



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Evaluación de *Chlorella vulgaris* para la
reducción de dureza total, DQO, y eliminación
de nitrógeno amoniacal en agua de origen
subterráneo**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA
VICTORIA MARTÍNEZ FRANCO

TUTOR
Dr. Sergio Adrián García González



México, Cd. Mx.

2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa

Vocal: M. en C. Rolando Salvador García Gómez

Secretario: Dr. Sergio Adrián García González

Suplente 1: Q.F.B. María de Lourdes Gómez Ríos

Suplente 2: Dr. Alfonso Durán Moreno

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ LA INVESTIGACIÓN:

Laboratorios 301, 302 y 303 de Ingeniería Ambiental

Facultad de Química, Conjunto E.

Universidad Nacional Autónoma de México

Asesor:

Dr. Sergio Adrián García González

Supervisor técnico:

Dr. Alfonso Durán Moreno

Sustentante:

Victoria Martínez Franco

Declaratoria

Declaro conocer el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, plasmado en la Legislación Universitaria con base en las definiciones de integridad y honestidad ahí especificadas, aseguro mediante mi firma al calce que el presente trabajo es original y enteramente de mi autoría. Todas las citas de, o referencias a, la obra de otros autores aparece debida y adecuadamente señalados, así como acreditadas mediante los recursos editoriales convencionales.

Sustentante
Victoria Martínez Franco

Reconocimientos

A la UNAM, quien destinó parte de sus recursos para brindarme educación profesional. A los profesores de esta misma institución que me formaron como profesional. Desde el nivel medio superior y superior

A todos los mexicanos de los cuales se destina parte de su presupuesto para la UNAM y a la Facultad de Química. Gracias porque me han brindado todos los recursos necesarios para llevar a cabo el aprendizaje necesario de la carrera, desde la infraestructura, así como también los materiales, equipos y reactivos. Y de todos los recursos necesarios para realizar esta tesis

A la Facultad de Química de la UNAM que, a través de la Unidad de Proyectos y de Investigación en Ingeniería Ambiental, UPIIA, dio apoyo para reactivos y materiales a través del Doctor Alfonso Durán Moreno el cual fue el supervisor técnico y al Dr. Sergio Adrián García González de quién se obtuvo la asesoría para este proyecto

Al jurado designado por la Facultad de Química quienes revisaron este documento

Al proyecto número FQ-10-159 “Estudios y proyectos de planeación de agua potable. Anexos técnicos y diseños funcionales para la adecuación tecnológica y puesta en operación de plantas potabilizadoras en la ciudad de México”, con número de registro de SACMEX: 0283-10-ED-L-DGAT-UNAM-2-21 y número de registro de la UNAM: 58386-417-1-VI-21 por el apoyo económico y por permitir la recolección de muestras de la planta potabilizadora cooperante ubicada en la demarcación territorial Tláhuac

Al personal administrativo y académico de los Laboratorios 301, 302 y 303 de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental del Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Química de la UNAM quienes apoyan la parte experimental de este proyecto

ÍNDICE

	<i>Pág.</i>
<i>Declaratoria</i>	<i>I</i>
<i>Dedicatoria</i>	<i>II</i>
<i>Reconocimientos</i>	<i>III</i>
<i>Agradecimientos</i>	<i>IV</i>
<i>Índice</i>	<i>V</i>
<i>Índice de tablas</i>	<i>VII</i>
<i>Índice de gráficas</i>	<i>VIII</i>
<i>Índice de imágenes</i>	<i>IX</i>
<i>Resumen</i>	<i>XI</i>

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

	<i>Pág.</i>
<i>1.1. Problemática</i>	<i>1</i>
<i>1.2. Justificación</i>	<i>2</i>
<i>1.3. Objetivos</i>	<i>3</i>
<i>1.3.1. Objetivo general</i>	<i>3</i>
<i>1.3.2. Objetivos específicos</i>	<i>3</i>

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

<i>2.1. Calidad del suministro de agua potable y normatividad</i>	<i>4</i>
<i>2.1.1. Especificaciones de la NOM-230-SSA1-2002 (DOF, 2005)</i>	<i>7</i>
<i>2.1.2. Especificaciones de la NOM-127-SSA1-2021 (DOF, 2022)</i>	<i>7</i>
<i>2.2. Fuentes de abastecimiento</i>	<i>8</i>
<i>2.2.1. Agua de origen subterráneo</i>	<i>10</i>
<i>2.2.2. Pozo de la Planta Potabilizadora cooperante</i>	<i>11</i>
<i>2.3. Los microorganismos usados como tratamiento de potabilización</i>	<i>12</i>
<i>2.4. Características generales de la microalga Chlorella vulgaris</i>	<i>15</i>

2.4.1. <i>Morfología</i>	16
2.4.2. <i>Reproducción</i>	18
2.4.3. <i>Producción y cosecha</i>	18
2.4.4. <i>Composición primaria</i>	20
2.5. <i>Parámetros de proliferación</i>	20
2.5.1. <i>Curva de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i></i>	21
2.5.2. <i>Modelo cinético de Monod</i>	22

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1. <i>Muestra</i>	25
3.2. <i>Inóculo</i>	25
3.3. <i>Medios de cultivo empleados y secuencia experimental</i>	26
3.4. <i>Procedimiento de identificación del microorganismo</i>	30
3.4.1. <i>Purificación con fenol básico de proteínas de alta pureza</i>	31
3.4.2. <i>Base de datos “UniProt”</i>	33
3.4.3. <i>Análisis estadísticos</i>	33

