como tratamiento secundario. El efluente del tratamiento secundario contiene pequeñas cantidades de materia orgánica y nutrientes que no fueron removidos por el tratamiento secundario. Cuando se requiere el reúso o control de la eutrofización

del cuerpo receptor, se usan tratamientos terciarios que involucran procesos físico-químicos que generalmente son costosos y pueden conducir a una contaminación secundaria.

A partir de esto, diversos estudios han demostrado la factibilidad del uso de los cultivos de microalgas en la etapa de tratamiento terciario del agua residual ya que promueven la eliminación de nitrógeno y fósforo, que causan la eutrofización y otros elementos como los metales pesados a través de su metabolismo (Bux F., 2013; Gonçalves et al., 2017; Salama et al., 2017; Monfet y Unc, 2017; Barroso et al., 2019).

La historia del uso viable de microalgas en el tratamiento de aguas residuales abarca aproximadamente setenta y cinco años con la aplicación de varias especies, incluida la *Chlorella* sp, *Dunaliella* sp., *Scenedesmus* sp. entre otras (Salama et al., 2017; Santos y Pires, 2018; Li et al., 2019).

Las microalgas remueven del agua residual carbono, nitrógeno como amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y fósforo como orfosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) entre otros compuestos (Gonçalves et al., 2017). Convierten estos nutrientes en biomasa la cual se puede utilizar como fuente potencial de proteínas, lípidos, carbohidratos y pigmentos para la producción de fertilizantes, alimento para peces, aves de corral y biocombustibles como el biodiesel (Abomohra et al., 2016; Nhat et al., 2018; y Salama et al., 2017).

En el cultivo heterotrófico de microalgas en agua residual bajo condiciones no estériles la presencia de otros microorganismos sugiere un proceso de esterilización para evitar competencia por el sustrato orgánico principalmente, sin embargo, los costos asociados harían que el proceso sea económicamente inviable (Walls et al., 2019). Debido a esto se prefiere el cultivo heterotrófico en agua residual bajo condiciones no estériles, además de que algunos estudios han demostrado que la presencia de bacterias mejora el crecimiento de las microalgas y contribuye a la eliminación de nutrientes debido a la asociación simbiótica microalga-bacteria. Esta cooperación ocurre durante su interacción metabólica en el medio de cultivo lo que permite mayores porcentajes de eliminación de nutrientes (Ramanan et al., 2016; Gonçalves et al., 2017; Samo et al., 2018; Hernández-García et al., 2019).

En la Tabla 3 se presentan los principales mecanismos implicados en la eliminación de nutrientes durante el cultivo de microalgas en agua residual.

Tabla 3. Eliminación de nutrientes en agua residual por microalgas.

<b>Nutriente</b>	<b>Mecanismo</b>
Carbón inorgánico: CO <sub>2</sub>	Integración en el ciclo de Calvin.
Carbón orgánico	Integración en el metabolismo.
Nitrógeno: N <sub>2</sub> -N	Fijación por microalgas procariotas (cianobacteria) en amoníaco, seguida de conversión de aminoácidos.
NO <sub>3</sub> -N y NO <sub>2</sub> -N	Reducción en amonio seguida de conversión en aminoácidos.
NH <sub>4</sub> -N	Conversión directa en aminoácidos
Fósforos: PO <sub>4</sub> —P	Fosforilación química

Fuente: (Gonçalves *et al.*, 2017).

Algunos estudios de cultivos de microalgas han propuesto una estrategia de cultivo en dos etapas que involucra a la heterotrofia: heterotrófico-autotrófico o autotrófico-heterotrófico con el objetivo de generar biomasa con alta densidad celular y alto contenido de lípidos; además de disminuir la contaminación por otros microorganismos cuando se involucran estanques abiertos al aire libre (Xiong *et al.*, 2010; Fan *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2012; Rezić *et al.*, 2013; Altunoz *et al.*, 2020). Así mismo, la implementación de esta estrategia en agua residual contribuye a eliminar aún más los nutrientes (Zhou *et al.* 2012).

Esto debido a que las microalgas producidas por el proceso de dos etapas están expuestas a condiciones de estrés que inducen a una rápida acumulación de lípidos y a la formación de quistes los cuales se caracterizan por tener una pared celular gruesa que proporciona resistencia al cizallamiento mecánico, además, de que facilitan su extracción por decantación gravitacional. Así mismo, se ha sugerido que las células estresadas resisten la acción de lisis de los depredadores debido a la pared celular gruesa (Nagappan *et al.*, 2019).

La implementación de un cultivo heterotrófico en una primera etapa tiene como objetivo la producción de biomasa microalgal con alta densidad celular a través del consumo de carbono orgánico, una vez que éste se agota, se continua con la segunda etapa que corresponde al crecimiento autotrófico donde la fuente de carbono se obtiene a través de la fijación de CO<sub>2</sub>. Este cambio provoca un incremento en el contenido de lípidos como respuesta al estrés ocasionado debido a la

irradiación súbita de luz (Fan *et al.*, 2012 y Hu *et al.*, 2012). Por otra parte, se ha empleado primero una etapa autotrófica con la finalidad de determinar la especie de microalga eficiente en la producción de lípidos; el siguiente paso es continuar con una fase de crecimiento heterotrófico donde es necesario enriquecer el medio de cultivo con una fuente de carbono orgánico. Este cambio permite incrementar la productividad de la biomasa y los lípidos como respuesta al estrés provocado por la ausencia de luz (Altunoz *et al.*, 2020).

En la mayoría de los cultivos heterotróficos en agua residual estudiados hasta ahora se ha adicionado como fuente de carbono la glucosa; sin embargo, las microalgas son capaces de usar fuentes de carbono orgánico residuales como la melaza residual, glicerol residual de la industria del biodiesel, así como el carbono orgánico presente en las aguas residuales generadas de la industria como la láctea o vinícola y de las generadas a partir de la producción porcina (Spennati *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2015; Mohan *et al.*, 2015; Beevi *et al.*, 2014).

La necesidad de adicionar una fuente exógena de carbono orgánico al agua residual se debe a que la concentración de carbono orgánico presente en ella, 290 mg/L como composición típica, generalmente no es suficiente para desarrollar la heterotrofia, si se comparada con las concentraciones de glucosa utilizados en los cultivos heterotróficos (Ramsundar *et al.*, 2017; Metcalf & Eddy, 2014).

### 3.9 Uso del agua residual porcina en cultivos de microalgas

El Informe del “Mercado mundial de carne de cerdo 2017-2021” estableció que la carne de cerdo es la más consumida en el mundo (Cheng *et al.*, 2019 y Reportlinker, 2017). La población actual de cerdos es de 769.05 millones de cabezas de cerdo y la producción de cerdo para el año 2018 fue de 118.8 millones de toneladas métricas. Esto implica un aumento significativo en el número de granjas porcinas y el desarrollo de operaciones concentradas de alimentación y crianza de cerdos lo que resulta en grandes cantidades de producción de aguas residuales porcinas (Nagarajan *et al.*, 2019).

El aumento en el volumen de agua residual porcina contribuye a la eutrofización de las aguas superficiales naturales lo que representa un problema ambiental; además

de la contaminación del suelo que se encuentra a su alrededor y el mal olor asociado a su descarga (Salama *et al.*, 2017; Garzón-Zúñiga y Buelna, 2014). Esto debido a que en la mayoría de los sistemas de tratamiento de efluentes de granjas porcinas a escala real presentan bajas eficiencias en la remoción de sus contaminantes ya que sus sistemas no consideran la gran variación de concentración en los efluentes de cada proceso productivo (maternidad, destete, engorda y mezcla); además de otros factores como el tamaño de la granja, la composición del alimento, el número de cerdos, la forma o métodos de alojamiento; así como factores ambientales como la temperatura y humedad, pero sobre todo el manejo del agua. Existe una correlación entre el tamaño de la granja y el uso eficiente del agua, entre mayor es el tamaño de granja, el agua se utiliza de forma más eficiente y por consecuencia la concentración de contaminantes en el efluente es mayor (Nagarajan *et al.*, 2019 y Garzón-Zúñiga y Buelna, 2014).

El agua residual porcina es generada a partir de las excretas de los cerdos y el agua utilizada para la limpieza de los cobertizos donde se alojan los cerdos. Debido a esto el agua residual porcina se caracteriza por su alto contenido de materia orgánica y nutrientes como el nitrógeno, principalmente nitrógeno amoniacal, y fósforo proveniente de la orina y el excremento de los cerdos que en conjunto constituyen la alta demanda química y biológica de oxígeno (ver Tabla 4). Además de altos niveles de sólidos suspendidos y compuestos tóxicos como hormonas, antibióticos y metales pesados y además de microorganismos patógenos (García *et al.*, 2019; Cheng *et al.*, 2019).

Tabla 4. Caracterización fisicoquímica de agua residual porcina.

Sitio	Estado	Sólidos totales (mg/L)	DQO (mg/L)	Nitrógeno total (mg/L)	Fósforo total (mg/L)	pH	Ref.
Nuevo León, Mexico	Después de tratamiento primario	7120	10933	163.4	147	6.8	López-Pacheco <i>et al.</i> , 2019
México	Cruda	---	34 310	1 666	97.6	7.3	Garzón-Zúñiga <i>et al.</i> , 2014
Yongin, Corea	Filtrada	---	92800	7300	500	6.6	Zhang <i>et al.</i> , 2011
Kyungbuk, Corea	Filtrada	61800	130800	7300	---	6.4	Ahn <i>et al.</i> , 2006
Saitama, Japón	Diluida	917	90300	4500	2600	7.8	Kim <i>et al.</i> , 2004
Harbin, China	Filtrada	---	20180	1450.8	18.7	8.9	Wang <i>et al.</i> , 2015
Monells, España	Decantada	---	2470	300	---	8.5	Vilajeliu Pons <i>et al.</i> , 2017
Minnesota, USA	Filtrado	---	8800	1200	601	7.1	Wu <i>et al.</i> , 2015

Existen diferentes procesos convencionales para tratar el agua residual porcina como los tanques de estabilización anaerobios, facultativos o aerobios, así como humedales artificiales o a través de una digestión anaerobia la desventaja es que se requieren grandes áreas de tierra o los procesos resultan ser costosos debido a que posteriormente necesitan otros procesos para remover mayor cantidad de contaminantes (Escalante y Garzón, 2011). Recientemente, se ha evaluado el cultivo de microalgas como una alternativa de biorremediación para el agua porcina ya que su composición hace factible su uso como medio de cultivo, además de que las microalgas presentan alta tolerancia al nitrógeno amoniacal, antibióticos y hormonas (Nagarajan *et al.*, 2019; Prandini *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2015).

En los últimos años se han presentados diversos estudios acerca del cultivo de microalgas en agua residual porcina que demuestran su tolerancia para crecer en este tipo de efluentes. Sin embargo, en la mayoría se ha realizado un tratamiento previo (digestión anaerobia principalmente) para el agua residual porcina y se han evaluado sólo cultivos axénicos, es decir, sólo un tipo de especie de microalga, donde predominan *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. Los resultados indican que las condiciones de cultivo, así como el pretratamiento del agua residual porcina tienen un efecto sobre la producción de la biomasa microalgal (Cheng *et al.*, 2019, García *et al.*, 2019; Prandini *et al.*, 2016, Wang *et al.*, 2015; Ji *et al.*, 2013).

En este trabajo se busca aprovechar el alto contenido de carbono orgánico presente en el agua residual porcina para utilizarlo como fuente de carbono exógeno en el agua residual que fungirá como medio de cultivo para el desarrollo del proceso heterotrófico microalgal. Esto permitirá determinar si el carbono orgánico presente en el agua residual porcina esta biodisponible para el crecimiento de las microalgas.

## 4. Justificación

La implementación de los cultivos de microalgas como tratamiento biológico para el agua residual contribuyen a la mejora del medio ambiente y a la producción de biomasa con potencial de ser aplicada para producir productos con valor agregado. Sin embargo, la mayoría de las investigaciones se han enfocado al desarrollo de cultivos fototróficos limitando la capacidad heterotrófica de las microalgas para sobrevivir en condiciones limitadas de luz y aprovechar el carbono orgánico disponible en el medio. Esta capacidad de crecer de forma heterotrófica de las microalgas puede ayudar en el tratamiento de otros efluentes que se caracterizan por su alto contenido de materia orgánica como el agua residual porcina. Las aguas residuales porcinas son dañinas para el medio ambiente debido a sus contaminantes tóxicos y su potencial de eutrofización por lo que es importante darle un tratamiento y reúso. Actualmente la información acerca de cultivos heterotróficos de microalgas con fuentes residuales de carbono orgánico es limitada (agua residual de la producción vinícola y melaza fermentada, glicerol residual y licor de concentrado) por lo que es importante el desarrollo de una investigación que integre el uso de agua residual porcina en la aplicación de los cultivos heterotróficos de tal manera que se de paso a futuras investigaciones en las que se utilice como medio de cultivo únicamente fuentes residuales como nutrientes para producir biomasa microalgal con el beneficio de darle tratamiento a estos efluentes residuales.

## 5. Objetivos

### Objetivo General

Desarrollar un proceso heterotrófico microalgal para producción de biomasa y tratamiento de agua residual a escala laboratorio.

### Objetivo Particulares

1. Determinar la concentración de carbono orgánico a utilizar, a partir de agua residual porcina, en el proceso heterotrófico microalgal en función del incremento de la biomasa medido como biomasa seca en g/L.
2. Determinar la remoción de carbono orgánico en el medio de cultivo para determinar su efecto sobre el incremento de la biomasa a través del balance de masa del carbono.
3. Determinar la mejor remoción de los nutrientes (nitrógeno amoniacal, nitratos, ortofosfatos, carbono total, demanda química y biológica de oxígeno) en la mezcla de agua residual urbana con agua residual porcina para evaluar el cultivo de microalgas como tratamiento biológico.
4. Evaluar el incremento de la concentración de la biomasa y la remoción de nutrientes bajo condiciones de oscuridad para determinar si es posible el desarrollo del proceso heterotrófico microalgal para producción de biomasa y tratamiento de agua residual.

## 6. Hipótesis

Es posible que el consorcio de microalgas sea capaz de consumir el carbono orgánico proveniente de la mezcla agua residual urbana con agua residual porcina, permitiendo el desarrollo de un proceso heterotrófico microalgal bajo condiciones no estériles en donde el incremento de la biomasa y la remoción de nutrientes sean comparables a los obtenidos con otras fuentes de carbono orgánico.

## 7. Metodología

El trabajo experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental (LIA) del Instituto de Ingeniería de la UNAM. La metodología de esta investigación se presenta de forma general en el siguiente diagrama (ver Figura 1).

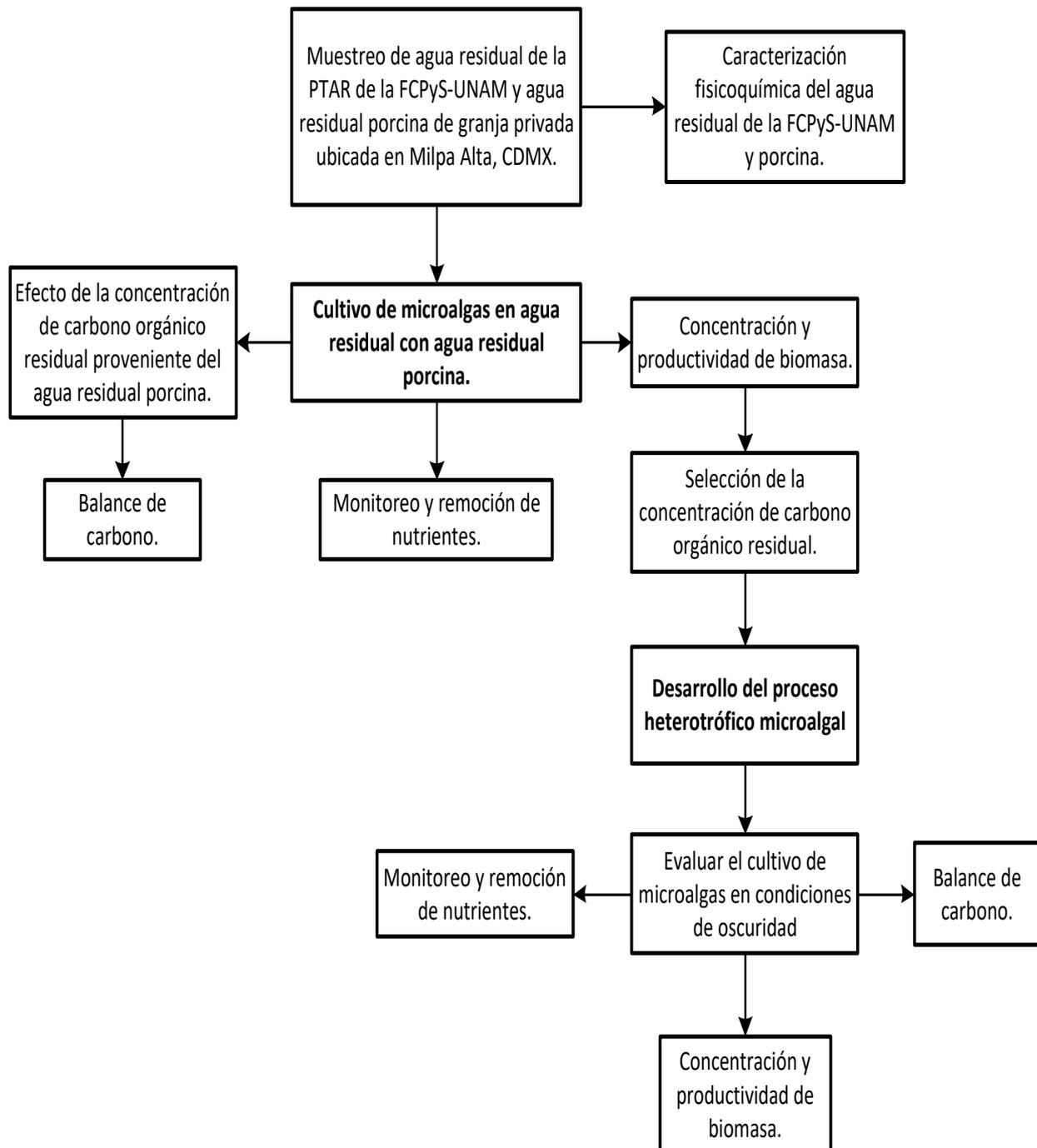


Figura 1. Diagrama de la metodología aplicada.

## 7.1 Agua residual y agua residual porcina

### **Agua residual**

El agua residual urbana se colectó del efluente secundario de la Planta de Tratamiento de Agua Residual de la Facultad de Ciencias Políticas y Sociales de la UNAM (PTAR FCPyS-UNAM), localizada en Ciudad Universitaria, Ciudad de México. Se tomaron 4 muestras puntuales durante los meses de agosto y febrero del 2019 y 2020 respectivamente. Las muestras fueron recolectadas en bidones de 20 L de polietileno y se almacenaron a la temperatura de 4°C.