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. <i>Resultados experimentales</i>	34
4.1.1. <i>Etapa 1: Verificación de la viabilidad de los distintos medios</i>	34
4.1.2. <i>Etapa 2: Escalamiento del sistema en el medio idóneo</i>	35
4.1.3. <i>Etapa 3: Primer paso de adaptación</i>	36
4.1.4. <i>Etapa 4: Segundo paso de adaptación</i>	38
4.1.5. <i>Etapa 5: Generación de biomasa viable</i>	39
4.1.6. <i>Etapa 6: Evaluación de la cantidad de biomasa que dio estadísticamente los mejores resultados</i>	41
4.1.7. <i>Etapa 7: Valoración del biotratamiento con nuevas condiciones</i>	49
4.1.8. <i>Etapa 8: Identificación del microorganismo</i>	55
4.2. <i>Discusión final</i>	56

CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones	58
5.2. Recomendaciones	59

ANEXOS

	<i>Pág.</i>
Anexo 1. <i>Fundamento, método y referencia de las pruebas realizadas en la metodología</i>	60
Anexo 2. <i>Reactivos utilizados para la realización de las pruebas de monitoreo en la metodología</i>	60
Anexo 3. <i>Materiales utilizados para la realización de la metodología</i>	61
Anexo 4. <i>Equipos utilizados para la realización de la metodología</i>	62
Anexo 5. <i>Diferencia de los medios seleccionados para el crecimiento del consorcio</i>	63
Anexo 6. <i>Curva patrón de la densidad óptica medida a 550 nm</i>	66
Anexo 7. <i>Valores de seguimiento alternos</i>	67
Anexo 8. <i>Disposición controlada de los residuos de esta investigación</i>	68

REFERENCIAS	69
--------------------	----

ÍNDICE DE TABLAS

	<i>Pág.</i>
Tabla 1. <i>Marco normativo de observancia obligatoria en el territorio nacional para el suministro de agua potable de establecimientos públicos y privados (elaboración propia)</i>	6
Tabla 2. <i>Preservación de muestras analizadas en la tesis en conformidad con la NOM-230-SSA1-2002 (DOF,2005)</i>	7
Tabla 3. <i>Especificación sanitaria física de la prueba realizada en la metodología de acuerdo con la NOM-127-SSA1-2021 (DOF, 2022)</i>	8
Tabla 4. <i>Especificaciones sanitarias químicas de las pruebas realizadas en la metodología de acuerdo con la NOM-127-SSA1-2021 (DOF, 2022)</i>	8

Tabla 5.	<i>Principales diferencias entre las aguas de origen superficial y subterráneo (Degrémont, 2007)</i>	9
Tabla 6.	<i>Técnicas de proliferación de C. vulgaris (Safi et al., 2014)</i>	19
Tabla 7.	<i>Técnicas de cosecha de C. vulgaris (Safi et al., 2014)</i>	19
Tabla 8.	<i>Formulación de los medios de cultivo para el crecimiento del consorcio</i>	26
Tabla 9.	<i>Diferencia en las principales fuentes de nutrientes de los medios de cultivo seleccionados</i>	27
Tabla 10.	<i>Valores máximos de remoción obtenidos en las pruebas con los tres distintos tratamientos y su cumplimiento con la normativa</i>	48
Tabla 11.	<i>Valores obtenidos en las pruebas con el biotratamiento, con cuatro lavados cada 48 horas consecutivos y su cumplimiento con la normativa</i>	54

ÍNDICE DE GRÁFICAS

	<i>Pág</i>	
Gráfica 1.	<i>Comportamiento del pH de acuerdo con las distintas cantidades de biomasa inicial en g/L en un periodo de nueve días</i>	37
Gráfica 2.	<i>Modificación del pH (promedio) con respecto de los días y desviación estándar de la repetición del sistema con 5.0 g/L</i>	40
Gráfica 3.	<i>Curva patrón para la evaluación de la concentración de biomasa algal como densidad óptica, realizada a 550 nm</i>	40
Gráfica 4.	<i>Comportamiento del pH (promedio) respecto a la cantidad de inóculo inicial</i>	42
Gráfica 5.	<i>Comportamiento del valor de COT con las distintas cantidades iniciales de biomasa</i>	43
Gráfica 6.	<i>Comportamiento de la prueba de DQO con respecto de los días con los distintos tratamientos de biomasa inicial</i>	44
Gráfica 7.	<i>Comportamiento de la dureza total de los tres distintos sistemas de biomasa inicial</i>	45
Gráfica 8.	<i>Comportamiento del contenido de cloruros dependiente de los tres sistemas de biomasa inicial</i>	46

Gráfica 9.	<i>Comportamiento del valor de nitrógeno amoniacal con las tres distintas cantidades de biomasa inicial</i>	47
Gráfica 10.	<i>Porcentaje de remoción máximo dentro de los 7 días de tratamiento de las pruebas de DQO, dureza total, cloruros y nitrógeno amoniacal</i>	48
Gráfica 11.	<i>Comportamiento del pH con los cuatro lavados consecutivos de la biomasa algal de 48 horas</i>	51
Gráfica 12.	<i>Comportamiento de los valores de cloruros respecto a los cuatro lavados de biomasa algal de 48 horas cada uno</i>	51
Gráfica 13.	<i>Comportamiento de los valores de dureza total respecto a los cuatro lavados consecutivos de la biomasa algal de 48 horas</i>	52
Gráfica 14.	<i>Comportamiento de los valores del nitrógeno amoniacal a lo largo de los cuatro lavados consecutivos de 48 horas de la biomasa algal</i>	52
Gráfica 15.	<i>Comportamiento de los valores de DQO respecto a las horas donde se realizaron los lavados de biomasa algal</i>	53
Gráfica 16.	<i>Comportamiento de los valores de COT respecto a las horas donde se realizaron lavados de la biomasa algal</i>	53

ÍNDICE DE IMÁGENES

	<i>Pág.</i>
<i>Imagen 1. Esquema de las fuentes de agua y sus principales características. Extraído de cdc.gov, public water systems-water sources (CDCP, 2022)</i>	9
<i>Imagen 2. Pozo de la planta potabilizadora en la demarcación territorial Tláhuac, CDMX (elaboración personal)</i>	11
<i>Imagen 3. Tipos de microorganismos usados en los procesos de biorremediación (Coelho, 2015)</i>	13
<i>Imagen 4. Ciclo del ácido cítrico. Reacciones, rendimiento energético y regulación (Mathews y van Holde, 1999)</i>	16
<i>Imagen 5. Estructura esquemática de C. vulgaris que ilustra distintos organelos (Safi et al. 2014)</i>	17
<i>Imagen 6. Nueva célula formada emergiendo del interior de la célula madre después de la eclosión (Safi et al., 2014)</i>	18

<i>Imagen 7.</i>	<i>Dibujo que muestra las diferentes fases de la formación de la pared celular hija en C. vulgaris (Safi et al. 2014)</i>	18
<i>Imagen 8.</i>	<i>Curva de crecimiento en cultivos discontinuos (Carroll et al., 2016)</i>	22
<i>Imagen 9.</i>	<i>Diagrama general de la metodología realizada (elaboración propia)</i>	24
<i>Imagen 10.</i>	<i>Diagrama general de un extracto proteico (Ramírez-Carreto et al. 2021)</i>	32
<i>Imagen 11.</i>	<i>Comparación de los medios de proliferación de la cepa comercial FitoMix después de dos semanas de estudio</i>	34
<i>Imagen 12.</i>	<i>Evolución del consorcio FitoMix en el medio Zarrouk (superior) y su evolución bajo el microscopio en objetivo 10x (inferior)</i>	35
<i>Imagen 13.</i>	<i>Primer paso de adaptación en el agua del pozo de la PTAP cooperante</i>	36
<i>Imagen 14.</i>	<i>Segundo paso de adaptación del microorganismo sobreviviente</i>	38
<i>Imagen 15.</i>	<i>Quinta etapa. Generación de biomasa y repetitividad de la modificación del pH de acuerdo con la biomasa inicial de cinco gramos base húmeda</i>	39
<i>Imagen 16.</i>	<i>Séptima etapa, implementación de cuatro ciclos consecutivos de 48 horas</i>	50
<i>Imagen 17.</i>	<i>Comparación visual de Chlorella vulgaris</i>	55
<i>Imagen 18.</i>	<i>Purificación de proteína de alta pureza con fenol básico</i>	56

Nota: Esta tesis usa el punto decimal (DOF, 2009) y los guarismos junto a M (molar), % y °C.

RESUMEN

En este trabajo se evaluó el desempeño de una biomasa microalgal comercial en el tratamiento biológico no convencional para la remoción de contaminantes en un agua de origen subterráneo. Se hizo mediante pruebas de tratabilidad con muestras de agua de pozo de una planta potabilizadora ubicada en la demarcación territorial Tláhuac, Ciudad de México. Se utilizó un consorcio comercial al que se le realizaron pruebas empleando diferentes medios de cultivo para determinar el más conveniente. Con la biomasa generada en las condiciones del medio, se realizaron experimentos con el agua de pozo. Debido a las características del agua, predominó una especie de microalga que, de acuerdo con un análisis de identificación de proteínas, fue *Chlorella vulgaris*. Se realizaron experimentos por lote, con tres distintas concentraciones de biomasa húmeda (2.0, 3.0 y 5.0 g de biomasa/ L de agua de pozo) en un equipo de prueba de jarras. Para la evaluación del tratamiento se consideraron cuatro parámetros, dos de la NOM-127-SSA1-2021: Dureza y nitrógeno amoniacal ($N - NH_3$) y dos de índole general, demanda química de oxígeno (DQO) y cloruros. Para la dureza total se redujo de 752.98 mg/L a 494.22 mg/L y para el $N - NH_3$ de 21.68 a 4.10 mg/L con la cantidad de biomasa más alta. Las variables de DQO y cloruros no se redujeron para el último día de tratamiento. En otro experimento, realizado con la cantidad de inóculo más efectiva, se utilizaron cuatro lavados consecutivos cada 48 horas y se obtuvieron los siguientes valores de reducción: Para los valores normados, dureza y $N - NH_3$, la reducción fue de 447.44 a 416.25 mg/L y 21.86 a 0 mg/L, respectivamente. En el caso de la DQO y los cloruros los valores aumentaron de 220.66 a 259.55 mg/L y 671.75 a 768.18 mg/L, respectivamente. En los tratamientos no se lograron valores de reducción del carbono orgánico total (COT). Adicionalmente, los valores de dureza y nitrógeno amoniacal cumplieron con lo especificado en la NOM-127-SSA1-2021. En cambio, los valores de DQO, cloruros y COT no se encontraban normados pero los valores después del tratamiento son altos, por lo que en trabajos futuros se tendrán que proponer métodos adicionales para eliminar estos contaminantes. Como beneficio de este tratamiento, la biomasa generada podría comercializarse como producto de valor agregado.

Palabras clave: Tratamiento biológico, *Chlorella vulgaris*, pruebas de tratabilidad de agua de pozo

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. PROBLEMÁTICA

El agua extraída de un pozo de una planta potabilizadora cooperante ubicada en la demarcación territorial Tláhuac muestra una problemática en su calidad. El agua contiene concentraciones elevadas de carbonato de calcio ($CaCO_3$) compuesto conocido como dureza, sodio (Na^+), cloruros (Cl^-), turbiedad en UNT (unidades nefelométricas de turbidez), color como U Pt-Co (Unidades de platino cobalto) y una alta concentración de materia orgánica (IMTA, 2019).