La PTAR está integrada por un tratamiento primario y secundario. En general consiste en: un cárcamo de captación que cuenta con un arenoso, una rejilla de cribado grueso y una rejilla de cribado fino, después el agua cae a un tanque de igualación, posteriormente se alimenta a los reactores biológicos uno de tipo de lodos activados y un segundo reactor biológico aerobio de película fija; después el efluente se conduce hasta un sedimentador secundario de placas paralelas y finalmente es enviado al tanque de alimentación de un filtro de arena a presión.

Antes de utilizar el agua residual en los cultivos de microalgas se filtró por gravedad con relleno delcrón siliconizado (100% poliéster) en conos imhoff tres veces y después con papel filtro con un diámetro de poro de 8 µm con el objetivo de remover sólidos en suspensión.

### **Agua residual porcina**

El agua residual porcina cruda se colectó de una granja privada cuya actividad productiva corresponde a la engorda de cerdos, la granja se encuentra ubicada al Sur de la Ciudad de México en la Alcaldía de Milpa Alta y no cuenta con ningún sistema de tratamiento. La alimentación de los cerdos dentro de la granja consiste en una primera etapa con alimento de engorda y posteriormente residuos de embutidos. Se realizó un muestreo único y la toma de una muestra puntual durante el mes de julio de 2019. Se removieron los sólidos flotantes de la muestra con una coladera comercial. Después se filtró con relleno delcrón siliconizado (100% poliéster) en conos imhoff tres veces y finalmente con papel filtro con un diámetro poro de 8 µm para remover sólidos en suspensión. Finalmente se almacenó en bidones de 20 litros de polietileno a la temperatura de 4°C hasta su uso.

## 7.2 Determinación de parámetros fisicoquímicos

Para la caracterización fisicoquímica del agua residual y del agua residual porcina; así como el monitoreo de los cultivos de microalgas durante el periodo de cultivo se emplearon los parámetros fisicoquímicos y los Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales (APHA, 1992) que se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos.

<b>Parámetro</b>	<b>Método</b>
<b>pH</b>	Método electrométrico 4500 HB: medición con medidor de pH Orion Star A211(Thermo Scientific)
<b>Sólidos suspendidos totales, SST</b>	Método 2540 D: Gravimetría sólidos secados a 105°C
<b>Nitrógeno amoniacal</b>	Método titulométrico 4500 NH <sub>3</sub> E en la unidad de destilación BUCHI: Destilación con NaOH y después titulación con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0.02 N)
<b>Nitratos</b>	Método 8039 HACH: Colorimétrico. Medición en espectrofotómetro a 500 nm.
<b>Ortofosfatos</b>	Método 8178 HACH: Colorimétrico. Medición en espectrofotómetro a 530 nm.
<b>Demanda Química de Oxígeno, DQO.</b>	Método 5220 D: Colorimétrico, Reflujo cerrado (digestión por 2 h y después lectura en el espectrofotómetro a 600 nm).
<b>Carbono total, orgánico e inorgánico</b>	Método 5310 B: Medición de combustión-infrarrojo en Analizador de Carbono y Nitrógeno TOC-L <sub>CPH/CPN</sub> (Shimadzu).
<b>Demanda Bioquímica de Oxígeno, DBO<sub>5</sub></b>	Método 5210 D: Método Respirométrico con sistema OxiTop.

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

Para la determinación de nitrógeno amoniacal, nitratos, ortofosfatos, carbono demanda química y biológica de oxígeno las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm (1590 x g) durante 5 minutos y posteriormente filtradas con un filtro de tamaño de poro de a 8 µm y de 1.6 µm previamente. Sin embargo, para cuantificar la cantidad de carbono en el Analizador de Carbono y Nitrógeno TOC-L<sub>CPH/CPN</sub> fue necesario filtrar un volumen de 40 mL de cada muestra a través de una membrana de tamaño de poro de 0.45 µm.

En el Analizador de Carbono y Nitrógeno TOC-LCPH/CPN se generaron dos curvas de calibración una para medir el carbono total (CT) y otra para el carbono inorgánico (CI). La curva para carbono total se generó a partir de una solución madre de biftalato de potasio y la de carbono inorgánico a partir de una solución madre de carbonato y bicarbonato de sodio. Ambas curvas consideran el intervalo de 0 a 200 mg/L de carbono total y los coeficientes de correlación  $r^2$  para la curva de CT y CI fueron de 0.9974 y 0.9944 respectivamente.

La determinación del carbono orgánico total (COT) consiste en una oxidación catalítica a 720°C, como producto de la combustión se genera agua que se vaporiza y se elimina mediante una posterior condensación; otro producto de la combustión es el carbono (orgánico e inorgánico) que se oxida a CO<sub>2</sub> el cual es transportado por una corriente de aire y es cuantificado mediante un detector de infrarrojo no dispersivo y de esta forma se determina el CT presente en la muestra. El CI que se refiere a la concentración de dióxido de carbono disuelto, carbonatos y bicarbonatos, se obtiene al acidificar la muestra con ácido fosfórico, proceso en el que se forma CO<sub>2</sub> y el cual es medido por el detector de infrarrojo no dispersivo.

Una vez cuantificado el TC y el IC, el carbono orgánico total se obtiene por diferencia de las concentraciones obtenidas:

$$TOC = TC - IC \quad Ec. 4$$

### 7.3 Cultivo fototrófico de microalgas en agua residual

El consorcio de microalgas, con predominancia del género *Scenedesmus* sp., que se utilizó en este proyecto se obtuvo del Laboratorio de Ingeniería Ambiental, del Instituto de Ingeniería de la UNAM el cual ha sido adaptado en agua residual por el grupo de trabajo de la Dra. María Teresa Orta Ledesma.

Con el objetivo de reproducir el consorcio e incrementar la cantidad de biomasa microalgal necesaria para usar como inóculo en el desarrollo experimental, se instalaron cultivos a partir de éste consorcio de microalgas utilizando agua residual de la PTAR FCPyS-UNAM con una concentración de 30 %v/v de inóculo y agua residual con un volumen total de 7 L. Los cultivos fueron contenidos en bidones de

10 L de tereftalato de polietileno (PET) y expuestos a la temperatura y luz del medio ambiente, con agitación manual una vez por día.



Figura 2. Reproducción del consorcio microalgal en agua residual.

Posterior a esto, las microalgas a utilizar como inóculo se separaron del agua residual y se concentraron por centrifugación a 2500 rpm (1104 x g) durante 15 minutos. Después el sobrenadante se decantó y el concentrado se suspendió en medio de cultivo BG-11 antes de ser utilizado como inóculo para el desarrollo de los cultivos.

#### 7.4 Diseño de experimentos: definición de la concentración de carbono residual a utilizar en el proceso heterotrófico microalgal

Para el desarrollo de los cultivos se evaluaron dos concentraciones de carbono orgánico residual definidas a partir de la caracterización promedio de los nutrientes del agua residual y del agua residual porcina en particular considerando las concentraciones de carbono orgánico y nitrógeno amoniacal utilizadas en cultivos heterotróficos presentados por la literatura (Ramsundar *et al.*, 2017; Sheng *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2012). A partir de la caracterización fisicoquímica de las aguas residuales se determinaron los volúmenes necesarios a mezclar para tener las concentraciones definidas. Asimismo, para disminuir los sólidos suspendidos y la turbiedad de la mezcla de aguas residuales se centrifugó a 7000 rpm (8656 x g)

durante 5 minutos y se inoculó a partir del concentrado de biomasa microalgal previamente cultivado en agua residual.

### Diseño de experimentos

Para determinar la concentración de carbono orgánico residual, proveniente del agua residual porcina, a utilizar en el desarrollo del proceso heterotrófico microalgal se realizó un experimento unifactorial completamente al azar durante 21 días, donde el factor corresponde a la concentración de carbono orgánico residual en los cultivos. Este factor considera tres niveles que son *Concentración 1* y *Concentración 2* de carbono orgánico residual, proveniente de la mezcla del agua residual porcina y del agua residual, y el *Control 1* que corresponde al carbono orgánico residual presente únicamente en el agua residual; cada uno se realizó por triplicado.

Para el análisis de los resultados se consideró como variable de respuesta el incremento de la biomasa microalgal medido como Sólidos Suspendidos Totales, SST. Los resultados obtenidos se analizaron a través de un Análisis de Varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey para determinar la diferencia existente entre las medias de los tratamientos considerando un intervalo de confianza del 95% ( $\alpha=0.05$ ). La hipótesis nula es que todos los tratamientos son iguales y la alternativa es que alguno de los tratamientos es diferente.

Tabla 6. Condiciones de los cultivos (diseño de experimentos).

<b>Factor</b>	<b>Nivel</b>
Concentración de carbono orgánico (COT)	<b>Control 1:</b> 22.1±1.2 mg/L (agua residual urbana).
	<b>Concentración 1, C1:</b> 398.2±9.1 mg/L (agua residual urbana - agua residual porcina) <sup>a</sup> .
	<b>Concentración 2, C2:</b> 892 ±18.2 mg/L (agua residual urbana- agua residual porcina) <sup>b</sup> .

a: se diluyo 50 veces el agua residual porcina en agua residual.

b: se diluyo 25 veces el agua residual porcina en agua residual.

Los cultivos se instalaron en el invernadero del Edificio 5 del Instituto de Ingeniería de la UNAM dentro de un estante cubierto con papel aluminio. Se consideró como unidad experimental un bidón transparente de PET con un volumen de 4 L; y una concentración inicial de  $506 \pm 16.13$  mg/L de inóculo de microalgas. Los cultivos se colocaron dentro de un estante cubierto con papel aluminio durante 21 días y bajo un fotoperiodo inducido de 12:12 horas de luz: oscuridad, las horas de iluminación se aplicaron con lámparas LED de luz blanca con una intensidad de luz de  $77 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  (ver figura 4). La agitación fue manual una vez por día durante 5 minutos.

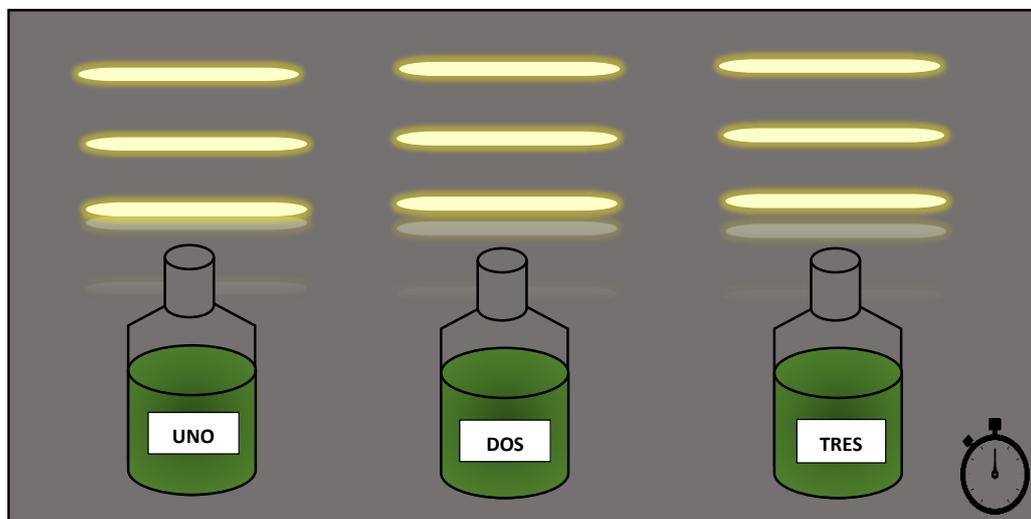


Figura 3. Esquema de instalación de los cultivos.



Figura 4. Fotografía de los cultivos dentro del estante.

## 7.5 Desarrollo del proceso heterotrófico microalgal

A partir de los resultados obtenidos respecto a las concentraciones evaluadas de carbono orgánico residual en los cultivos de microalgas se seleccionó el valor que proporcionó mayor concentración de biomasa y se evaluó en condiciones de oscuridad; considerando un segundo control que corresponde al cultivo de microalgas en agua residual. Los cultivos se instalaron en el invernadero del Edificio 5 del Instituto de Ingeniería de la UNAM dentro de un estante cubierto con aluminio durante 21 días. La unidad experimental fue un bidón transparente de polietileno con un volumen de 4 L; y una concentración inicial de  $506 \pm 16.13 \text{ mg/L}$  como inóculo de microalgas. Este inóculo se obtuvo a partir de concentrar la biomasa obtenida en los cultivos previos en agua residual y agua residual porcina. La agitación fue manual una vez por día durante 5 minutos.

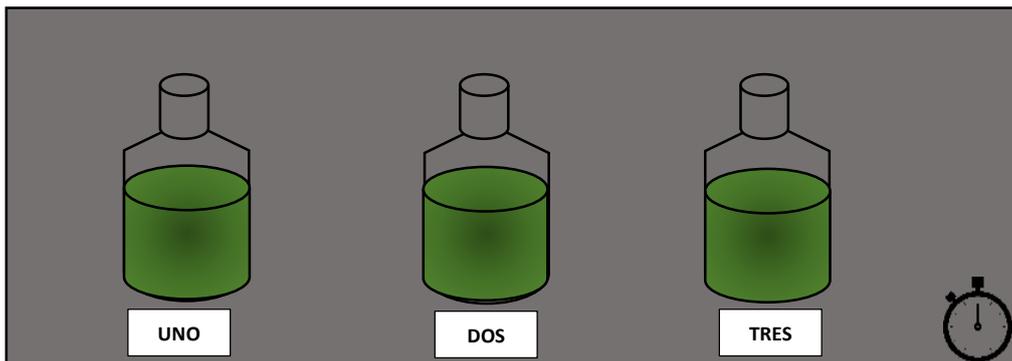


Figura 5. Esquema de instalación de los cultivos en condiciones de oscuridad.



Figura 6. Unidades experimentales empleadas en el cultivo bajo condiciones de oscuridad.

La concentración de la biomasa microalgal de los cultivos se midió por gravimetría como Sólidos Suspendedos Totales a 105°C. Las determinaciones se realizaron cada tercer día.

Así mismo, durante los 21 días de cultivo se monitoreo el comportamiento de los nutrientes para esto se tomó una muestra cada tercer día. De cada muestra primero se midió el pH y posterior a esto la muestra se centrifugo a 3000 rpm (1590 x g) durante 5 minutos y después se filtró con papel filtro de diámetro de poro igual a 8  $\mu\text{m}$  y finalmente con 1.6  $\mu\text{m}$  con el objetivo de determinar la cantidad de nutrientes removidos en el agua residual sin interferencias de sólidos durante su análisis.



Figura 7. Muestras tomadas para su caracterización fisicoquímica.

## 8. Resultados y análisis

### 8.1 Caracterización fisicoquímica del agua residual y del agua residual porcina

Se realizó la caracterización fisicoquímica del agua residual y del agua residual porcina utilizadas en este estudio. En la Tabla 7 se presenta el promedio y la desviación estándar para cada parámetro determinado de las cuatro muestras colectadas de agua residual urbana tratada y la muestra de agua residual porcina.

Tabla 7. Características fisicoquímicas de las aguas residuales.

Parámetro	Agua residual de la PTAR FCPyS-UNAM	Agua residual porcina
pH	8.2 ± 0.2	8.1 ± 0.2
SST (mg/L)	31.7 ± 16.5	23750.0 ± 70.7
DQO (mg/L)	97.4 ± 12.7	85600.0 ± 200
DBO <sub>5</sub> (mg/L)	43.3 ± 7.6	59500.0 ± 707
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	136.2 ± 28.2	5351.0 ± 215.5
Nitratos NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	9.7 ± 1.4	334.0 ± 83.7
Nitrógeno Total (mg/L)	145.9 ± 29.6	5685.0 ± 299.2
Ortofosfatos PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg/L)	62.4 ± 9.2	6608.0 ± 256.6
Carbono total, CT (mg/L)	186.7 ± 46.3	22305.0 ± 629.3
Carbono inorgánico, CI (mg/L)	157.5 ± 46.2	2234.0 ± 209.3
Carbono orgánico, COT (mg/L)	29.5 ± 10.1	20075.0 ± 833.0
N:P (molar)	5.1	1.9
C:N (molar)	1.5	4.5
DBO/DQO	0.4	0.7
DBO/COT	1.5	3

En general, la concentración de nutrientes para el agua residual porcina es alta; por ejemplo, en términos de demanda química de oxígeno (DQO) varía entre menos de 10000 mg/L a más de 100000 mg/L en caso extremos (Cheng *et al.*, 2020). En la Tabla 7 se observa que la DQO se encuentra dentro de este intervalo con un valor de 85600 mg/L el cual se compara con otros efluentes porcinos crudos como los reportado por Zhang *et al.*, (2011) que reporta un valor de DQO de 92800 mg/L para efluentes procedentes de Yongin, Corea. Ahn *et al.*, (2006) presento un valor de DQO

igual a 130800 mg/L procedente de Kyungbuk, Corea; y Kim *et al.* (2004) un valor de 90300 mg/L para un efluente diluido procedente de Saitama, Japón. En el caso específico de México Garzón-Zúñiga y Buelna (2014) realizaron muestreos puntuales de granjas porcinas y encontraron que para el caso del proceso productivo de engorda la concentración aumenta con el tamaño de la granja y el uso eficiente del agua. En el estudio reportaron los siguientes intervalos para la DQO: valores entre 3478 y 9300 mg/L para granjas chicas con hasta 2500 puercos, valores entre 19344 y 38544 mg/L para granjas medianas con 2500 a 7999 puercos y valores entre 34310 y 40498 mg/L para granjas grandes con 8000 o más puercos.

Respecto a la concentración de carbono total, la relación presente en cada agua residual es distinta; en el agua residual porcina la cantidad de carbono orgánico es superior a la cantidad de carbono inorgánico, pero en el agua residual la relación es opuesta ya que el carbono inorgánico es superior al orgánico. Esta diferencia se debe al origen de cada efluente que es el que le otorga esta composición, por ejemplo, en el agua residual porcina las excretas de los cerdos son uno de los componentes principales y esto le confiere un alto contenido de materia orgánica (García *et al.*, 2019; Nagarajan *et al.*, 2019). Además de que el agua residual es un efluente ya tratado por un tratamiento secundario.

Diversos estudios demuestran que los cultivos de microalgas son una alternativa eficiente para remover nitrógeno y fósforo del agua residual (Shi *et al.*, 2014; Sukacova *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2016; Sheng *et al.*, 2017).