Se sabe que la calidad del agua de origen subterráneo depende de diversos factores. Uno de ellos es la presencia de compuestos indeseables, conocidos como contaminantes. Estos pueden clasificarse ampliamente en dos tipos, los compuestos orgánicos y los inorgánicos, incluyendo aceites, grasas, metales pesados, radioisótopos, productos químicos, sólidos generalmente en forma de sales, gases disueltos, entre ellos el oxígeno, microorganismos, entre otros (Igunnu y Chen, 2014).

Así mismo y como lo expresan Pacheco et al., en el 2020, la complejidad de la composición de los influentes (corriente líquida o gaseosa que ingresa a un sistema se conoce como influente y la que sale como efluente, si hubiera una corriente secundaria que se une a cualquiera de las dos corrientes anteriores se le conoce como afluente) se ha incrementado por la intensificación de las actividades humanas. Los contaminantes de los influentes son resultado de las actividades domésticas, de la agricultura, de las industrias y también de su composición física y química de acuerdo con su origen. Originalmente, los tratamientos de potabilización acostumbraban a ser procesos fisicoquímicos, pero dichos procesos han demostrado ser ineficientes para el tratamiento de influentes de composición compleja. Una opción es la combinación de tratamientos fisicoquímicos con biológicos, teniendo como objetivo el desarrollo de procesos de tratamiento sustentables (Pacheco et al., 2020).

Retomando la composición del agua de un pozo de la PTAP cooperante, uno de los contaminantes de mayor importancia es la dureza. El término se describe de manera concisa como aquella agua que no hace espuma y que este fenómeno se debe a las reacciones del calcio y del magnesio con el jabón. Esta problemática genera sarro en las tuberías, deja depósitos blancos, duros y escamosos en las cafeteras y calentadores de agua por poner dos ejemplos (Davis, 2010).

1.2. JUSTIFICACIÓN

Los tratamientos biológicos son procedimientos sustentables en los que se utilizan consorcios microbianos. Específicamente, para la investigación abordada en esta tesis, el uso de consorcios micro-algales sería un tratamiento microbiológico sustentable. Los tratamientos de este tipo utilizan a los microorganismos debido a que poseen la mayor diversidad genética y metabólica entre todos los seres vivos. Además, aunado a su pequeño tamaño, su rápido crecimiento y su habilidad para intercambiar genes, les permite vivir prácticamente en cualquier nicho ecológico y adaptarse rápidamente a condiciones ambientales cambiantes (Madigan et al., 2015).

Los microorganismos se clasifican de acuerdo con las distintas características ambientales que requieran para su proliferación. Por ejemplo, aquellos que son capaces de sobrevivir a condiciones de alcalinidad elevada son los microorganismos conocidos como alcalófilos y aquellos que son capaces de consumir carbono inorgánico son denominados microorganismos autótrofos, etc. (Madigan et al., 2015). Por tanto, para favorecer su crecimiento es esencial proveerlos de los requerimientos ambientales necesarios y así obtener una alta producción de biomasa, logrando tasas de reproducción óptimas (Zhu et al., 2013).

En este proyecto de investigación, muestras del agua del pozo de la planta potabilizadora cooperante fueron sometidas a un tratamiento biológico. Se evaluó la efectividad de un consorcio micro-algal sometido a condiciones específicas de operación. Se reporta que dichos consorcios micro-algales tienen la capacidad de remover nutrientes, metales, productos farmacéuticos, minerales radioactivos u organismos patógenos del medio, por lo que su uso para el tratamiento de aguas residuales (ficorremediación, nombre dado a esta tecnología) está destacado en la

literatura (Pacheco et al., 2020). No obstante, el mecanismo básico detrás de este proceso es inherente al metabolismo de las algas a utilizar y, por lo tanto, la remoción de contaminantes será variable de acuerdo con la especie que se use y las características del influente (Pacheco et al., 2020).

Pacheco et al., en el año de 2020, reportaron algunos de los microorganismos pertenecientes a consorcios utilizados para la ficorremediación, los cuales son: *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta), *T. obliquus* (Chlorophyta) y *Limnospira maxima* (comúnmente conocida como *Arthrospira maxima* o *Spirulina maxima*), entre otros.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo general

Evaluar el desempeño de una biomasa comercial en el tratamiento de agua de origen subterráneo mediante pruebas de tratabilidad para la eliminación de contaminantes específicos del agua de un pozo

1.3.2. Objetivos específicos

Valorar la adaptabilidad de un inóculo mixto mediante pruebas de proliferación para el tratamiento de agua de origen subterráneo con alto contenido de dureza, alcalinidad, materia orgánica y nitrógeno

Realizar las pruebas de tratabilidad del agua de origen subterráneo utilizando diferentes concentraciones de los microorganismos viables evaluando la reducción de contaminantes específicos

Identificar el microorganismo funcional mediante una técnica de purificación de proteínas para futuras investigaciones del aprovechamiento del microorganismo

A continuación, en el siguiente capítulo se presentan los antecedentes de esta investigación que apoyan la estrategia metodológica seguida.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

2.1. CALIDAD DEL SUMINISTRO DE AGUA POTABLE Y NORMATIVIDAD

La disponibilidad de un suministro confiable y limpio de agua es uno de los aspectos más importantes de la salud de los seres vivos (Parsons y Jefferson, 2006), por lo que se han establecido estándares de calidad del agua. Estos estándares han sido desarrollados para servir como pautas de selección de diferentes fuentes de suministros de agua dependiendo del uso que se les dará y para la protección de los cuerpos de agua de la contaminación (Boyd, 2020).

Por ejemplo, el agua designada para consumo humano no debe contener una concentración excesiva de minerales, debe estar libre de toxinas y no debe contener organismos patógenos, por mencionar algunos. Otro uso es el agua destinada para la ganadería, ya que es necesario que tenga la misma calidad que el agua potable para los humanos para no ocasionar la infección de los animales o incluso la muerte. También se encuentra el agua destinada para uso industrial donde se debe adecuar su calidad para los propósitos para los cuales será utilizada. Inclusive, el agua de alimentación de una caldera no debe contener sólidos suspendidos ni disueltos en exceso o una elevada concentración de dureza carbonatada (Boyd, 2020).