En la Tabla 6 se presentan las relaciones molares carbono: nitrógeno C:N y nitrógeno: fósforo N:P para cada efluente. Las relaciones C:N y N:P de las aguas residuales son uno de los factores que podrían afectar significativamente la eficiencia de eliminación de nutrientes, la productividad de las microalgas y el dominio de las especies de microalgas presentes en el cultivo. Estas relaciones varían significativamente con el tipo de agua residual y normalmente se alejan de la relación molar C:N:P igual 106:16:1 observada para el fitoplancton para una producción óptima de biomasa (Redfield, 1934; Richmond, 2004; Richmond y Hu, 2013; Li *et al.*, 2019).

Las relaciones C:N determinadas para el agua residual y agua residual porcina son menores a la relación típica de las aguas residuales domésticas que es 7:1 (Park y Craggs, 2010). Sin embargo, la mezcla de estos dos tipos de aguas residuales puede lograr una relación de C:N equilibrada y así mejorar la productividad del cultivo, la remoción de nitrógeno, fósforo y la demanda química de oxígeno (Ma *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2018).

Respecto a la relación N:P para el agua residual su valor es igual a 5:1 el cual es mayor al valor esperado para aguas residuales que es de 4:1 o menor (Cai *et al.*, 2013). Sin embargo, el agua residual porcina presenta un valor inferior igual a 2:1 de N: P. Estudios demuestran que la remoción óptima de nitrógeno y fósforo dependen de estas relaciones, por ejemplo, Xin *et al.* (2010) mostraron que una relación N:P de 5:1–12:1 mejoró la eficiencia de eliminación de nitrógeno y fósforo a 83–99% y 99% respectivamente, por *Scenedesmus* sp.

En la Tabla 7 también se presentan las relaciones entre demanda química de oxígeno, demanda bioquímica de oxígeno y carbono orgánico determinadas para cada efluente. Si el valor de la relación DBO/DQO se encuentra en el intervalo de 0.3-0.8 y la DBO/COT entre 1.2-2 es factible tratar un efluente por métodos biológicos (Metcalf & Eddy, 2014). Los valores obtenidos de las relaciones DBO/DQO para ambos efluentes indican que pueden ser tratados fácilmente por medios biológicos en este caso a través del cultivo de microalgas.

## 8.2 Cultivo de microalgas en agua residual y porcina para definir la concentración de carbono residual a usar en el proceso heterotrófico microalgal

En la Tabla 8 se presenta la caracterización inicial de cada medio de cultivo utilizado para el experimento.

Tabla 8. Caracterización fisicoquímica inicial de los medios de cultivo.

Parámetro	Control 1 (Agua residual de la PTAR FCPyS-UNAM)	Concentración 1 (C1)	Concentración 2 (C2)
pH	8.4 ± 0.02	8.0 ± 0.05	8.1 ± 0.02
DQO (mg/L)	96.3 ± 3.8	975.0 ± 14.1	2295.0 ± 17.3
DBO <sub>5</sub> (mg/L)	35.0 ± 3.5	925.0 ± 35.4	1650.0 ± 70.7
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	155.9 ± 8.3	297.7 ± 6.6	386.0 ± 1.9
Nitratos NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	8.3 ± 2.2	5.7 ± 1.2	14.0 ± 1.0
Nitrógeno Total (mg/L)	164.1 ± 5.2	303.4 ± 7.7	402.0 ± 3.6
Ortofosfatos PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg/L)	57.8 ± 0.4	102.6 ± 2.9	148.8 ± 0.9
Carbono total, CT (mg/L)	236.2 ± 1.1	620.8 ± 10.7	1155.5 ± 14.8
Carbono inorgánico, CI (mg/L)	214.2 ± 2.3	222.8 ± 1.6	263.4 ± 3.3
Carbono orgánico, COT (mg/L)	22.1 ± 1.2	398.2 ± 9.1	892.2 ± 18.2
N:P (molar)	6.3	6.5	6.0
C:N (molar)	1.7	2.4	3.4

Al mezclar las aguas residuales para conformar el medio de cultivo con la Concentración 1 (COT: 398.2 ± 9.1 mg/L) y la Concentración 2 (COT: 892.2 ± 18.2 mg/L) las relaciones C:N y N:P se vieron afectadas debido a que el agua residual porcina no sólo permite incrementar el contenido de carbono orgánico sino también enriquece el medio con otros nutrientes como el nitrógeno y el fósforo (ver Tabla 8).

La mezcla permitió establecer una relación de N: P promedio de 6.3:1 para las tres condiciones Control 1, C1 y C2. Con respecto a la relación C:N para C1 y C2 disminuyó en comparación a la relación C:N del agua residual porcina sola (ver Tabla 7); sin embargo, mantienen un valor mayor al Control 1. Además de que el valor de esta relación C:N presenta una tendencia creciente al aumentar el volumen de agua residual porcina utilizada. Esto comprueba que mezclar aguas residuales diferentes

se contribuye al equilibrio de estas relaciones C:N y N:P y con ello se puede mejorar la productividad y remoción de nutrientes.

### 8.2.1 Incremento de la concentración de la biomasa microalgal

La concentración de la biomasa microalgal de los cultivos evaluados bajo condiciones de 12:12 h de luz y oscuridad se determinó cada tercer día durante los 21 días de cultivo establecidos para el experimento. La Figura 8 presentan las tres curvas de concentración de biomasa generadas (ver Figura 8).

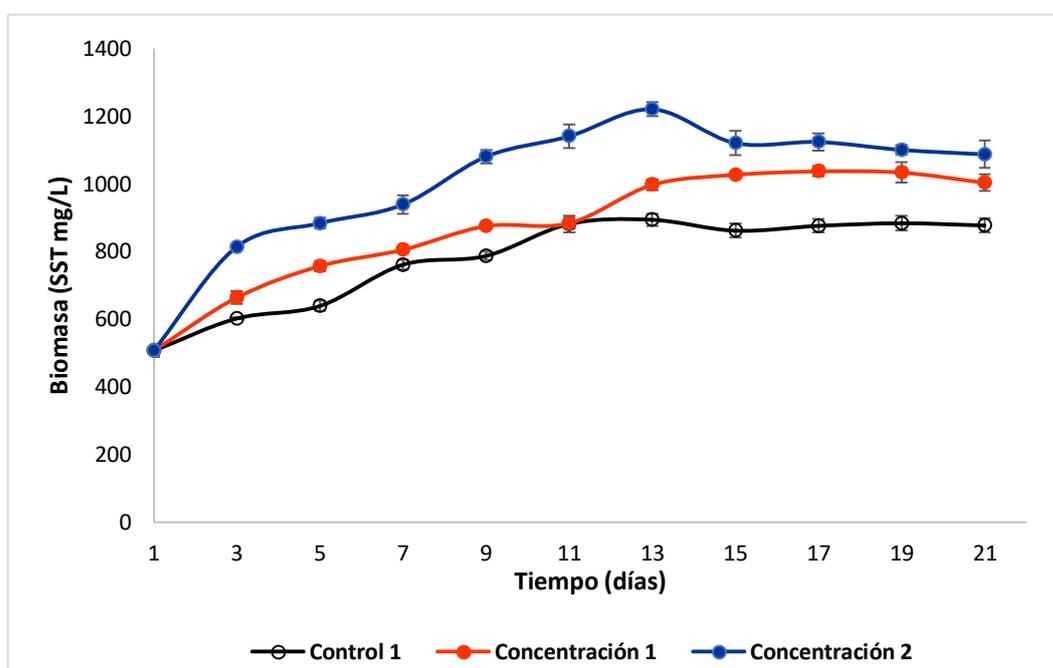


Figura 8. Contenido de biomasa en los cultivos de microalgas medido como SST (mg/L).

Los cultivos con la *Concentración 2* (COT:  $892.20 \pm 18.2$  mg/L) son los que presentan mayor contenido de biomasa en comparación a los de la *Concentración 1* (COT:  $398.2 \pm 9.1$  mg/L) y *Control 1* (COT:  $22.1 \pm 1.2$  mg/L). La curva generada para la *Concentración 1* indica que el punto en el que se obtuvo mayor contenido de biomasa fue en el día 17 con 1037 mg/L con una productividad de 0.03 g/Ld y para la *Concentración 2* fue en el día 13 con 1220 mg/L con una productividad de 0.06 g/Ld. Respecto al *Control 1* el mayor contenido de biomasa se obtuvo el día 13 con 894 mg/L con una productividad de 0.02 g/Ld. En general para las tres condiciones

de cultivo la concentración de biomasa y productividad disminuyó una vez que se alcanzó su valor más alto.

En la Tabla 9 se presenta la concentración y productividad final de biomasa microalgal obtenida a los 21 días de cultivo para cada condición *Control 1*, *Concentración 1* y *Concentración 2*:

Tabla 9. Concentración de biomasa y productividades obtenidas a los 21 días de cultivo.

<b>Cultivo</b>	<b>Concentración de biomasa (g/L)</b>	<b>Productividad (g/Ld)</b>
Control 1	0.88	0.019
Concentración 1	1.0	0.025
Concentración 2	1.1	0.029

Los valores de concentración de biomasa obtenidos se encuentran dentro los valores reportados en la literatura bajo condiciones de cultivo similares de luz y contenido de nutrientes. Por ejemplo, *Scenedesmus obliquus* fue cultivada en agua residual digerida y estéril con 289.9 mg/L de nitrógeno total donde se obtuvieron concentraciones de 0.8 a 1.6 g/L (Wang *et al.*, 2016). Así mismo, *S. obliquus* se cultivó en agua residual con una proporción del 7% de lixiviado no estéril con 150 mg/L de nitrógeno amoniacal con el cual se obtuvo de 1.2 g/L de biomasa (Hernández-García *et al.*, 2019). Del mismo, *Chlorella vulgaris* fue cultivada durante 12 días en agua residual porcina diluida con agua destilada con un contenido de nitrógeno amoniacal de 268 mg/L y la concentración de biomasa final fue de 1g/L (Ji *et al.*, 2013).

Así mismo se determinó la velocidad específica de crecimiento  $\mu$  para cada condición de cultivo y se obtuvo un valor de 0.041 d<sup>-1</sup>, 0.040 d<sup>-1</sup> y de 0.043 d<sup>-1</sup> para el Control 1, la Concentración 1 y la Concentración 2 respectivamente. Estos valores indican que la velocidad específica de crecimiento para las tres condiciones es prácticamente la misma independientemente de la concentración de carbono.

Para analizar los resultados de concentración de biomasa microalgal obtenidos se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) con un intervalo de confianza del 95% ( $\alpha=0.05$ ) con el que se obtuvo un valor de *p-value* de 0.015 que indico que efectivamente existen diferencias significativas entre los tratamientos. Por lo tanto,

se hizo una prueba de Tukey a las medias de los tratamientos con lo que se determinó que los cultivos con la *Concentración 2* fueron significativamente diferentes ( $p$ -value igual a 0.011) y además corresponden a los cultivos con mayor concentración y productividad de biomasa a los 21 días.

### 8.2.2 Balance de masa de carbono

Para determinar la cantidad de carbono presente en cada cultivo, así como su remoción se tomaron muestras cada tercer día. Con los resultados obtenidos se construyeron las curvas que representan el comportamiento del carbono medido como CT, CI y COT durante los 21 días de cultivo bajo condiciones de 12:12 h de luz y oscuridad.

La Figura 9 presenta las curvas de CT, CI y COT generadas para el *Control 1* con relación a la concentración de la biomasa microalgal generada (SST).

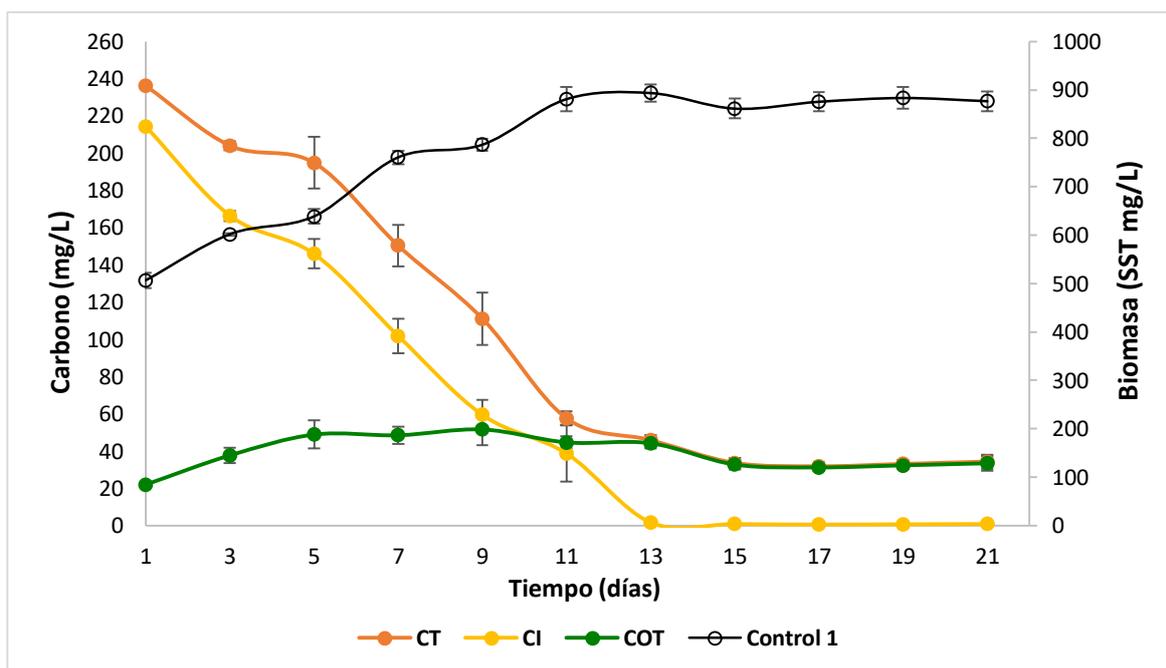


Figura 9. Curvas de carbono (CT, CI y COT) y SST para el cultivo Control 1.

La Figura 9 indica que el metabolismo predominante fue el fotosintético debido a que no hubo consumo de carbono orgánico. La cantidad inicial de CI fue mayor al orgánico y éste disminuyó rápidamente hasta el día 13 que es cuando se alcanzó el punto máximo de concentración de biomasa. Posterior a este día el CI presentó un

comportamiento constante, ya no hubo una disminución significativa en su concentración ni en la concentración de la biomasa microalgal del cultivo. Mientras que la curva generada para el COT presentó un ligero comportamiento ascendente el cual se mantuvo hasta el día 13 y después disminuyó manteniendo un comportamiento estable hasta el día 21; sin embargo, la concentración final fue superior a la inicial, esto confirma que no hubo remoción de COT por parte del consorcio microalgal.

En la Tabla 10 se presenta el balance de masa del carbono para el *Control 1*.

Tabla 10. Balance de masa de los cultivos *Control 1*.

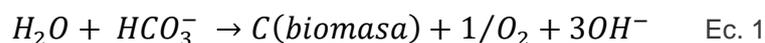
<b>CONTROL 1</b>	<b>Inicial (mg/L)</b>	<b>Final (mg/L)</b>	<b>% removido</b>
<b>Carbono Total, CT</b>	236.3	34.4	85.5
<b>Carbono orgánico, COT</b>	22.1	33.5	0.0
<b>Carbono inorgánico, CI</b>	214.2	0.9	99.6

De la concentración inicial del carbono total, el 90.6% corresponde a carbono inorgánico y sólo el 9.4% a carbono orgánico. El balance de masa indica que se removió el 85.5% CT, el cual corresponde únicamente a carbono inorgánico con el 99.6% removido respecto a su concentración inicial. Por otra parte, la concentración final de COT indica que no hubo remoción, pero si un incremento en su concentración.

El incremento en la concentración del COT puede ser por diferentes razones entre ellas debido a la lisis celular de algunas microalgas u otros microorganismos presentes en el agua residual como bacterias y protozoarios; otra razón puede ser debido a que las microalgas excretan carbohidratos y otros compuestos orgánicos complejos los cuales pueden actuar como inhibidores de crecimiento, especialmente como un medio para limitar la competencia entre otras especies y como defensa contra la depredación por otros microorganismos. Así mismo, otros estudios especulan que estos compuestos orgánicos excretados sirven como fuente de energía para las microalgas, especialmente de noche, después de la fotosíntesis; o para proporcionar nutrientes disponibles, por ejemplo, se sabe que las microalgas pueden excretar fosfatasas alcalinas, especialmente cuando el fósforo limita el

crecimiento, esto moviliza el fósforo orgánico absorbido y lo pone a disposición de las microalgas (García; 2014; Barsanti y Gualtieri, 2014; Richmond, 2004; Grobbelaar, 1983).

En resumen, la ecuación química que representa la remoción de carbono para el *Control 1* es la Ec. 1:



La Ec. 1 indica que, en los cultivos *Control 1*, el consorcio de microalgas tuvo preferencia hacia el consumo del carbono inorgánico empleando la autotrofia (Chojnacka y Marquez-Rocha, 2004; Kim *et al.* 2013).

La Figura 10 presentan las curvas de CT, CI y COT generadas para la *Concentración 1* con relación a la concentración de la biomasa microalgal generada (SST).

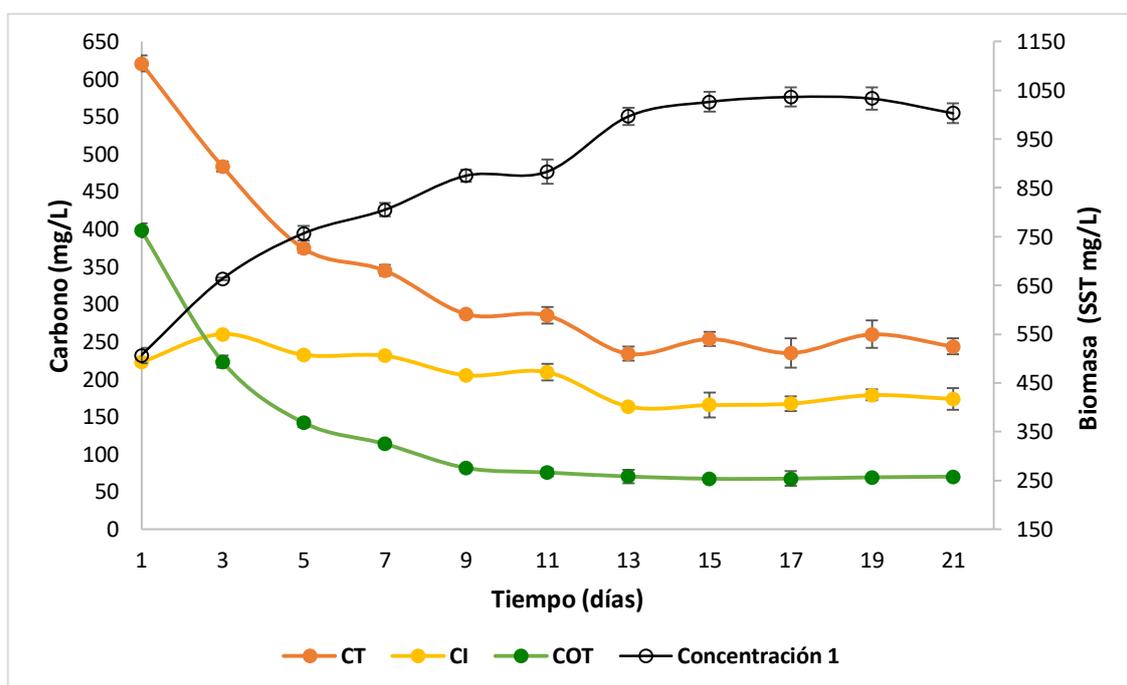


Figura 10. Gráfica de curvas de carbono y SST para el cultivo *Concentración 1*.

En los cultivos con la *Concentración 1* la cantidad de COT se encuentra en una proporción mayor a la del CI. Como se observa en la Figura 10, la concentración del COT disminuye desde del día uno de cultivo y después permanece constante a partir

del día 13, aunque es hasta el día 17 que se alcanza el punto con mayor concentración de biomasa con 1037 mg/L.

Respecto a la concentración de CI se observa un comportamiento oscilante con puntos de incremento y disminución, aunque finalmente la concentración es menor a la inicial, a los 21 días de cultivo. Es comportamiento indica que hay consumo y producción de CI.

El consumo del CI implica que las microalgas adquieren energía química a partir de reacciones fotosintéticas dependientes de la luz para absorber fotones y a través de una serie de reacciones bioquímicas generan oxígeno y energía (ATP); así como el agente reductor NADPH para posteriormente ser utilizados en las reacciones independientes de la luz donde se produce la fijación del CI (dióxido de carbono disuelto, carbonatos y bicarbonatos).

Mientras que el incremento en la concentración de CI es a causa del consumo de COT que genera como producto CO<sub>2</sub>. Se ha demostrado que las reacciones independientes de la luz se pueden desactivar si hay concentraciones adecuadas de sustratos de carbono orgánico en el medio de cultivo para la absorción celular. Bajo estas circunstancias, el ciclo de Calvin se bloquea, es decir, la fijación de carbono inorgánico se detiene y el organismo utiliza un mecanismo más eficiente en términos de energía para adquirir las fuentes de carbono orgánico suministradas de forma exógena (Stevenson *et al.*,1996; Perez-Garcia *et al.*, 2011).

En la Tabla 11 se presenta el balance de masa de carbono para los cultivos *Concentración 1*.

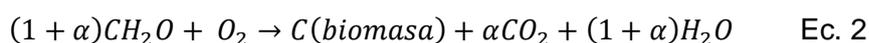
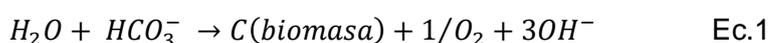
Tabla 11. Balance de masa de los cultivos *Concentración 1*.

CONCENTRACIÓN 1	Inicial (mg/L)	Final (mg/L)	% removido
<b>Carbono Total, CT</b>	620.8	243.8	60.7
<b>Carbono orgánico, COT</b>	398.2	70.0	82.4
<b>Carbono inorgánico, CI</b>	222.6	173.8	21.9

La concentración inicial de carbono total está compuesta por el 35.86% de carbono inorgánico y el 64.14% de carbono orgánico. El balance de masa indica que se removió el 60.7% del CT que corresponde a 377 mg/L consumidos de los cuales el 87.05% corresponde a COT y sólo el 12.95% a CI.

Así mismo, el balance de masa indica se removió el 82.4% de la concentración inicial del COT; mientras que de CI sólo se removió el 21.9% de su concentración inicial.

El consumo de COT y CI para los cultivos con la *Concentración 1* establece que el consorcio microalgal ha empleado los dos mecanismos de nutrición la autotrofia y la heterotrofia. Las siguientes ecuaciones químicas corresponden a los dos mecanismos presentes en la remoción de carbono en los cultivos con la *Concentración 1*:



Sin embargo, el balance de masa indica que el mecanismo que predomina en el cultivo es el consumo de carbono orgánico.

La Figura 11 presentan las curvas de CT, CI y COT generadas para la *Concentración 2* con relación a la concentración de la biomasa microalgal generada (SST).

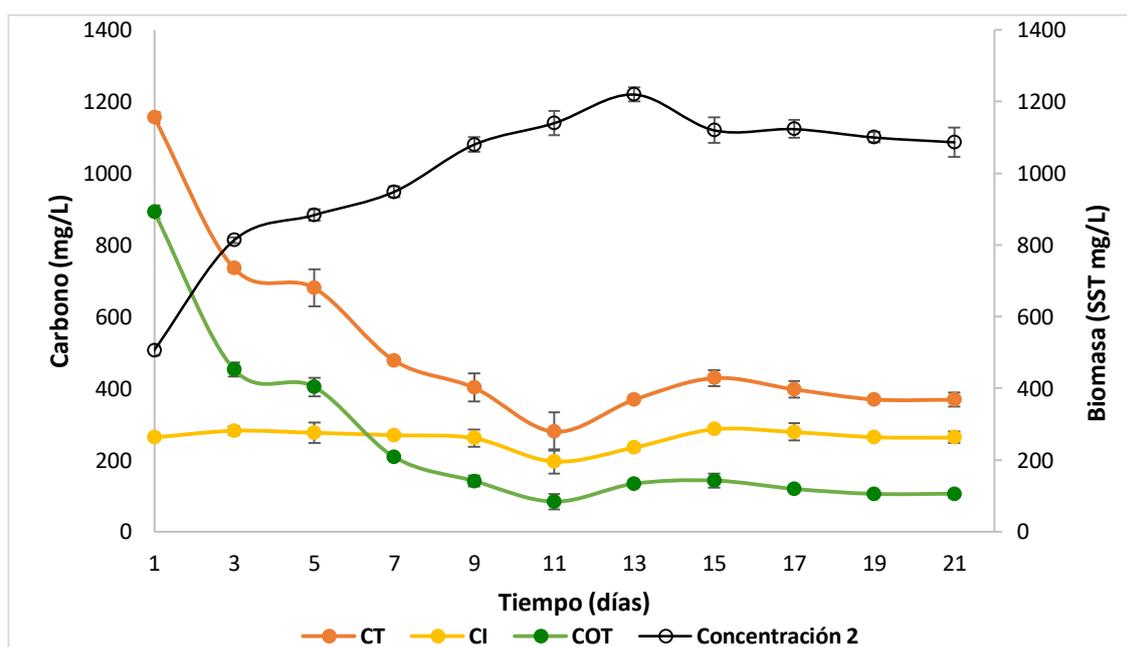


Figura 11. Gráfica de curvas de carbono y SST para el cultivo *Concentración 2*.

La Figura 11 indica que el carbono orgánico disminuye desde el primer día de cultivo hasta el día 11 donde se obtiene el punto más bajo de concentración, posteriormente se observan puntos de incremento, pero finalmente disminuye. Por otra parte, la curva de concentración de carbono inorgánico presenta puntos de incremento y disminución a lo largo del periodo de cultivo; sin embargo, la concentración final de IC no presenta una disminución significativa con respecto a su concentración inicial.

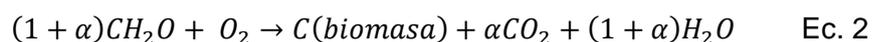
En la Tabla 12 se presenta el balance de masa de carbono para los cultivos *Concentración 2*.

Tabla 12. Balance de masa de los cultivos *Concentración 2*.

CONCENTRACIÓN 1	Inicial (mg/L)	Final (mg/L)	% removido
Carbono Total, CT	1155.6	368.4	68.1
Carbono orgánico, COT	892.2	105.5	88.2
Carbono inorgánico, CI	263.4	262.9	0.2

La concentración inicial de carbono total está compuesta por el 22.79% de carbono inorgánico y el 77.21% de carbono orgánico. El balance de masa indica que se removió el 68.1% del CT que corresponde a 787.23 mg/L consumidos de los cuales el 99.94% corresponde a COT y sólo el 0.5% a CI.

El balance de masa muestra que se removió el 88.2% de la concentración inicial de COT y sólo el 0.2% de la concentración inicial de CI. Este resultado indica que hubo preferencia hacia consumo de COT con respecto al CI predominando la heterotrofia en el cultivo (ver Ec. 2).



El consumo de COT fue superior a pesar de estar sometido a 12:12 luz y oscuridad, como se mencionó anteriormente las reacciones independientes de la luz se pueden desactivar si hay concentraciones adecuadas de carbono orgánico exógeno en el medio de cultivo, lo que propicia la asimilación de estos sustratos orgánicos para ser

utilizados como fuente de carbono y energía, y metabolizarse a través de la glucólisis (ciclo de Embden-Meyerhof-Parnas), el ciclo de Krebs (ciclo de ácidos carboxílicos) y el sistema de transporte de electrones para generar ATP (cadena respiratoria o fosforilación oxidativa).

En general, el balance de masa para los tres tratamientos *Control 1*, *Concentración 1* y *Concentración 2*, indica que el consorcio de microalgas va a consumir el sustrato orgánico, COT o IC, que se encuentre en mayor proporción en el medio de cultivo.

Así mismo, los resultados obtenidos en el balance de masa y la concentración de biomasa microalgal indican que la *Concentración 2* evaluada en los cultivos favorece el desarrollo de la heterotrofia del consorcio ya que bajo esta condición se obtuvo mayor biomasa microalgal y remoción de carbono orgánico.

### 8.2.3 Remoción de nutrientes

Se evaluaron los parámetros fisicoquímicos al inicio y al final del periodo de cultivo para determinar la remoción de nutrientes en las tres condiciones de cultivo *Control 1*, *Concentración 1* y *Concentración 2*. En la Tabla 13 se presentan los porcentajes de remoción obtenidos.

Tabla 13. Remoción de los nutrientes en los cultivos.

Parámetro (mg/L)	Control 1		Concentración 1		Concentración 2	
	Concentración inicial (mg/L)	% Remoción	Concentración inicial (mg/L)	% Remoción	Concentración inicial (mg/L)	% Remoción
DQO	96.3 ± 3.8	27.6%	975 ± 14.1	95.7%	2295 ± 17.3	97%
DBO <sub>5</sub>	35 ± 3.5	16%	925 ± 35.4	94.6%	1650 ± 70.7	97%
Nitrógeno amoniacal	155.9 ± 8.3	86.2%	297.7 ± 6.6	42%	386 ± 1.9	31%
Nitratos NO <sub>3</sub>	---	---	5.7 ± 1.2	32%	14 ± 1.0	70%
Ortofosfatos	57.8 ± 0.4	4.4%	102.6 ± 2.9	48.9%	148.8 ± 0.9	38.4%
Carbono total	236.2 ± 1.1	85.5%	620.8 ± 10.7	60.7%	1155.5 ± 14.8	68%

La remoción de la materia orgánica en el agua residual es medida a través de la demanda química y bioquímica de oxígeno; los porcentajes obtenidos para la remoción en el *Control 1* fueron del 27.6% y del 16% respectivamente, estos valores fueron inferiores a los porcentajes de remoción obtenidos en los cultivos con la *Concentración 1* y la *Concentración 2* los cuales fueron superiores al 90%. Esto comprueba que el aumento de la relación C:N no sólo permite incrementar la biomasa microalgal también contribuye en la remoción de nutrientes. Por ejemplo, Zheng et al. (2018) mezcló agua residual porcina con agua residual de cervecería para cultivar *Chlorella vulgaris* y logró una relación de C:N de 7.9, como condición óptima, con la que obtuvo una remoción de DQO del 93%.

Los porcentajes de remoción de DQO obtenidos en los cultivos con la *Concentración 1* y la *Concentración 2* se encuentran dentro de los valores reportados por la literatura para consorcios con presencia de *Scenedesmus* sp. por ejemplo Arango et al., (2016) obtuvieron una remoción para la DQO del 84% con un cultivo mixto de *Scenedesmus*, *Desmodesmus*, *Monoraphidium*, *Chlorella* en agua residual porcina y lodos activados; así mismo Gao et al., (2018) obtuvo remociones de DQO del

60-70% al cultivar a *Scenedesmus obliquus* en agua residual porcina diluida y previamente tratada por digestión anaerobia (DQO inicial de 800-2000mg/L).

A pesar de que el *Control 1* indica un porcentaje de remoción del 85.5% para el carbono total la cantidad removida en mg/L es inferior a la removida en los cultivos con la *Concentración 1* y *Concentración 2* como se observa en la Tabla 13.

Respecto a la remoción de nitrógeno amoniacal el mayor porcentaje de remoción se tiene en los cultivos *Control 1* con el 86.2%, sin embargo; no hubo remoción de nitratos esta condición indica que hubo procesos de nitrificación llevados a cabo por bacterias autótrofas nitrificantes que con vierten el amonio en nitritos y sucesivamente a nitratos, por lo que parte de la remoción de nitrógeno amoniacal puede deberse a estos procesos. En la Figura 12 se puede observar que la concentración de nitratos aumento significativamente a lo largo del periodo de cultivo como evidencia de los procesos de nitrificación sucedidos.

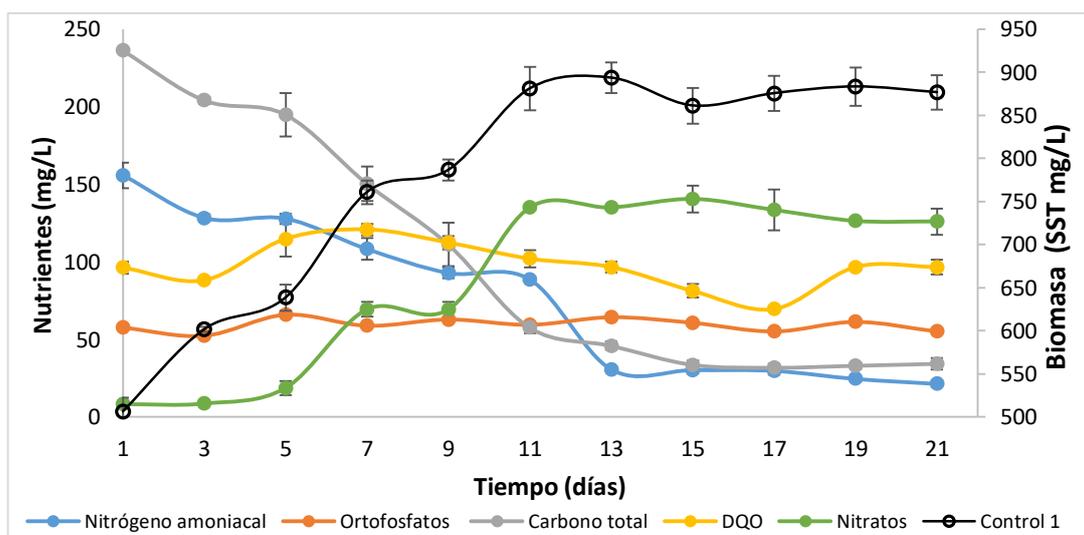


Figura 12. Monitoreo de los parámetros fisicoquímicos de los cultivos *Control 1*.

La remoción del nitrógeno amoniacal para los cultivos con la *Concentración 1* y *Concentración 2* fue del 42% y el 31% respectivamente. Sin embargo, en promedio la cantidad removida fue de 121.7 mg/L. Estos valores son comparables a los valores reportados en literatura por ejemplo en el cultivo de *Chlorella vulgaris* JSC-6 en agua residual porcina se obtuvieron remociones del 40% al 90% (Wang *et al.*, 2015).

La cantidad de nitrógeno amoniacal removido en los cultivos con la *Concentración 1* y *Concentración 2* se puede atribuir efectivamente al consorcio microalgal ya que no hubo procesos de nitrificación (ver Figura 13 y 14). La remoción de nitratos fue mayor en los cultivos con la *Concentración 2* con un 70% respecto a su concentración inicial; por su parte en los cultivos con la *Concentración 1* sólo se removió el 32%.

Debido a que las microalgas toman el fósforo como ortofosfato inorgánico, se determinó su remoción, para la *Concentración 1* y *Concentración 2* la remoción fue similar de 50.2 mg/L y 57.1 mg/L respectivamente; mientras que para el *Control 1* la remoción fue mínima de 2.5 mg/L.

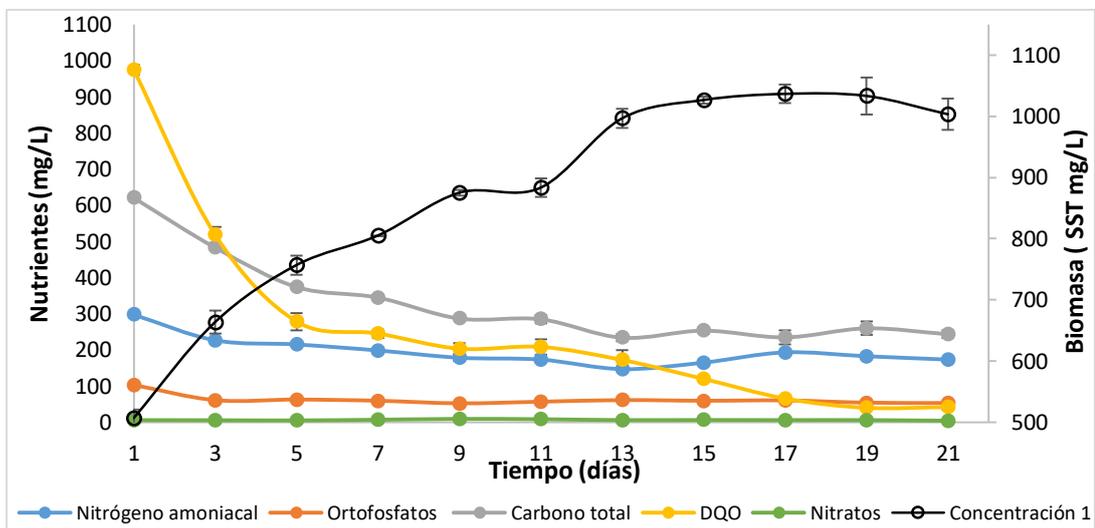


Figura 13. Monitoreo de los parámetros fisicoquímicos de los cultivos *Concentración 1*.