Davis (2010) menciona las características del agua potable y las clasifica en cuatro categorías como se menciona a continuación:

1. Física. Las características físicas que destacan en la calidad del agua para uso doméstico incluyen olor, turbidez, temperatura y, en casos particulares, el sabor. Naturalmente, el agua contiene partículas suspendidas que aumentan la turbidez, imparten color aparente denominado así por la presencia de materia orgánica y materia húmica o humus causantes de la coloración amarillo/marrón (Baird et al., 2017) y que generan interferencia con la penetración de la luz. Estas partículas se originan por la erosión, desechos

vegetales presentes en las cuencas hidrologicas y la proliferación de microorganismos en cuerpos de agua (Boyd, 2020).

2. Química. Las características químicas del agua son evidenciadas por sus reacciones observables. Tal es el caso de la comparación del desempeño de las aguas duras y blandas en el lavado de enseres domésticos e industriales. La dureza del agua era entendida como la medición de la capacidad del agua de precipitar jabón, ya que el jabón se precipita principalmente por la presencia de iones calcio y magnesio (Baird et al., 2017).
3. Microbiológica. Los agentes microbiológicos son muy importantes en relación con la salud pública y también pueden modificar significativamente las características físicas y químicas del agua. Si bien el mayor impacto a la salud pública de beber agua insalubre es la diarrea, los principales brotes de enfermedad están relacionados con la calidad microbiológica del consumo de agua. Estos brotes también incluyen infecciones y enfermedades por parásitos, como: Cólera, fiebre tifoidea, disentería, hepatitis, giardiasis, gusano de Guinea y esquistosomiasis (Parsons y Jefferson, 2006).
4. Radiológica. Los factores radiológicos deben considerarse en áreas donde exista la posibilidad de que el agua esté en contacto con sustancias radioactivas. La radioactividad del agua en estos casos genera inquietud en la salud pública (Davis, 2010).

Debido a que el acceso de agua potable segura es esencial para la salud y un derecho humano básico se crearon normas para describir la calidad del agua. Para el caso de México, estas normas nacionales son emitidas por la Secretaría de Salud. Dichas normas mencionan las características del agua para uso y consumo humano como la NOM-127-SSA1-2021 (DOF, 2022), las condiciones para demostrar su cumplimiento como las NOM-230-SSA1-2002 y NOM-179-SSA1-2020 (DOF, 2005, 2020). También contemplan los requisitos que deben cumplir los sistemas de abastecimiento para consumo humano públicos y privados como la NOM-230-SSA1-2002 (CONAGUA, 2019; DOF, 2005).

Las normas correspondientes al suministro de agua potable definen las funciones y las características que debe cumplir el suministro de agua, además de que constituyen la base para que la autoridad competente determine si se está prestando o no el servicio debido. En este aspecto, el marco normativo competente se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Marco normativo de observancia obligatoria en el territorio nacional para el suministro de agua potable de establecimientos públicos y privados (elaboración propia)

Marco normativo	Principio o especificaciones	Descripción
Artículo 115 constitucional	Principio	Quinto título. Menciona las atribuciones y responsabilidades de los estados de la federación. Los municipios, junto con sus ayuntamientos, deben coordinarse para prestar servicios públicos
	Especificaciones	Párrafo III, inciso a. Se establece que los municipios tendrán a su cargo el otorgamiento de los servicios públicos de agua potable, drenaje, alcantarillado, tratamiento y disposición de agua residuales
NOM-230-SSA1-2002, Salud ambiental. Requisitos sanitarios. Procedimientos sanitarios para el muestreo	Principio	Agua para uso y consumo humano. Requisitos sanitarios que se deben cumplir en los sistemas de abastecimiento públicos y privados durante el manejo del agua
	Especificaciones	Establece los requisitos sanitarios que deben cumplir los sistemas de abastecimiento durante el manejo, además de su preservación de la calidad y los procedimientos sanitarios para su muestreo. También la preservación y transporte de las muestras
NOM-127-SSA1-2021, Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de la calidad del agua	Principio	Establece un eficaz control sanitario del agua que se somete a tratamientos de potabilización a efecto de hacerla apta para uso y consumo humano
	Especificaciones	Establece y mantiene actualizados los límites permisibles en cuanto a sus características físicas, químicas, microbiológicas y radiactivas con el fin de asegurar y preservar la calidad del agua que se entrega al consumidor por los sistemas de abastecimiento de agua públicos y privados
NOM179-SSA1-2020, Agua para uso y consumo humano. Control de la calidad	Principio	Control sanitario del agua que se abastece para uso y consumo humano. Se basa en un enfoque de riesgos, priorizando un esquema de caracterización y vigilancia de parámetros de control a partir de la identificación

Marco normativo	Principio o especificaciones	Descripción
del agua distribuida por los sistemas de abastecimiento de agua		inicial de las características fisicoquímicas y bacteriológicas del agua
	Especificaciones	Establece los requisitos y especificaciones que deben observarse en las actividades de control de la calidad del agua, además de realizar y definir la frecuencia de monitoreo en la toma domiciliaria o en la red de distribución

2.1.1. Especificaciones de la NOM-230-SSA1-2002 (DOF, 2005)

De esta norma se tomaron en cuenta los criterios de manejo, preservación y transporte de las muestras de acuerdo con las pruebas a realizar en esta investigación. Las indicaciones se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Preservación de muestras analizadas en la tesis conforme con la NOM-230-SSA1-2002 (DOF, 2005)