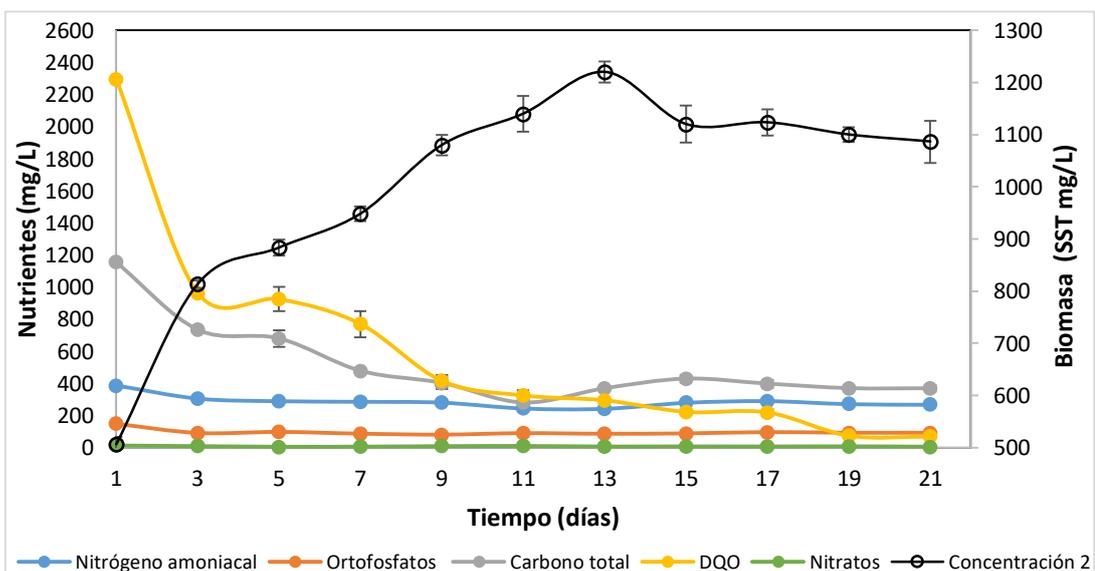


Figura 14. Monitoreo de los parámetros fisicoquímicos de los cultivos *Concentración 2*.

En general, en la Figura 13 y 14 se observa que durante la primera semana de cultivo la disminución de los nutrientes ocurrió con mayor rapidez mientras que la concentración de la biomasa microalgal continuó en ascenso. En específico la concentración de la DQO y el COT muestran una disminución mayor con respecto al nitrógeno amoniacal, nitratos y ortofosfatos. Después de este periodo de tiempo la concentración de los nutrientes disminuyó con menor rapidez mostrando un comportamiento estable hasta el día 21 de cultivo al igual que la concentración de la biomasa microalgal.

Así mismo, se generaron las curvas de pH obtenidas durante los 21 días de cultivo para cada tratamiento. En general, el pH se mantuvo en el intervalo de 8 a 9 con poca variación como se observa en la Figura 15.

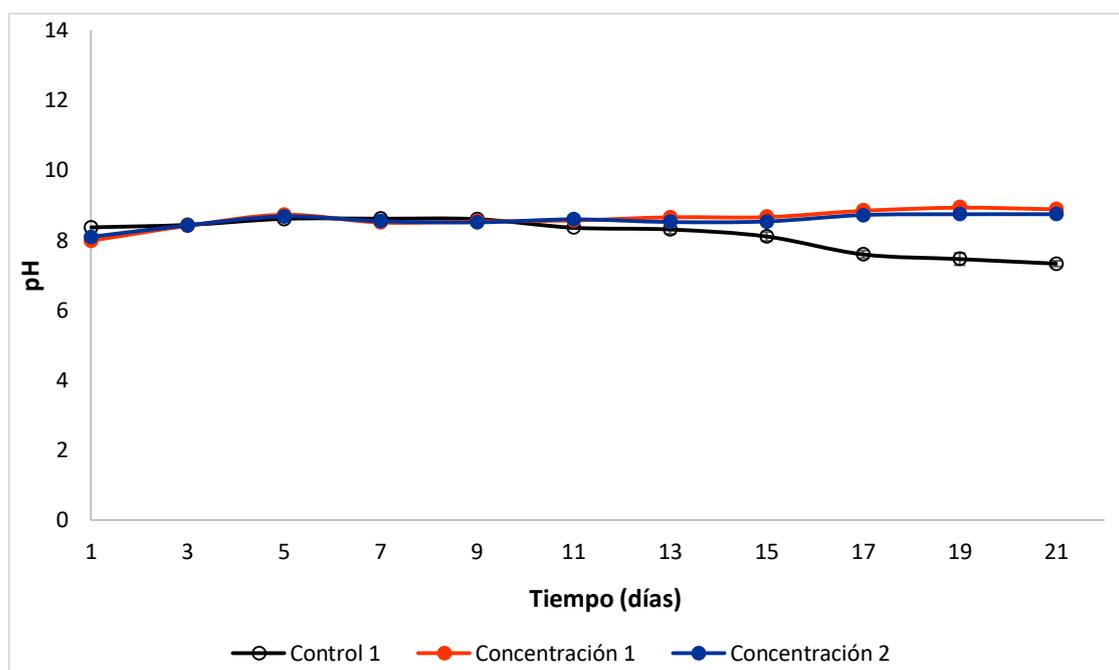
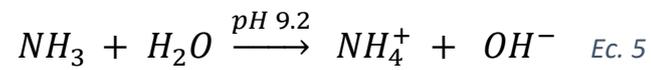


Figura 15. Monitoreo del pH durante el periodo de cultivo.

El comportamiento del pH para los tres tratamientos está dentro del rango que es de 7 y 9 para el cultivo de microalgas (Barsanti y Gualtieri, 2014). Así mismo este intervalo garantiza que la remoción del nitrógeno amoniacal se efectúe con éxito por el consorcio microalgal y no haya pérdidas de nitrógeno por volatilización.

Cuando se disuelve en agua, el amoníaco se puede convertir en ion amonio en una reacción reversible como se muestra en la Ec. 4 y ambas formas existen en equilibrio a un pH de 9.2 (Markou *et al.*, 2014).



La volatilización puede darse a pH superiores a 9.2 que es cuando el amoníaco libre es la forma dominante mientras que el amonio domina a valores de pH más bajos. En las aguas residuales porcinas, la prevalencia de cualquiera de estos iones está determinada por el pH del agua, la fuerza iónica y la temperatura (Nagarajan, *et al.*, 2019).

### 8.3 Desarrollo del proceso heterotrófico microalgal en oscuridad

A partir de los resultados de concentración de biomasa obtenidos de los cultivos de microalgas en agua residual porcina y agua residual evaluados a 12:12 horas de luz y oscuridad durante 21 días, se determinó que el proceso heterotrófico microalgal se desarrollará con la *Concentración 2* de carbono orgánico. Para alcanzar los valores de concentración de los nutrientes considerados para esta mezcla se consideró la caracterización promedio de ambos efluentes presentados en la Tabla 7 y los volúmenes utilizados previamente para obtener el medio de cultivo *Concentración 2*.

En la Tabla 14 se presenta la caracterización inicial para los medios de cultivo utilizados en el proceso heterotrófico microalgal:

Tabla 14. Caracterización fisicoquímica inicial de los medios de cultivo para en el proceso heterotrófico microalgal.

<b>Parámetro</b>	<b>Control 2</b> (Agua residual de la PTAR FCPyS-UNAM)	<b>Concentración 2</b>
pH	8.1 ± 0.04	8.1 ± 0.01
DQO (mg/L)	99.1 ± 5.1	2513.5 ± 21.3
DBO <sub>5</sub> (mg/L)	47.5 ± 2.5	1350.0 ± 35.4
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	112.0 ± 2.6	390.8 ± 6.0
Nitratos NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	10.7 ± 1.2	13.3 ± 1.2
Nitrógeno Total (mg/L)	122.7 ± 4.0	404.1 ± 6.8
Ortofosfatos PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg/L)	60.9 ± 0.8	152.9 ± 3.9
Carbono total, CT (mg/L)	136.2 ± 3.1	1189.5 ± 10.5
Carbono inorgánico, CI (mg/L)	116.7 ± 0.6	176.3 ± 7.4
Carbono orgánico, COT (mg/L)	19.5 ± 2.5	1013.0 ± 10.0
N:P (molar)	4.5	5.8
C:N (molar)	1.3	3.4

Así mismo, para realizar esta parte experimental se consideró un nuevo lote de agua residual urbana de la PTAR de la FCPyS-UNAM. El objetivo fue mantener las mismas condiciones experimentales, pero sin adicionar nutrientes, que permitan el desarrollo de un proceso que utilice únicamente fuentes residuales de nutrientes es por ello que en la Tabla 14 se observa que hay cambios en las concentraciones de los nutrientes, esto debido a que las aguas residuales presentan variaciones en su concentración con el tiempo. Sin embargo, estos valores se encuentran dentro del promedio con respecto a la primera parte experimental (ver Tabla 8 y 14).

### 8.3.1 Concentración de biomasa microalgal obtenida mediante el proceso heterotrófico

La concentración de la biomasa microalgal de los cultivos, *Control 2* y *Concentración 2* se determinó cada tercer día, en la Figura 16 se presentan las curvas generadas para el proceso heterotrófico microalgal.

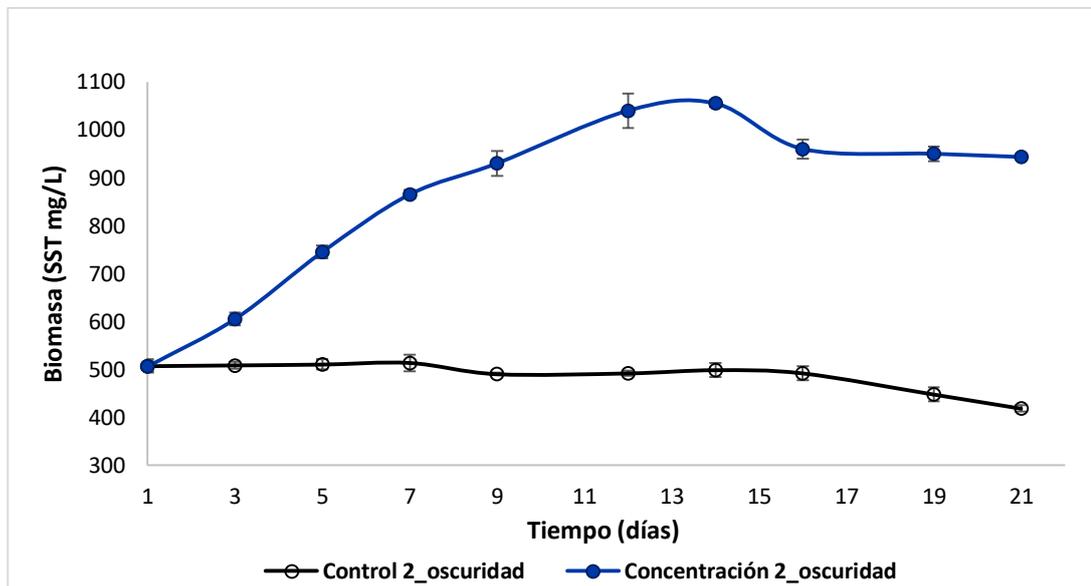


Figura 16. Contenido de biomasa en los cultivos de microalgas bajo condiciones de oscuridad.

La Figura 16 muestra que los cultivos *Control 2* no presentan un incremento en la concentración de la biomasa microalgal. Debido a esto no fue posible determinar una velocidad de crecimiento específico, sin embargo, para los cultivos con la

Concentración 2 el valor obtenido fue de 0.057 d<sup>-1</sup>. Así mismo, la curva generada para los cultivos con la *Concentración 2* indican que el punto máximo de concentración de biomasa se alcanzó en el día 14 con 1.1 g/L y una productividad de 0.05 g/Ld. Éste valor de concentración de biomasa alcanzado puede compararse con concentraciones obtenidas al cultivar heterotróficamente microalgas en efluentes residuales como Ren *et al.*, (2018) quien utilizó agua residual de melaza fermentada de tipo butirato para cultivar a *Scenedesmus* sp. y obtuvo 1.01 g/L de biomasa y Shen *et al.*, (2017) que aisló y cultivo a *Scenedesmus* sp. NJD-2 en licor de mezclado estéril obteniendo una concentración de 1.19 g/L de biomasa.

Como se observa en la Figura 16 después del día 14 la concentración de biomasa comenzó a disminuir. En la Tabla 15 se presenta la concentración y productividad final de biomasa microalgal obtenidas al día 21 para cada condición.

Tabla 15. Concentración de biomasa y productividad de los cultivos a los 21 días bajo condiciones de oscuridad.

Cultivo	Concentración de biomasa (g/L)	Productividad (g/Ld)
Control 2	0.42	---
Concentración 2	0.94	0.022

El *Control 2* no presenta incremento en la concentración ni productividad de la biomasa microalgal bajo condiciones de oscuridad; por su parte en los cultivos con la *Concentración 2* se obtuvo una concentración de biomasa microalgal que puede ser comparada con concentraciones obtenidas en cultivos de microalgas heterotróficos de *Scenedesmus* sp. con adición de fuentes de carbono exógeno, por ejemplo, Di Caprio *et al.*, (2019) obtuvo una concentración de biomasa de 1.1 g/L al cultivar a *Scenedesmus obliquus* en medio de cultivo BG-11 con adición de 5 g/L de glucosa; así mismo Walls *et al.*, (2019) cultivó a *S. obliquus* en agua residual no estéril con la adición de 10 g/L de glucosa y obtuvo 0.98 g/L de biomasa y Ramsundar *et al.*, (2017) cultivo a *Chlorella sorokiniana* empleando un concentrado de digestión anaerobia estéril con 5 g/L de glucosa con el cual obtuvo una concentración de biomasa menor, igual a 0.610 g/L, a pesar de la adición de glucosa.

Así mismo, se han obtenido concentraciones de biomasa microalgal superiores por ejemplo *Chlorella vulgaris* se cultivó heterotróficamente en agua residual porcina diluida con agua destilada con valores de DQO de 3665, 1864 y 1064 mg/L y se obtuvieron 2.35, 1.98 y 1.49 mg/L de biomasa respectivamente (Wang *et al.*, 2015). Sin embargo, diluir agua porcina en un efluente limpio no tiene un impacto positivo al medio ambiente.

### 8.3.2 Balance de carbono

Para determinar la cantidad de carbono removido en el proceso heterotrófico se tomaron muestras y se construyeron las curvas de carbono total, inorgánico y orgánico para describir su comportamiento durante los 21 días de cultivo.

La Figura 17 presenta las curvas de CT, CI y COT generadas para el *Control 2* con relación a la concentración de la biomasa microalgal generada (SST).

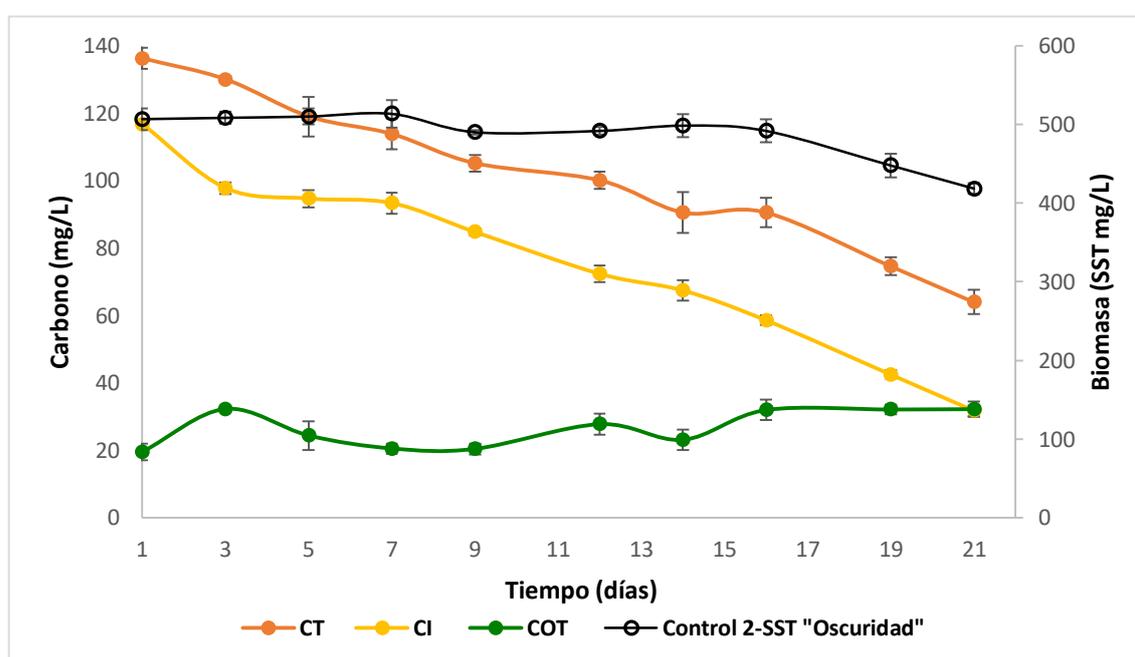


Figura 17. Curvas de carbono y SST para el cultivo *Control 2* bajo condiciones de oscuridad.

En la Figura 17 se observa que en el *Control 2* la cantidad de CI y COT mantiene la misma relación que el *Control 1* donde la concentración para el CI es mayor respecto al COT.

La concentración de CI disminuye desde el primer día y continúa hasta el día 21, sin embargo, no se observa incremento en la concentración de su biomasa. Por otra parte, la curva de COT presenta un comportamiento oscilante con incrementos y disminuciones a lo largo de todo el periodo de cultivo donde la concentración final resultó ser mayor a la inicial.

En la Tabla 16 se presenta el balance de masa del carbono para el *Control 2* evaluado bajo condiciones de oscuridad.

Tabla 16. Balance de masa de los cultivos *Control 2* bajo condiciones de oscuridad.

<b>CONTROL 1</b>	<b>Inicial (mg/L)</b>	<b>Final (mg/L)</b>	<b>% removido</b>
<b>Carbono Total, CT</b>	136.2	63.9	53.1
<b>Carbono orgánico, COT</b>	19.5	32.2	0.0
<b>Carbono inorgánico, CI</b>	116.7	31.7	72.8

De la concentración inicial del carbono total, el 85.68% corresponde a carbono inorgánico y sólo el 14.32% a carbono orgánico. El balance de masa indica que se removió el 53% del CT, el cual corresponde únicamente a carbono inorgánico con el 72.8% removido respecto a su concentración inicial.

Sin embargo, al no haber incremento en la concentración de la biomasa, el consumo del CI probablemente se debe a la presencia de bacterias las cuales pueden obtener energía mediante la oxidación de compuestos inorgánicos y para utilizar el CO<sub>2</sub> como fuente de carbono (quimioautotrofia o quimiolitotrofia). Por ejemplo, pudo ocurrir desnitrificación autótrofa debido a la presencia de compuestos con azufre, a la deficiencia de materia orgánica y de oxígeno en el medio de cultivo (Castillo-Bravo *et al.*, 2017). La deficiencia del oxígeno disuelto pudo presentarse debido a una agitación insuficiente durante el cultivo. La desnitrificación autótrofa consiste en la reducción de óxidos de nitrógeno (NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) a N<sub>2</sub> gaseoso, utilizando compuestos reducidos de azufre como dadores de electrones (H<sub>2</sub>S, S<sup>0</sup> y S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>) y nitrato como aceptor de electrones donde el producto final es el sulfato.

Por otra parte, la concentración final de COT indica que no hubo remoción, pero si un incremento en su concentración. El incremento en la concentración del COT

puede ser por diferentes causas como se discutió anteriormente, sin embargo, al no haber incremento de la biomasa microalgal probablemente la principal causa del aumento en la concentración de COT es debido a la lisis celular de algunas microalgas u otros microorganismos presentes en el agua residual como bacterias y protozoarios; además de los compuestos orgánicos excretados por las microalgas. Se sabe que las microalgas, al estar sometidas a la oscuridad durante largos periodos de tiempo, mueren después de usar sus productos de reserva o se vuelven metabólicamente inactivas hasta que las condiciones ambientales son adecuadas (Stevenson *et al.*, 1996; Chojnacka y Marquez-Rocha, 2004).

La Figura 18 presentan las curvas de CT, CI y COT generadas para la *Concentración 2* con relación a la concentración de la biomasa microalgal generada (SST).

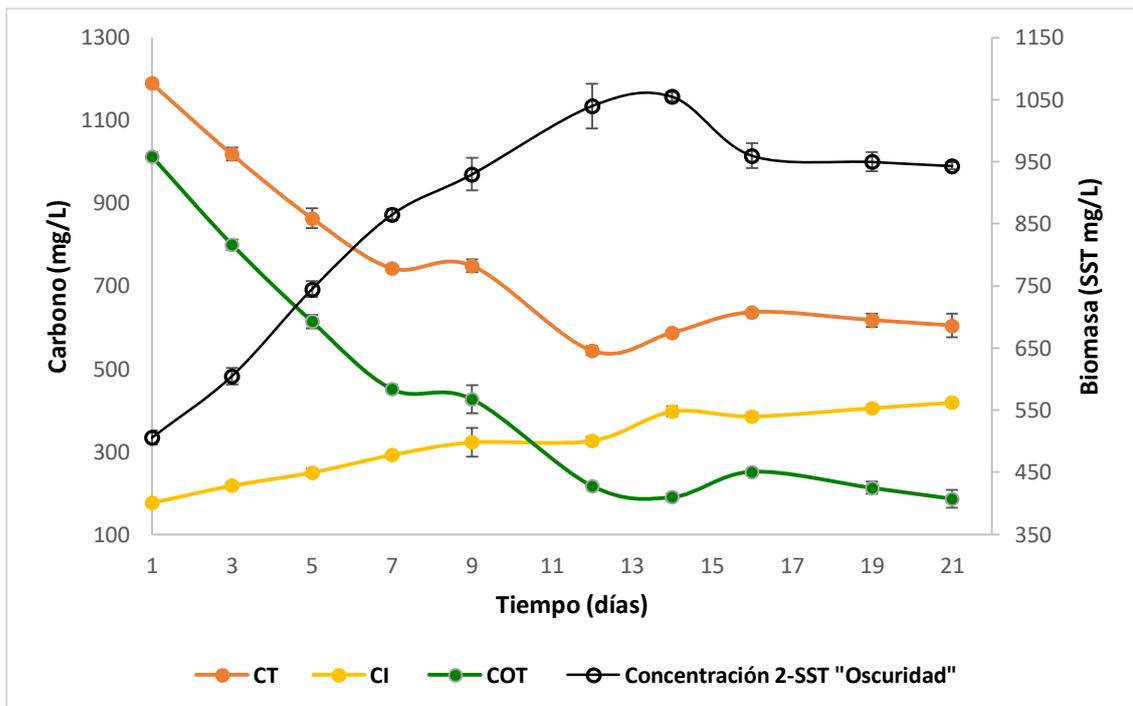
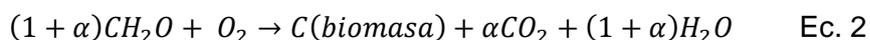


Figura 18. Curvas de carbono y SST para el cultivo *Concentración 2* bajo condiciones de oscuridad.

En la Figura 18 se observa que la concentración de carbono orgánico disminuye desde el primer día de cultivo; mientras que el carbono inorgánico incrementa a lo largo del periodo de cultivo. Este comportamiento indica que el proceso que domina es la respiración celular, el cual se refiere a la degradación completa de la materia orgánica a través del consumo de oxígeno y la producción de  $\text{CO}_2$ ; así como el

incremento en la biomasa (Perez-Garcia *et al.*, 2011; Kim *et al.* 2013; Boyle y Morgan, 2019):



En modo heterotrófico, el carbono orgánico adquirido por las microalgas se cataboliza o degrada, de forma similar a las bacterias es por ello que la disminución de la materia orgánica bajo condiciones heterotróficas en agua residual también puede deberse a la presencia de éstas.

En la Tabla 17 se presenta el balance de masa del carbono para la Concentración 2 evaluado bajo condiciones de oscuridad.

Tabla 17. Balance de masa para *Concentración 2* bajo condiciones de oscuridad.

<b>CONTROL 1</b>	<b>Inicial (mg/L)</b>	<b>Final (mg/L)</b>	<b>% removido</b>
<b>Carbono Total, CT</b>	1189.3	604.6	49.2
<b>Carbono orgánico, COT</b>	1013.0	185.9	81.6
<b>Carbono inorgánico, CI</b>	176.3	418.7	0.0

La concentración inicial de carbono total está compuesta por el 14.82% de carbono inorgánico y el 85.18% de carbono orgánico. El balance de masa indica que se removió el 49.2% del CT que corresponde a 584.7 mg/L consumidos de los cuales el 100% corresponde a COT.

Así mismo, el balance de masa indica se removió el 81.6% de la concentración inicial del COT; mientras que de CI no se removió. Hubo incremento de CI de 242.4 mg/L debido al proceso de respiración celular.

En general, los resultados obtenidos en el balance de masa y la concentración de biomasa microalgal generada indican que la *Concentración 2* evaluada bajo condiciones de oscuridad favorece el desarrollo de la heterotrofia del consorcio a través de la remoción de carbono orgánico presente en el medio de cultivo, además

del incremento de su biomasa. Así mismo, la cantidad de COT removido en los cultivos con la *Concentración 2* evaluados bajo condiciones de oscuridad fue de 827 mg/L esta cantidad fue superior a la removida bajo condiciones de 12:12 luz y oscuridad que fue de 786.7 mg/L.

Sin embargo, la remoción de COT y la concentración de la biomasa microalgal pudo estar limitada por el suministro de oxígeno ya que la agitación fue manual. Debido a que la tasa de respiración de cualquier sustrato orgánico está íntimamente relacionada con el crecimiento y la división celular es por ello que las tasas de crecimiento mejoran con niveles más altos de aireación (Hu *et al.*, 2018; Perez-Garcia, 2011).

### 8.3.3 Remoción de nutrientes

Se evaluaron los parámetros fisicoquímicos al inicio y al final del periodo de cultivo para determinar la remoción de nutrientes en el *Control 2* y la *Concentración 2* evaluados bajo condiciones de oscuridad. En la Tabla 18 se presentan los porcentajes de remoción obtenidos.

Tabla 18. Remoción de nutrientes bajo condiciones de oscuridad.

Parámetro (mg/L)	Control 2		Concentración 2	
	Concentración inicial (mg/L)	% Remoción	Concentración inicial (mg/L)	% Remoción
DQO	99.1 ± 5.1	3.7%	2513.5 ± 21.3	83.7%
DBO <sub>5</sub>	47.5 ± 2.5	7.2%	1350.0 ± 35.4	85.1%
Nitrógeno amoniacal	112.0 ± 2.6	56.7%	390.8 ± 6.0	23%
Nitratos NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	---	---	13.3 ± 1.2	75%
Ortofosfatos	---	---	152.9 ± 3.9	11.2%
Carbono total	136.2 ± 3.1	53.1%	1189.5 ± 10.5	49.2%

El porcentaje de remoción de la materia orgánica en el agua residual medida como DQO y DBO<sub>5</sub> en cultivos *Control 2* fueron bajos del 3.7% y 7.2% respectivamente. Estos valores fueron inferiores a los obtenidos en la mezcla de agua residual y agua residual porcina con la *Concentración 2* donde los porcentajes de remoción fueron del 83.7% y 85.1% para la DQO y la DBO<sub>5</sub> respectivamente.

El carbono total fue removido en un 53.1% en el *Control 2* este valor hace referencia a la disminución de la concentración de CI a diferencia de los cultivos con la *Concentración 2* donde el 49.2% corresponde a la remoción de COT como se discutió en el balance de masa de carbono. A pesar de que el porcentaje de CT removido en el *Control 2* es mayor respecto a la *Concentración 2*, la cantidad de carbono removida fue menor como se observa en la Tabla 18.

Respecto a la remoción de nitrógeno amoniacal el mayor porcentaje de remoción se tiene en los cultivos *Control 2* con el 56.7%, sin embargo, parte de esta remoción puede deberse a procesos de nitrificación llevados a cabo por bacterias debido a que hubo un incremento en la concentración de nitratos (ver Figura 19); además de que la disminución del nitrógeno amoniacal por volatilización está descartada debido a que el pH se mantuvo entre 7 y 8.

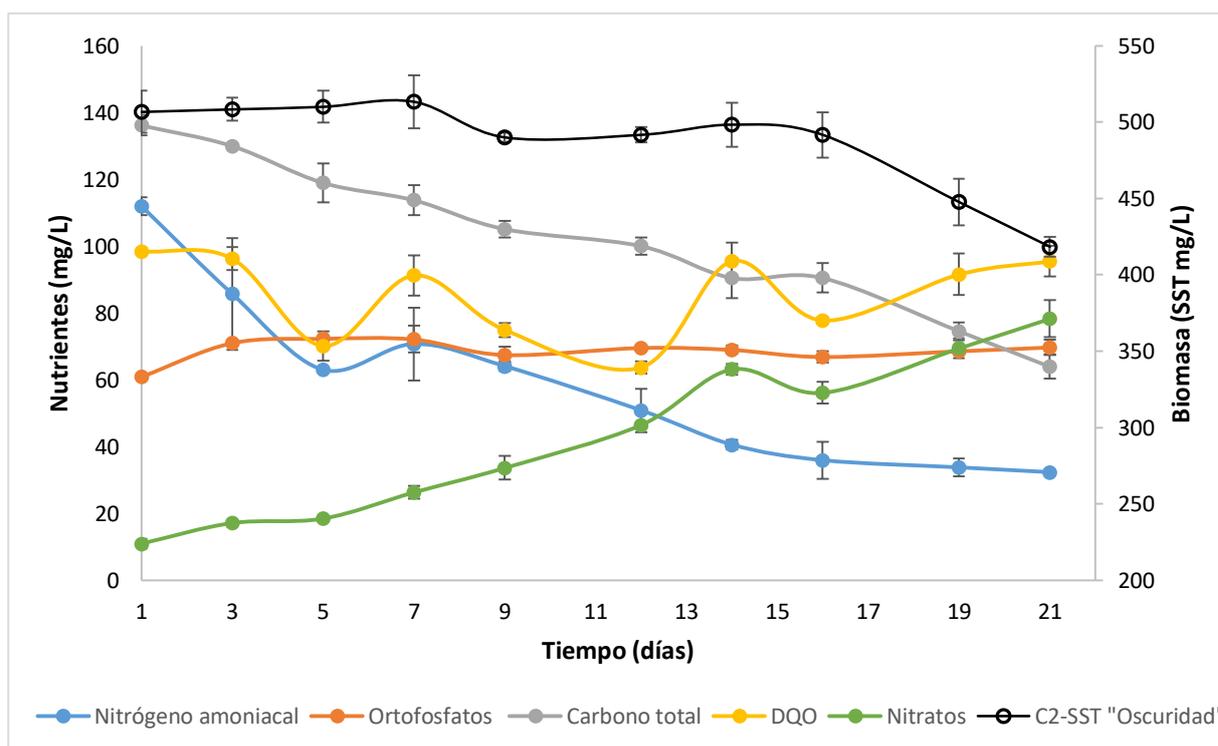


Figura 19. Monitoreo de los parámetros fisicoquímicos de los cultivos *Control 2* bajo condiciones de oscuridad.

Así mismo, en la Figura 19 se puede observar que no hubo remoción en la concentración de ortofosfatos. La no remoción de nitrógeno y fósforo, así como la disminución de la biomasa para el *Control 2* indican que efectivamente no hubo

asimilación de estos nutrientes por parte del consorcio microalgal bajo condiciones de oscuridad.

Sin embargo, en los cultivos con la *Concentración 2* se puede observar que el incremento de la biomasa microalgal se presenta en relación a la remoción de nutrientes (ver Figura 20). En general, el mayor porcentaje de remoción de los nutrientes se presenta del día 1 al día 14 que corresponde al día en el que se obtuvo mayor concentración de biomasa. Después de este periodo de tiempo los nutrientes disminuyeron con menor rapidez.

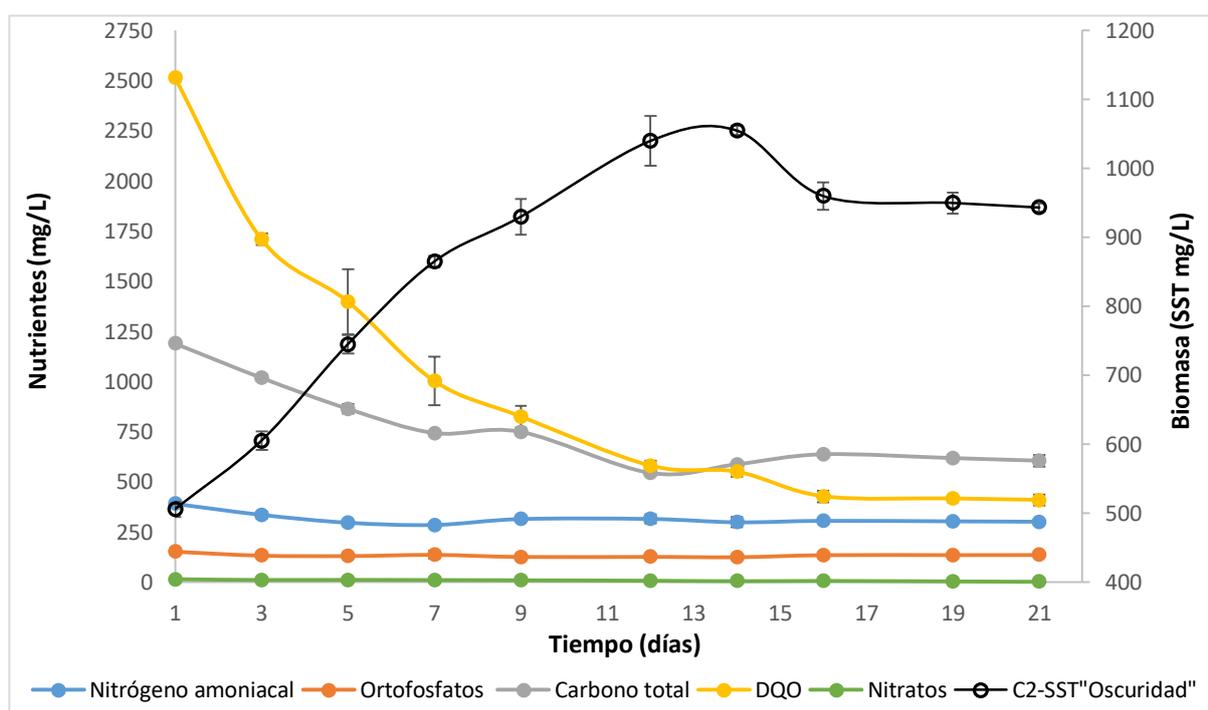


Figura 20. Monitoreo de los parámetros fisicoquímicos para los cultivos con la *Concentración 2* bajo condiciones de oscuridad.

En los cultivos con la *Concentración 2* no hubo incremento en la concentración de nitratos lo que indica que no se llevaron a cabo procesos de nitrificación y que la remoción de nitrógeno amoniacal fue realizada por la biomasa. Así mismo, la remoción del fósforo se atribuye a la biomasa debido a que durante el periodo de cultivo se mantuvieron condiciones de pH menores a 9, por lo que no pudo haber eliminación de fósforo por procesos abióticos que promovieran la sedimentación de los iones fosfato debido a la presencia de iones carbonato.

Para comparar los valores obtenidos de remoción en este proceso heterotrófico microalgal, en la Tabla 19 se presentan porcentajes de remoción alcanzados en otros estudios:

Tabla 19. Cultivos heterotróficos de microalgas para el tratamiento de aguas residuales.

Especie	Tipo de agua residual	Fuente de COT	Concentración inicial	%Remoción	Concentración de biomasa (g/L)	Tiempo (días)	Ref.
<i>Consorcio microalgal con predominancia de Scenedesmus sp.</i>	Agua residual no estéril	Agua residual porcina no estéril: ~4 %v/v	COT: 1013.0 ± 10.0 mg/L DQO: 2513.5 ± 21.3 mg/L N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 390.8 ± 6.0 mg/L N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> : 13.3 ± 1.2 mg/L P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> : 152.9 ± 3.9 mg/L	COT: 81.6 DQO: 83.7% N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 23% N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> : 75% P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> : 11.2%	1.1 g/L	14	En este estudio
<i>S. obliquus</i>	Agua residual municipal no estéril	Glucosa: 10 g/L	DQO: 95.0 ± 24.7 mg/L N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 133.1 ± 13.9 mg/L N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> : 15.0 ± 4.9 mg/L P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> : 67.5 ± 19.5 mg/L	DQO: --- N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 53% N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> : 60 % P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> : 46%	0.98 g/L	6	Walls <i>et al.</i> 2019
<i>T. obliquus</i>	Agua residual sintética (medio BG-11 con adición de antibióticos)	Glucosa: 5 g/L	NT: 45 mg/L	NT: 99.9%	1.1 g/L	3	Di Caprio <i>et al.</i> 2019
<i>Scenedesmus sp.</i>	Agua residual de melaza fermentada de tipo butirato estéril	Butirato	DQO: 3965.0 mg/L NT: 159.0 mg/L PT: 39.3 mg/L	DQO: 85.5% NT: 84.6% PT: 79.6%	1.01 g/L	6	Ren <i>et al.</i> , 2018
<i>Scenedesmus sp.</i>	Efluente primario de agua residual estéril	Agua residual	COT: 42.7 ± 0.60 mg/L DQO: 142.0 ± 0.00 mg/L NT: 27.7 ± 0.11 mg/L PT: 1.59 ± 0.03	COT: 52.9- 63.4% DQO: 39.4-40.8% NT: 9.8-14% PT: 32.7-35.4%	0.08 g/L	11	Zhang <i>et al.</i> , 2013
<i>Scenedesmus sp.</i>	Concentrado de agua residual estéril	Agua residual	COT: 960 ± 30.50 mg/L DQO: 2324 ± 40.1 mg/L N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 91 ± 1.8 mg/L N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> : 0.35 ± 0.36 mg/L P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> : 212 ± 7.2 mg/L	COT: 82.27-96.18%	---	6	Zhou <i>et al.</i> , 2011
<i>Chlorella vulgaris</i>	Agua residual porcina 5 veces diluida en agua destilada( estéril)	Agua residual porcina	DQO: 3665.0 mg/L N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 264.8 mg/L	DQO: 72.3% N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 64.2%	2.35 g/L	6	Wang <i>et al.</i> , 2015

En comparación con los estudios relacionados, la concentración de biomasa obtenida en nuestro sistema de 1.1 g/L fue es similar a los valores obtenidos en los cultivos en los que se ha adicionado glucosa como fuente de carbono orgánico (Walls *et al.* 2019; Di Caprio *et al.* 2019). Así mismo, las eficiencias de eliminación de DQO y COT también fueron comparables con los valores informados, mientras que la

remoción de nitrógeno amoniacal fue menor en comparación a los otros estudios presentados (ver Tabla19).