Determinación	Material de envase	Volumen mínimo (mL)	Preservación	T. máximo de almacenamiento
Cloruros	Plástico, vidrio	200	Refrigerar de 4 a 10°C y en la oscuridad	48 horas
Dureza total	Plástico, vidrio	100	Adicionar HNO ₃ o H ₂ SO ₄ a pH<2	14 días
Nitrógeno amoniacal	Plástico, vidrio	500	Adicionar H ₂ SO ₄ a pH<2 y refrigerar de 4 a 10°C	7 días
pH	Plástico, vidrio	50	Analizar inmediatamente	----

2.1.2. Especificaciones de la NOM-127-SSA1-2021 (DOF, 2022)

Esta norma se define básicamente en dos cosas:

- a) Los límites permisibles para el agua potable en cuanto a sus características microbiológicas, físicas, organolépticas, químicas y radiactivas
- b) Métodos de prueba

En este apartado se acotó la importancia de la norma en el inciso (a). El agua para uso y consumo humano de los sistemas de abastecimiento debe cumplir con las siguientes especificaciones descritas en las Tablas 3 y 4.

Tabla 3. Especificaciones sanitarias físicas de acuerdo con la NOM-127-SSA1-2021 (DOF, 2022)

Parámetros	Límite permisible	Unidades
pH	6.5 a 8.5	Unidades de pH
Turbiedad	3.0	UNT
Color verdadero	15	UC

Tabla 4. Algunas especificaciones sanitarias químicas de las pruebas realizadas en la metodología de acuerdo con la NOM-127-SSA1-2021 (DOF, 2022)

Parámetros	Límite permisible	Unidades
Dureza total como $CaCO_3$	500	mg/L
Nitrógeno amoniacal ($N - NH_3$)	0.50	mg/L
Sólidos disueltos totales	1000	mg/L

Así mismo, la norma establece otro tipo de especificaciones sanitarias. Metales y metaloides, arsénico y cadmio, fitotoxinas, radioactividad, compuestos residuales de la desinfección y compuestos orgánicos sintéticos.

2.2. FUENTES DE ABASTECIMIENTO

Hacen referencia a los cuerpos de agua (ríos, arroyos, lagos, embalses y agua subterránea) que proveen agua a los suministros de agua potable y pozos privados (CDCP, 2022). Las fuentes de agua se muestran en la Imagen 1 que las clasifica en tres.

Las aguas subterráneas y superficiales se conocen como fuentes convencionales y son preferidas sobre las no convencionales (agua de mar y aguas residuales). Sin embargo, la falta de tratamiento de las aguas residuales ha hecho que las primeras se mezclen con las aguas negras a través del ciclo hidrológico y así las fuentes convencionales día a día experimentan un mayor grado de contaminación. Esto último fue extraído del Manual de Agua Potable, Alcantarillado y Saneamiento, libro 24 (CONAGUA, 2019).

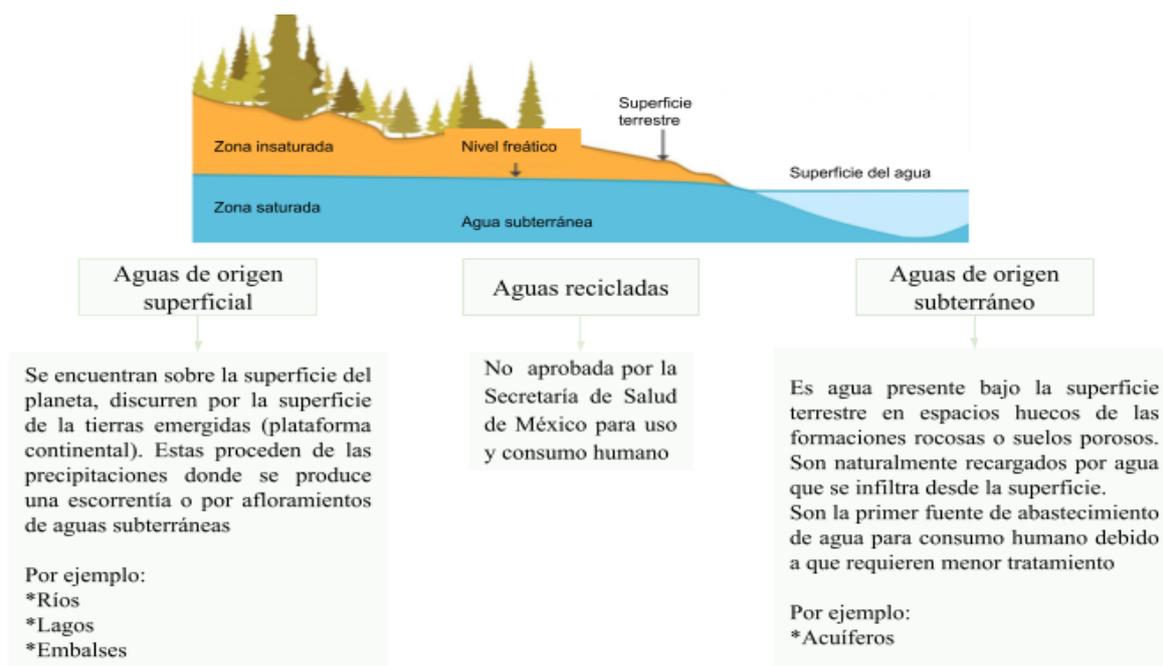


Imagen 1. Esquema de las fuentes de agua y sus principales características. Extraído de *cdc.gov*, *public water systems-water sources* (CDCP, 2022)

En la Tabla 5 se aprecian las diferencias principales entre el agua superficial y aquellas de origen subterráneo.