Así mismo, se generaron las curvas de pH obtenidas durante los 21 días de cultivo para cada tratamiento.

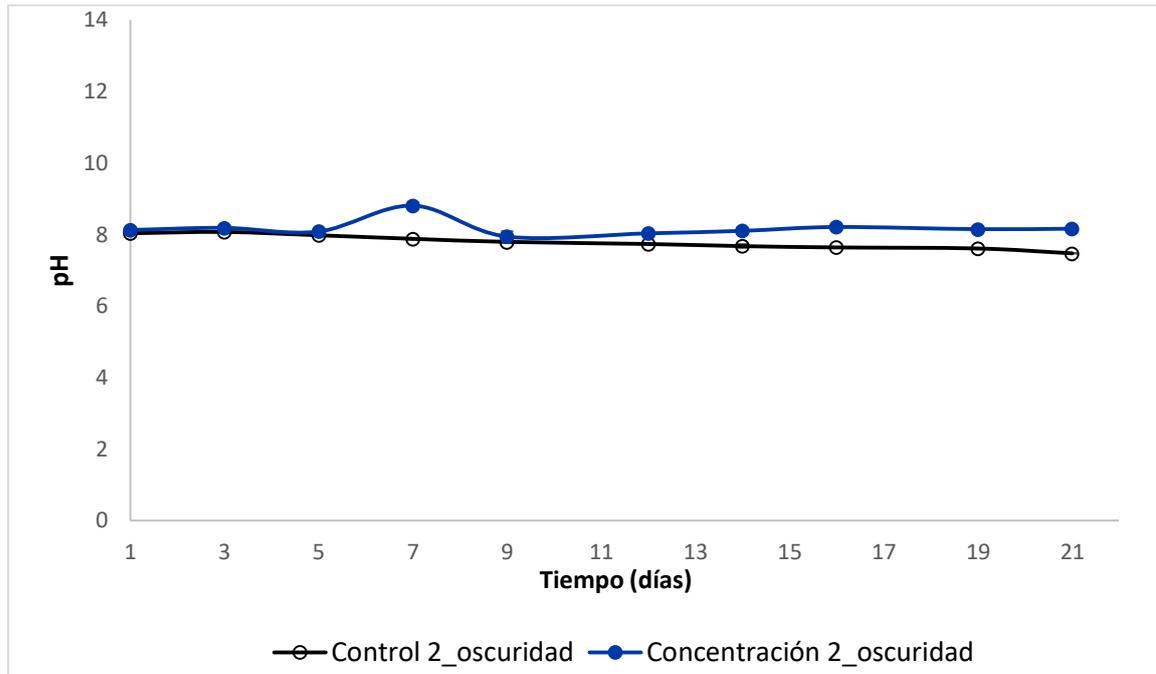
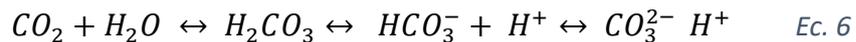


Figura 21. Monitoreo del pH para los cultivos bajo condiciones de oscuridad.

En general, el pH se mantuvo en el intervalo de 7 y 8 para el *Control 2* y la *Concentración 2* bajo condiciones de oscuridad. La estabilidad natural del pH puede deberse a la presencia de sistema de amortiguación ácido-base débil basado en el equilibrio de las especies de carbono inorgánico disuelto donde el pH se encuentra entre 6.5 y 10, y la forma de carbono dominante es bicarbonato (Markou *et al.*, 2014).



## 9. Conclusiones

Se acepta la hipótesis de la investigación y se concluye que es factible el uso del agua residual porcina como fuente de carbono orgánico para el desarrollo del proceso heterotrófico microalgal para producción de biomasa y tratamiento de agua residual.

Con las concentraciones de carbono orgánico de 892.2 mg/L y 1013 mg/L provenientes de la mezcla de agua residual urbana y agua residual porcina se generó mayor cantidad de biomasa de 1.1 y 0.94 g/L y una remoción de carbono orgánico del 88.2% y 81.6% respectivamente.

El balance de masa de carbono indicó que el cultivo utilizado como inóculo es capaz de asimilar el carbono orgánico disuelto en el medio de cultivo si éste se encuentre en mayor proporción al inorgánico bajo condiciones de 12:12 h luz: oscuridad.

Fue posible el cultivo del consorcio de microalgas bajo condiciones heterotróficas con 1013 mg/L de carbono orgánico. Se logró obtener una concentración máxima de 1.1 g/L de biomasa bajo condiciones de oscuridad a través de la remoción de la materia orgánica a los 14 días de cultivo: carbono orgánico con el 81.6%, DQO con el 83.7% y la DBO<sub>5</sub> con el 85.1% de remoción.

El consorcio de microalgas no puede sobrevivir bajo condiciones de oscuridad con concentraciones bajas de carbono orgánico. Debido a que al cultivar el consorcio de microalgas sólo en agua residual urbana (COT igual a 19.53 mg/L) la concentración de la biomasa disminuyó a 0.42 g/L y no hubo remoción de carbono orgánico además de que la remoción de la DQO y la DBO<sub>5</sub> fueron bajas de 3.7% y 7.2% respectivamente.

La aplicación del cultivo heterotrófico de microalgas es una alternativa como tratamiento biológico para aguas residuales con concentraciones altas de materia orgánica disuelta medida en términos de DQO con el cual es posible conseguir remociones superiores al 80% bajo condiciones de oscuridad.

Pudo haber condiciones limitantes de oxígeno disuelto que limitaran el incremento de la concentración de la biomasa y la remoción de materia orgánica debido a que se empleó agitación manual. Para que el suministro de oxígeno disuelto no sea un

factor limitante durante el cultivo heterotrófico la aireación puede realizarse por burbujeo de aire o por agitación mecánica mediante bombas.

## 10. Referencias

- Acién, F. G., Molina, E., Reis, A., Torzillo, G., & Zittelli, C. (2017). "Photobioreactors for the Production of Microalgae". En C. Gonzalez-Fernandez, & R. Muñoz, *Microalgae-based biofuels and bioproducts: from feedstock cultivation to end-products* (1 ed., pág. 560). Kindlington, United Kingdom: Woodhead Publishing in energy. doi: <https://doi.org/10.1016/C2015-0-05935-4>
- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A., & Ibraheem, B. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal Biological Sciences*, 19, 257-275. doi: 10.1016/j.sjbs.2012.04.005
- Abomohra, A. E.-F., Jin, W., & El-Sheekh, M. (2016). Enhancement of lipid extration for improved biodiesel recovery from the biodiese promising microalga *Scenedesmus obliquus*. *Energy Conversion and Management*, 108, 23-29. doi: 10.1016/j.enconman.2015.11.007
- Ahn, J. H., Do, T. H., Kim, S. D., & Hwang, S. (2006). The effect of calcium on the anaerobic digestion treating swine wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, 30, 33–38. doi: 10.1016/j.bej.2006.01.014
- Altunoz, M., Allesina, G., Pedrazzi, S., & Guidetti, E. (2020). Integration of biological waste conversion and wastewater treatment plants by microalgae cultivation. *Process Biochemistry*, 91, 158-164. doi: 10.1016/j.procbio.2019.12.007
- APHA-AWWA-WPCF. (1992). *Métodos normalizados para el análisis de agua potables y residuales* (17a ed., Vol. 17). Madrid, España: Ed. Díaz Santos.
- Arango, L., Cuervo, F. M., González, A., & Buitrón, G. (2016). Effect of microalgae inoculation on the start-up of microalgae-bacteria systems treating municipal, piggery and digestate wastewaters. *Water Science & Technology*, 73(3), 687-696. doi: 10.2166/wst.2015.544
- Barroso, R., Ferreira, M., & Franci, R. (2019). A conceptual scenario for the use of microalgae biomass for microgeneration in wastewater treatment plants. *Journal of Environmental Management*, 252, 109639. doi: 10.1016/j.jenvman.2019.109639
- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2014). *Algae. Anatomy, Biochemistry and Biotechnology* (2 ed.). Pisa, Italia: CRC Press, Taylor & Francis Group. LLC. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1201/b16544>
- Beevi, U. S., & Sukumaran, R. K. (2014). Cultivation of microalgae in dairy effluent for oil production and removal of organic pollution load. *Bioresource Technology*, 165, 295-301. doi: 10.1016/j.biortech.2014.03.028
- Bhatnagar, A., Chinnasamy, S., Singh, M., & Das, K. (2011). Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Applied Energy*, 88, 3425–3431. doi: 10.1016/j.apenergy.2010.12.064

Boyle, N. R., & Morgan, J. A. (2009). Flux balance analysis of primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *BMC Systems Biology*, 3(4), 1-14. doi: 10.1186/1752-0509-3-4

Brindley, C., Garcia-Malea, M. C., Acien, F. G., Fernandez, J. M., Garcia, J. L., & Molina, E. (2004). Influence of power supply in the feasibility of *Phaeodactylum tricornutum* cultures. *Biotechnology and bioengineering*, 87, 723-733. doi: 10.1002/bit.20179

Brock, T. D. (2009). *Microbiología de los microorganismos* (12 ed.). España: PEARSON Educación.

Bux, F. (2013). *Biotechnological Applications of Microalgae: Biodiesel and Value Added Products*. (T. & Group, Ed.) Boca Raton: CRC Press. doi:10.1111/jpy.12233

Cai, T., Park, S. Y., & Li, Y. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. *Renewable Sustainable Energy Reviews*, 19, 360-369. doi: 10.1016/j.rser.2012.11.030

Caporgno, M. P., Haberkorn, I., Böcker, L., & Mathys, A. (2019). Cultivation of *Chlorella protothecoides* under different growth modes and its utilisation in oil/water emulsions. *Bioresource Technology*, 288, 121476. doi: 10.1016/j.biortech.2019.121476

Castillo-Bravo, D. F. (2017). Desnitrificación autótrofa heterótrofa simultánea de Ril sintético en filtro anaerobio (lecho fijo) con flujo ascendente. *Universidad Técnica Federico Santa María*, 80.

Chen, F. (1996). High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends in Biotechnology*, 14(11), 421-426. doi: 10.1016/0167-7799(96)10060-3

Cheng, D. L., Ngo, H. H., Guo, W. S., Chang, S. W., Nguyen, D. D., & Kumar, S. M. (2019). Microalgae biomass from swine wastewater and its conversion to bioenergy. *Bioresource Technology*, 275, 109-122. doi: 10.1016/j.biortech.2018.12.019.

Cheng, H.-H., Narindri, B., Chu, H., & Whang, L.-M. (2020). Recent advancement on biological technologies and strategies for resource recovery from swine wastewater. *Bioresource Technology*, 303, 122861. doi: 10.1016/j.biortech.2020.122861

Chiu, S.-Y., Kao, C.-Y., Chen, T.-Y., Chang, Y.-B., Kuo, C.-M., & Lin, C.-S. (2015). Cultivation of microalgal *Chlorella* for biomass and lipid production using wastewater as nutrient resource. *Bioresource Technology*, 184, 179–189. doi: 10.1016/j.biortech.2014.11.080

Chojnacka, K., & Marquez-Rocha, F. (2004). Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnology*, 3, 21-34. doi: 10.3923/biotech.2004.21.34

Confederación de Porcicultores Mexicanos. (2019). *Compendio Estadístico del Sector Porcícola 2019*. México.

Coruzzi, G. M. (2003). Primary N-assimilation into Amino Acids in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book*. doi:10.1199/tab.0010

Crawford, N. M., Kahn, M. L., Leustek, T., & Long, S. R. (2000). Nitrogen and sulfur. En B. Buchanan, W. Gruissem, & R. Jones, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (págs. 786-849). Am. Soc. Plant.

Devi, M. P., Subhash, G. V., & Mohan, S. V. (2012). Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: Effect of nutrient supplementation. *Renewable Energy*, 43, 276-283. doi: 10.1016/j.renene.2011.11.021

Di Caprio, F., Altimari, P., Laquaniello, G., Toro, L., & Pagnanelli, F. (2019). T. obliquus Cultivation Under Heterotrophic Conditions: Determination of Growth Parameters. *Chemical Engineering Transactions*, 74, 133-138. doi: 10.3303/CET1974023

Droop, M. R. (1974). Heterotrophy of carbon. *Algal Physiology and Biochemistry*. Blackwell Scientific, 530-559.

Escalante, V. E., & Garzón, M. A. (2011). Opciones de tratamiento para aguas residuales de tres granjas porcícolas. *Ingeniería Agrícola y Biosistemas*, 2(2), 87-90.

*Estadísticas del Agua en México*. (2016). México: Comisión Nacional del Agua, CONAGUA. [http://201.116.60.25/publicaciones/EAM\\_2016.pdf](http://201.116.60.25/publicaciones/EAM_2016.pdf)

Fan, J., Huang, J., Li, Y., Han, F., Wang, J., Li, X., Wang, W., Li, S. (2012). Sequential heterotrophy–dilution–photoinduction cultivation for efficient microalgal biomass and lipid production. *Bioresource Technology*, 112, 206-211. doi: 10.1016/j.biortech.2012.02.046

Fraga, F., & Pérez, F. F. (1990). Transformaciones entre la composición química del fitoplancton, composición elemental y relación de Redfield. *Instituto de Investigaciones Marinas*, 54(1), 69-76.

Gaignard, C., Gargouch, N., Dubessay, P., Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C., Fendri, I., Abdelkafi, S., Michaud, P. (2019). New horizons in culture and valorization of red microalgae. *Biotechnology Advances*, 37, 193–222. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.014

Gao, S., Hu, C., & Sun, S. (2018). Performance of piggery wastewater treatment and biogas upgrading by three microalgal cultivation technologies under different initial COD concentration. *Energy*, 165, 360-369. doi: 10.1016/j.energy.2018.09.190

- Gao, F., Yang, Z., Zeng, G., Mu, J., Liu, M., & Cui, W. (2016). Removal of nutrients, organic matter, and metal from domestic secondary effluent through microalgae cultivation in a membrane photobioreactor. *Chemical Technology and Biotechnology*, 91(10), 2713-2719. doi: 10.1002/jctb.4879
- García, D., De Godos, I., Domiguez, C., Turiel, S., Bolado, S., & Muñoz, R. (2019). A systematic comparison of the potencial of microalgae-bacteria and purple phototrophic bacteria consortio for the treatment of piggery wastewater. *Bioresource Technology*, 276, 18-27. doi: 10.1016/j.biortech.2018.12.095
- García, R. (2014). *Producción de biomasa de microalgas rica en carbohidratos acoplada a la eliminación fotosintética de CO<sub>2</sub>*. (Tesis Doctoral). Sevilla, España: Universidad de Sevilla, Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Garrido-Cardenas, J. A., Manzano-Agugliaro, F., Acien-Fernandez, F. G., & Molina-Grima, E. (2018). Microalgae research worldwide. *Algal Research*, 35, 50-60. doi: 10.1016/j.algal.2018.08.005
- Garzón-Zúñiga, M. A., & Buelna, G. (2014). Caracterización de aguas residuales porcinas y su tratamiento por diferentes procesos en México. *Internacional Contaminación Ambiental*, 30, 65-79.
- Geider, R. J., & Osborne, B. A. (1989). Respiration and microalgal growth: a review of the quantitative relationship between dark respiration and growth. *New Phytologist*, 112, 327-341. doi: 10.1111/j.1469-8137.1989.tb00321.x
- Gonçalves, A. L., Pires, J. C., & Simões, M. (2017). A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Research*, 24, 403–415. doi: 10.1016/j.algal.2016.11.008
- Grobbelaar, J. U. (1983). Availability to algae of N and P adsorbed on suspended solids in turbid waters of the Amazon River. *Arch. Hydrobiol.*, 96(3), 302–16.
- Guldhe, A., Ansari, F., Singh, P., & Bux, F. (2017). Heterotrophic cultivation of microalgae using aquaculturewastewar. A biorefinery concept for biomass production and nutrient remediation. *Ecological Engineering*, 99, 47-53. doi: 10.1016/j.ecoleng.2016.11.013
- Hach. (2000). Water Analysis Manual. *Second edition in Spanish*.
- Hernández-García, A., Velásquez-Orta, S., Novelo, E., Yáñez-Noguez, I., Monje-Ramírez, I., & Orta Ledesma, M. (2019). Wastewater-leachate treatment by microalgae: Biomass, carbohydrate and lipid production. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 174, 435-44. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.02.052
- Hu, B., Min, M., Zhou, W., Li, Y., Mohr, M., Cheng, Y., Lei, H., Liu, Y., Lin, X., Chen, P., Ruan, R. (2012). Influence of Exogenous CO<sub>2</sub> on Biomass and Lipid Accumulation of Microalgae *Auxenochlorella protothecoides* Cultivated in Concentrated Municipal Wastewater. *Applied Biochemistry and Biotechnology volume*, 166, 1661-1673. doi: 10.1007/s12010-012-9566-2

Hu, J., Nagarajan, D., Zhang, Q., Chang, J.-S., & Lee, D.-J. (2018). Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. *Biotechnology Advances*, 36, 54-67. doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.09.009

Ji, M.-K., Kim, H.-C., Sapireddy, V., Yun, H.-S., Abou-Shanab, R., Choi, J., Lee, W., Timmes, T. C., Inamuddin, Jeon, B.-H. (2013). Simultaneous nutrient removal and lipid production from pretreated piggery wastewater by *Chlorella vulgaris* YSW-04. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 2701–2710. doi: 10.1007/s00253-012-4097-x

John, R. P., Anisha, G., Nampoothiri, K. M., & Pandey, A. (2011). Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology*, 102, 186–193. doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.139

Junying, Z., Junfeng, R., & Baoning, Z. (2013). Factors in mass cultivation of microalgae for biodiesel. *Chinese Journal of Catalysis*, 34, 80-100. doi: 10.1016/S1872-2067(11)60497-X

Kim, J. H., Chen, M., Kishida, N., & Sudo, R. (2004). Integrated real-time control strategy for nitrogen removal in swine wastewater treatment using sequencing batch reactors. *Water Research*, 38, 3340–3348. doi: 10.1016/j.watres.2004.05.006

Kim, S., Park, J.-e., Cho, Y.-B., & Hwang, S.-J. (2013). Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Bioresource Technology*, 144, 8-13. doi: 10.1016/j.biortech.2013.06.068

Lee, Y. C., Mohamad Amini, M. H., & Sulaiman, N. S. (2018). Batch adsorption and isothermic studies of malachite green dye adsorption using *Leucaena leucocephala* biomass as potential adsorbent in water treatment. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, 40(3), 563-569. doi: 10.14456/sjst-psu.2018.67

Li, K., Liu, Q., Fanga, F., Luo, R., Lu, Q., Zhou, W., Huo, S., Cheng, P., Liu, J., Addy, M., Chen, P., Chen, D., Ruan, R. (2019). Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: A review. *Bioresource Technology*, 291, 121934. doi: 10.1016/j.biortech.2019.121934

Liu, J., Huang, J., Sun, Z., Zhong, Y., Jiang, Y., & Chen, F. (2011). Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: Assessment of algal oils for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 102, 106-110. doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.017

Lloyd, D. (1974). Dark respiration. En W. D. Stewart (Ed.), *Algal Physiology and Biochemistry* (Vol. 10, págs. 505-529). Berkeley and Angeles: Universidad de California Press, Blackwell Scientific Publications.

López-Pacheco, I. Y., Carrillo-Nieves, D., Salinas-Salazar, C., Silva-Núñez, A., Arévalo-Gallegos, A., Barceló, D., afewerki, S., Iqbal, H.M.N., Parra-Saldívar, R.

- (2019). Combination of nejayote and swine wastewater as a medium for *Arthrospira maxima* and *Chlorella vulgaris* production and wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 676, 356–367. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.04.278
- Ma, C., Wen, H., Xing, D., Pei, X., Zhu, J., Ren, N., & Liu, B. (2017). Molasses wastewater treatment and lipid production at low temperature conditions by a microalgal mutant *Scenedesmus* sp. Z-4. *Biotechnology for Biofuels*, 10, 111. doi: 10.1186/s13068-017-0797-x
- Markou, G., Vandamme, D., & Muylaert, K. (2014). Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water Research*, 65, 186-202. doi: 10.1016/j.watres.2014.07.025
- Mata, T. M., Martinis, A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 217-232. doi: 10.1016/j.rser.2009.07.020
- Metcalf, & Eddy. (2014). *Ingeniería de aguas residuales: Tratamiento, vertido y reutilización* (3ra ed., Vol. 1). Mc Graw Hill.
- Mohan, S. V., Rohit, M. V., Chiranjeevi, P., Chandra, R., & Navaneeth, B. (2015). Heterotrophic microalgae cultivation to synergize biodiesel production with waste remediation: Progress and perspectives. *Bioresource Technology*, 184, 169–178. doi: 10.1016/j.biortech.2014.10.056
- Monfet, E., & Unc, A. (2017). Defining wastewaters used for cultivation of algae. *Algal Research*, 24, 520–526. doi: 10.1016/j.algal.2016.12.00
- Morales-Sánchez, D., Martínez-Rodríguez, O. A., Kyndt, J., & Martínez, A. (2015). Heterotrophic growth of microalgae: metabolic aspects. *Microbiology Biotechnology*, 31, 1–9. doi: 10.1007/s11274-014-1773-2
- Morales-Sánchez, D., Tinoco-Valencia, R., Caro-Bermúdez, M. A., & Martínez, A. (2013). Heterotrophic growth of *Neochloris oleoabundans* using glucose as a carbon source. *Biotechnology for Biofuels*, 6, 100. doi: 10.1186/1754-6834-6-100
- Nagappan, S., Devendran, S., Tsai, P.-C., Dahms, H.-U., & Ponnusamy, V. (2019). Potential of two-stage cultivation in microalgae biofuel production. *Fuel*, 252, 339-349. doi: 10.1016/j.fuel.2019.04.138
- Nagarajan, D., Kusmayadi, A., Yen, H., Dong, C., Lee, D., & Chang, J. (2019). Current advances in biological swine wastewater treatment using microalgae-based processes. *Bioresource Technology*, 289, 121718. doi: 10.1016/j.biortech.2019.121718
- Nhat, P. V., Ngo, H. H., Guo, W. S., Chang, S. W., Nguyen, D. D., Nguyen, P. D., Bui, X.T., Zhang, X.B., Guo, J. B. (2018). Can algae-based technologies be an affordable green process for biofuel. *Bioresource Technology*, 256, 491-501. doi: 10.1016/j.biortech.2018.02.031

NOM-001-SEMARNAT-1996: Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. <http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Publicaciones/Publicaciones/SGAA-15-13.pdf>

Pancha, I., Chokshi, K., George, B., Ghosh, T., Paliwal, C., Maurya, R., & Mishra, S. (2014). Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology*, 156, 146-154. doi: 10.1016/j.biortech.2014.01.025

Park, J. B., & Craggs, R. J. (2010). Wastewater treatment and algal production in high rate algal ponds with carbon dioxide addition. *Water Science & Technology*, 61 (3), 633–639. doi: 10.2166/wst.2010.951

Perez-Garcia, O., Escalante, F. M., De-Bashan, L., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, 45, 11-36. doi: 10.1016/j.watres.2010.08.037

Prandini, J., Busi, M., Mezzari, M., Pirolli, M., Michelon, W., & Moreira, H. (2016). Enhancement of nutrient removal from swine wastewater digestate coupled to biogas purification by microalgae *Scenedesmus* spp. *Bioresource Technology*, 202, 67-75. doi: 10.1016/j.biortech.2015.11.082

Ptacnik, R., Andersen, T., & Tamminen, T. (2010). Performance of the Redfield Ratio and a Family of Nutrient Limitation Indicators as Thresholds for Phytoplankton N vs. P Limitation. *Ecosystems*, 1201-1214. doi: 10.1007/s10021-010-9380-z

Ramanan, R., Kim, B.-H., Cho, D.-H., Oh, H.-M., & Kim, H.-S. (2016). Algae–bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnology Advances*, 34, 14–29. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.12.003

Ramsundar, P., Guldhe, A., Singh, P., & Bux, F. (2017). Assessment of municipal wastewaters at various stages of treatment process as potential growth media for *Chlorella sorokiniana* under different modes of cultivation. *Bioresource Technology*, 227, 82–92. doi: 10.1016/j.biortech.2016.12.037

Redfield, A. (1934). On the proportions of organic derivatives in seawater and their relation to the composition of plankton. *Liverpool: James Johnstone Memorial*, 176-192. [http://cmore.soest.hawaii.edu/summercourse/2012/documents/bronk\\_05-30-12/Redfield\\_1934.pdf](http://cmore.soest.hawaii.edu/summercourse/2012/documents/bronk_05-30-12/Redfield_1934.pdf)

Ren, H.-Y., Kong, F., Ma, J., Zhao, L., Xie, G.-J., Xing, D., Guo, W.-Q., Liu, B.-F., Ren, N.-Q. (2018). Continuous energy recovery and nutrients removal from molasses wastewater by synergistic system of dark fermentation and algal culture under various fermentation types. *Bioresource Technology*, 252, 110-117. doi: 10.1016/j.biortech.2017.12.092

Ren, H.-Y., Liu, B.-F., Ma, C., Zhao, L., & Ren, N.-Q. (2013). A new lipid-rich microalga *Scenedesmus* sp. strain R-16 isolated using Nile red staining: effects of

carbon and nitrogen sources and initial pH on the biomass and lipid production. *Biotechnology for Biofuels*, 6, 143. doi: 10.1186/1754-6834-6-143

Reportlinker, *Global Pork Meat Market 2017–2021*, vol. 2018, 2017. (s.f.). <https://www.prnewswire.com/news-releases/global-pork-meat-market-2017-2021-300537453.html>.

Reynolds, C. S. (2006). *The Ecology of Phytoplankton*. Lancaster: Cambridge University Press. doi: 10.1017/CBO9780511542145

Rezić, T., Filipović, J., & Šantek, B. (2013). Photo-mixotrophic cultivation of algae *Euglena gracilis* for lipid production. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 78, 65-69.

Richmond, A. (2004). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. John Wiley & Sons. doi: 10.1002/9780470995280

Richmond, A., & Hu, Q. (2013). *Handbook of microalgal culture: Applied Phycology and Biotechnology* (2 ed.). Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons. doi: 10.1002/9781118567166

Sachdeva, N., Kumar, G. D., Gupta, R. P., Mathur, A. S., Manikandan, B., Basu, B., & Tuli, D. K. (2016). Kinetic modeling of growth and lipid body induction in *Chlorella pyrenoidosa* under heterotrophic conditions. *Bioresource Technology*, 218, 934-943. doi: 10.1016/j.biortech.2016.07.063

Salama, E.-S., Kurade, M. B., Abou-Shanabb, R. A., El-Dalatony, M. M., Yang, I.-S., Booki, M., & Jeon, B.-H. (2017). Recent progress in microalgal biomass production coupled with wastewater treatment for biofuel generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79, 1189-1211. doi: 10.1016/j.rser.2017.05.091

Samo, T. J., Kimbrel, J. A., Nilson, D. J., Pett-Ridge, J., Weber, P. K., & Mayali, X. (2018). Attachment between heterotrophic bacteria and microalgae influences symbiotic microscale interactions. *Environmental Microbiology*, 20, 4385–4400. doi: 10.1111/1462-2920.14357

Santos, F., & Pires, J. (2018). Nutrient recovery from wastewaters by microalgae and its potential application as bio-char. *Bioresource Technology*, 267, 725-731. doi: 10.1016/j.biortech.2018.07.119

Shen, L., Saky, S. A., Yang, Z., Ho, S., Chen, C., Qin, L., Zhang, G., Wang, Y., Lu, Y. (2019). The critical utilization of active heterotrophic microalgae for bioremoval of Cr(VI) in organics co-contaminated wastewater. *Chemosphere*, 228, 536-544. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.04.152

Shen, L., Ndayambaje, J. D., Murwanashyaka, T., Cui, W., Manirafasha, E., Chen, C., Wang, Y., Lu, Y. (2017). Assessment upon heterotrophic microalgae screened from wastewater microbiota for concurrent pollutants removal and biofuel production. *Bioresource Technology*, 245, 386-393. doi: 10.1016/j.biortech.2017.07.177

- Sheng, A., Bilad, M., Osman, N., & Arahman, N. (2017). Sequencing batch membrane photobioreactor for real secondary effluent polishing using native microalgae: process performance and full-scale projection. *Journal of Cleaner Production*, 168, 708-715. doi: 10.1016/j.jclepro.2017.09.083
- Shi, J., Podola, B., & Melkonian, M. (2014). Application of a prototype-scale Twin-Layer photobioreactor for effective N and P removal from different process stages of municipal wastewater by immobilized microalgae. *Bioresource Technology*, 154, 260-266. doi: 10.1016/j.biortech.2013.11.100
- Singh, J., & Saxena, R. C. (2015). *Handbook of Marine Microalgae* (1 ed.). Indian Institute of Petroleum, Dehradun, India: Academic Press. doi: 10.1016/C2013-0-19117-9
- Spennati, E., Casazza, A., Perego, P., Solisio, C., Busca, G., & Converti, A. (2019). Microalgae Growth in Winery Wastewater under Dark Conditions. *Chemical Engineering Transactions*, 74, 1471-147. doi: doi.org/10.3303/CET1974246
- Stevenson, R. J., Lowe, R. L., & Bothwell, M. L. (1996). *Algal Ecology, Freshwater Benthic Ecosystems*. Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-668450-6.X5027-9
- Sukacova, K., Trtilek, M., & Rataj, T. (2015). Phosphorus removal using a microalgal biofilm in a new biofilm photobioreactor for tertiary wastewater treatment. *Water Research*, 71, 55-63. doi: 10.1016/j.watres.2014.12.049
- Venkata Mohan, S., Rohit, M. V., Chiranjeevi, P., Chandra, R., & Navaneeth, B. (2015). Heterotrophic microalgae cultivation to synergize biodiesel production with waste remediation: Progress and perspectives. *Bioresource Technology*, 184, 169-178. doi: 10.1016/j.biortech.2014.10.056
- Vieira-Costa, J. A., & Greque de Moraes, M. (2014). Chapter one: An Open Pond System for Microalgal Cultivation. En A. Pandey, D.-J. Lee, Y. Chisti, C. Soccol, & F. U. Grande (Ed.), *Biofuels from algae*. (pág. 348). Laboratory of Biochemical Engineering, College of Chemistry and Food Engineering. doi: 10.1016/B978-0-444-59558-4.00001-2
- Vilajeliu-Pons, A., Puig, S., Salcedo-Dávila, I., Balaguer, M. D., & Colprim, J. (2017). Long-term assessment of six-stacked scaled-up MFCs treating swine manure with different electrode materials. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 3, 947–959. doi: 10.1039/C7EW00079K
- Walls, L. E., Velasquez-Orta, S., Romero-Frasca, E., Leary, P., Yáñez-Nogues, I., & Orta-Ledesma, M. T. (2019). Non-sterile heterotrophic cultivation of native wastewater yeast and microalgae for integrated municipal wastewater treatment and bioethanol production. *Biochemical Engineering Journal*, 151, 107319. doi: 10.1016/j.bej.2019.107319
- Wang, M., Yang, Y., Chen, Z., Chen, Y., Wen, Y., & Chen, B. (2016). Removal of nutrients from undiluted anaerobically treated piggery wastewater by improved

microalgae. *Bioresource Technology*, 222, 130-138. doi: 10.1016/j.biortech.2016.09.128

Wang, Y., Guo, W., Yen, H.-W., Ho, S.-H., Lo, Y.-C., Cheng, C.-L., Ren, N., Chang, J.-S. (2015). Cultivation of *Chlorella vulgaris* JSC-6 with swine wastewater for simultaneous nutrient/COD removal and carbohydrate production. *Bioresource Technology*, 198, 619-625. doi: 10.1016/j.biortech.2015.09.067

Wu, X., Zhu, J., Cheng, J., & Zhu, N. (2015). Optimization of Three Operating Parameters for a Two-Step Fed Sequencing Batch Reactor (SBR) System to Remove Nutrients from Swine Wastewater. *Applied biochemistry and biotechnology*, 175, 2857-2871. doi: 10.1007/s12010-014-1467-0

Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., & Ying-xue, S. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*, 101 (14), 5494-5500. doi: 10.1016/j.biortech.2010.02.016

Xiong, W., Gao, C., Yan, D., Wu, C., & Wu, Q. (2010). Double CO<sub>2</sub> fixation in photosynthesis–fermentation model enhances algal lipid synthesis for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 101, 2287–2293. doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.041

Xu, H., Miao, X., & Wu, Q. (2006). High quality biodiesel production from a microalgae *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, 126, 499-507. doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.05.002

Zhang, L., Lee, Y. W., & Jahng, D. (2011). Anaerobic co-digestion of food waste and piggery wastewater: Focusing on the role of trace elements. *Bioresource Technology*, 102, 5048-5059. doi: 10.1016/j.biortech.2011.01.082

Zhang, T.-Y., Wu, Y.-H., Zhu, S.-f., Li, F.-M., & Hu, H.-Y. (2013). Isolation and heterotrophic cultivation of mixotrophic microalgae strains for domestic wastewater treatment and lipid production under dark condition. *Bioresource Technology*, 149, 586-589. doi: 10.1016/j.biortech.2013.09.106

Zheng, H., Liu, M., Lu, Q., Wu, X., Ma, Y., Cheng, Y., Addy, M., Liu, Y., Ruan, R. (2018). Balancing carbon/nitrogen ratio to improve nutrients removal and algal biomass production in piggery and brewery wastewaters. *Bioresource Technology*, 249, 479–486. doi: 10.1016/j.biortech.2017.10.057

Zhou, W., Wang, H., Chen, L., Cheng, W., & Liu, T. (2017). Heterotrophy of filamentous oleaginous microalgae *Tribonema minus* for potential production of lipid and palmitoleic acid. *Bioresource Technology*, 239, 250-257. doi: 10.1016/j.biortech.2017.05.045

Zhou, W., Li, Y., Min, M., Hu, B., Chen, P., & Ruan, R. (2011). Local bioprospecting for high-lipid producing microalgal strains to be grown on concentrated municipal wastewater for biofuel production. *Bioresource Technology*, 102, 6909-6919. doi: 10.1016/j.biortech.2011.04.038

Zhou, W., Min, M., Li, Y., Hu, B., Ma, X., Cheng, Y., Liu, Y., Chen, P., Ruan, R. (2012). A hetero-photoautotrophic two-stage cultivation process to improve wastewater nutrient removal and enhance algal lipid accumulation. *Bioresource Technology*, 110, 448-455. doi: 10.1016/j.biortech.2012.01.063

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado de Ingeniería Ambiental por la formación recibida durante los estudios de Maestría y el apoyo durante mi desarrollo académico.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, por el apoyo económico brindado durante los estudios de Maestría.

A mi tutora principal, Dra. María Teresa Orta Ledesma por su apoyo incondicional durante la elaboración de este proyecto de tesis.

A los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Víctor Manuel Luna Pabello, al Dr. Ignacio Monje Ramírez, el Dr. Armando González Sánchez y a la Mtra. Gloria Moreno Rodríguez por su apoyo a través de su asesoramiento y comentarios durante la realización de la tesis.

A la Mtra. Isaura Yáñez Noguez por su apoyo brindado durante la realización de este proyecto de tesis.

A mis profesores la Dra. Gabriela Moeller y la Mtra. Catalina Ferat por todo el conocimiento transmitido y por su apoyo incondicional, al Dr. Víctor Manuel Luna que a través de sus comentarios y preguntas en clase me ayudo a mejorar y lograr el proyecto.

A todo el personal del Instituto de Ingeniería, en especial a la Mtra. Diana García por su apoyo en las capacitaciones que me brindo. Al ingeniero Briones por la ayuda en trámites y los procesos del Laboratorio de Ingeniería Ambiental (LIA) y en general a todo el personal del LIA.

A mis compañeros del grupo de trabajo, en especial a Andrea Hernández por todos sus consejos y recomendaciones y por su amistad. A Erik Vielma, Tere Herrera, a Isaac Nava, Enrique Romero por su apoyo y amistad. Así mismo, a Fernanda Soto y Samantha Baca por todo su apoyo en el laboratorio.

A mis compañeros y amigos de generación, en especial a mis amigos emergentes Diana Rodríguez y Salvador Salinas por brindarme su amistad incondicional y por todo el trabajo en equipo logrado. A Elisa García y Nancy Nacimba por su amistad sincera y todo su apoyo y sobre todo por su compañía en el LIA. Además, a Ana Laura Priego, Jazmín, Salvador y Solen por su amistad.

A mi novio Erik Canales por todo su amor, paciencia y apoyo incondicional para concluir este proyecto.

A mis padres por apoyarme en todo momento, en especial a mi mamá por confiar en mí y ser mi ejemplo. A mi hermano Roberto Carlos y mis hermanas Lorena y Karina por su paciencia y motivación.