Tabla 5. Principales diferencias entre las aguas de origen superficial y subterráneo (Degrémont, 2007)

Características examinadas	Aguas superficiales	Aguas subterráneas
Temperatura	Variable según la época del año	Relativamente constante
Turbiedad	Variable, elevada	Baja o nula
Mineralización	Variable de acuerdo con el suelo	Sensiblemente constante
Fe^{2+} y Mg^{2+} en estado disuelto	Generalmente ausente, excepto en aguas eutrofi-zadas	Generalmente presentes
Dióxido de carbono	Generalmente ausente	Normalmente presente en gran cantidad
Oxígeno disuelto	Normalmente próximo a saturación	Ausencia total, en la mayoría de los casos
Amonio	Presente en aguas conta-minadas	Presencia frecuente, sin ser índice de contamina-ción
Ácido sulfhídrico	Ausente	Normalmente presente
Sílice	Contenido moderado	Contenido normalmente elevado

Características examinadas	Aguas superficiales	Aguas subterráneas
Nitratos	Poco abundantes en general	Contenido a veces elevado
Microorganismos	Bacterias (algunas patógenas), virus, plancton	Bajo contenido microbiano por escasez de nutrientes

2.2.1. Agua de origen subterráneo

El agua de origen subterráneo se forma a partir del agua que precipitó y percoló al suelo por acción de la gravedad hasta alcanzar un estrato impermeable (CONAGUA, 2019). Es decir, fluye a través de la zona no saturada y alcanza el nivel freático, el cual consiste en una superficie imaginaria debajo del terreno que separa la zona insaturada de la saturada y esta última área es donde se encuentra el agua subterránea (IGRAC, 2001). Está contenida en un espacio que se llama “acuífero”. Los acuíferos pueden estar constituidos de diferentes materiales, por ejemplo, arena suelta, rocas permeables sedimentadas como piedras de arena o piedras de lodo, lava volcánica fracturada, rocas cristalizadas, etcétera haciendo que el agua sea naturalmente filtrada (IGRAC, 2001).

Cuando el agua subterránea llega a un acuífero, no se queda quieta debido a la gravedad normalmente sigue fluyendo, aunque la rapidez con la que fluye depende de las características altitudinales del acuífero. El agua subterránea se moverá hasta que se descargue en otro acuífero u otro cuerpo de agua o hasta que se extraiga a través de un pozo (CONAGUA, 2019).

Por lo general, los acuíferos, por estar cubiertos, presentan una buena calidad de agua, libre de sólidos suspendidos con excepción de las áreas donde la infiltración de agua contaminada ocurre muy rápidamente o en un corto trayecto. También su calidad depende de la capacidad del agua para disolver compuestos del suelo mientras fluye al infiltrarse o durante su almacenamiento (que puede ser hasta de cientos o miles de años). Por ello, el agua de origen subterráneo contiene un mayor número de iones disueltos, entre los que se encuentran cationes (calcio, magnesio, sodio, potasio, hierro, manganeso, arsénico, metales pesados, entre otros) y aniones (carbonatos, bicarbonatos, sulfatos, cloruros, cianuros, entre otros). Estos

componentes se reflejan en problemas para el abastecimiento, como los que ocurren por aguas duras, conductividad eléctrica elevada y alteraciones estéticas ocasionadas por el hierro (Fe) y el manganeso (Mn) (CONAGUA, 2019).

2.2.2. Pozo de la Planta Potabilizadora en Tláhuac

Parte del abastecimiento de la planta potabilizadora de Tláhuac se obtiene del agua extraída de un pozo, el cual está localizado en el interior del terreno de la misma planta (Imagen 2). Un estudio realizado en el año 2019 por una dependencia gubernamental (IMTA) obtuvo el siguiente diagnóstico del agua de ese pozo, el cual mostró problemas de nitrógeno amoniacal (22.3 mg/L), sólidos disueltos totales (3300 mg/L), sodio (875 mg/L), cloruros (594 mg/L), turbiedad (> 10 UNT) y color verdadero (>70 U Pt-Co). Este último parámetro resalta y se asocia en este caso a la alta concentración de materia orgánica (carbono orgánico total, 42.56 mg COT/L) que, aunque no está regulada por la NOM 127 (DOF, 2021), presenta valores muy altos para una fuente de abastecimiento de agua potable.



Imagen 2. Pozo de la planta potabilizadora en la demarcación territorial Tláhuac, CDMX (elaboración personal)

Anteriormente se mencionó que la contaminación de los cuerpos de agua puede ser debida a ciertos factores. Estos ponen en serios problemas a las plantas de tratamiento de agua potable (PTAP) ya que estas usan tratamientos convencionales como cribado, coagulación/floculación, filtración y cloración/fluoración. Estos

procesos de tratamiento no tienen la capacidad para tratar eficazmente contaminantes complejos, por lo que resulta viable la implementación de tratamientos biológicos efectivos.

2.3. LOS MICROORGANISMOS USADOS COMO TRATAMIENTO DE POTABILIZACIÓN

En la literatura se mencionan las nuevas tecnologías para la tratabilidad del agua, en las que se utilizan los microorganismos, comúnmente llamada biorremediación (Abatenh et al., 2017). Los microorganismos son un grupo grande y diverso y son utilizados debido a que pueden llevar a cabo procesos metabólicos de reproducción, generación de energía, entre otros, de manera más rápida que los organismos de otros reinos. Típicamente, la biorremediación está basada en la acción de co-metabolismo de una sola cepa o de un consorcio de microorganismos (Nicolaou et al., 2010), pudiendo ser usados en sus formas naturales. Estos consorcios pueden incluir a las bacterias, las arqueas, las algas, los hongos, los protozoarios e incluso los virus (Demain y Adrio, 2008; Madigan et al., 2015).

La biorremediación, puede ser definida como la habilidad de algunas biomoléculas o tipos de biomasa para quelar y/o concentrar ciertos iones u otras moléculas donde estos pueden reaccionar con ligandos biogénicos y precipitar. Dicha técnica muestra gran potencial para un desarrollo futuro debido a su compatibilidad ambiental y su posible rentabilidad (Coelho et al., 2015).

Los microorganismos también pueden descomponer o transformar sustancias peligrosas en metabolitos menos tóxicos o degradarlos en productos no tóxicos y pueden sobrevivir en ambientes contaminados porque son metabólicamente capaces de consumir los contaminantes como posibles fuentes de energía (Coelho et al., 2015) y generar biomasa con fines comerciales (Hernández y Labbé, 2014). Aunque, en ciertos procesos los contaminantes generan poco o ningún beneficio a la célula y no se encuentra ningún valor agregado a su composición (Kumar et al., 2011; Wasilkowski et al., 2012).

Algunas tecnologías emergentes de tratamientos biológicos apuntan al desarrollo de cultivos de microalgas. El diseño de estos sistemas para la producción de microalgas o de cualquier otro consorcio de microorganismos debe tomar en cuenta diversos factores importantes como la biología del microorganismo, el área de cultivo, la luz, el suministro de nutrientes, la energía, el dióxido de carbono, el pH del medio, la temperatura y los metabolitos finales (Pacheco et al., 2020). La biología de los microorganismos es un factor importante en los tratamientos biológicos, ya que existen numerosas clasificaciones, por ejemplo, los microorganismos extremófilos son capaces de vivir bajo condiciones extremas de temperatura, pH, presión, salinidad, radiación o sus combinaciones, proporcionando herramientas invaluable para su aplicación en una amplia gama de procesos biotecnológicos y permitiendo el manejo racional de los recursos naturales (Oliart-Ros et al., 2016; Madigan et al. 2015).

A continuación, en la Imagen 3, se muestra una gráfica con la proporción encontrada de los microorganismos usados para la biorremediación.

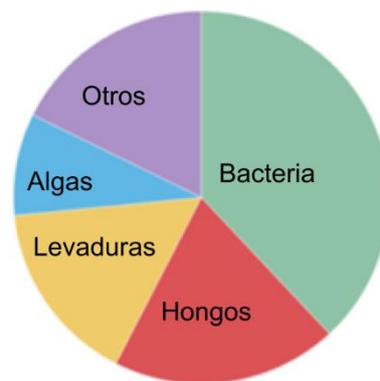


Imagen 3. Tipos de microorganismos usados en los procesos de biorremediación (Coelho et al., 2015)

Los microorganismos utilizados en la biorremediación de acuerdo con la proporción ilustrada anteriormente son: Bacterias como *Arthrobacter* spp., *Pseudomonas veronii*, *Burkholderia* spp., *Kocuria flava*, *Bacillus cereus* y *Sporosarcina ginsengisoli*. En el caso del reino fungi algunos de los microorganismos utilizados son: *Penicillium canescens*, *Aspergillus versicolor* y *Aspergillus fumigatus*. Levaduras como: *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis* por mencionar algunas y finalmente las algas, como: *Cladophora fascicularis*, *Spirogyra* spp., *Cladophora* spp., *Spirogyra* spp.

(Coelho et al., 2015). Otras especies generalmente empleadas son las microalgas pertenecientes a los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus*. También se ha reportado el uso de la microalga *Nannochloris* sp. y el de cianobacterias filamentosas como *Fischerella*, *Phormidium* y *Arthrospira maxima* (Abatenh et al., 2017).

Si bien el grupo de las microalgas no se muestra de manera predominante, el interés hacia este grupo de microorganismos se ha incrementado debido a investigaciones como la de Ferrera-Cerrato et al. (2006). En ellas se reportan que el aumento en la concentración de biomasa de las cianobacterias y las microalgas es inversamente proporcional a la concentración de la demanda química de oxígeno (DQO) y de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO). Es decir, son capaces de biotransformar y bio-degradar contaminantes que se encuentran en aguas naturales y residuales. Así como también, se han reportado otros mecanismos para la reducción de contaminantes como son la competencia de nutrientes (la cual se define como la demanda simultánea de los mismos recursos por dos o más poblaciones microbianas), un aumento del pH debido al consumo de CO₂, las toxinas producidas por algas y la adhesión o unión de los contaminantes a la pared celular de las algas (Ahmad et al., 2013).

A parte de la reducción de contaminantes, la biomasa generada puede tener un valor agregado, siempre que sea inocua, ya sea como alimentos destinados para acuicultura, suplementos alimenticios para animales o para servir como materia prima de productos farmacéuticos, o bien ser cosechada para la producción de biodiesel (Ahmad et al., 2013; Chen, 1996; Ferrera-Cerrato et al., 2006).

Los cultivos de algas para el tratamiento de agua iniciaron en la década de 1970. Inicialmente se cultivaron en estanques de aguas residuales para tratar influentes secundarios y así evitar la eutrofización. Una de las microalgas más ampliamente utilizada para tratar las aguas residuales o con composición compleja fue la microalga *Chlorella*, ya que elimina el nitrógeno, el fósforo, la DBO y la DQO de manera eficiente con diferentes tiempos de retención celular que van desde 10 horas hasta 42 días (Ahmad et al., 2013; Wang et al., 2010).

2.4. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA MICROALGA *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris pertenece al grupo de las microalgas, las cuales son un grupo diverso de microorganismos unicelulares, existiendo alrededor de 300,000 especies diferentes en el planeta, de las cuales solamente se han descrito alrededor de 40,000 (Hu et al., 2008). Tienen una similitud con las cianobacterias ya que la microalga más antiguamente conocida pertenece al grupo de las cianobacterias (Safi et al., 2014).

La mayoría de las microalgas son fotoautótrofas, esto quiere decir que la luz es su fuente de energía (En un rango de λ de 400 nm a 700 nm) y el CO₂ es su fuente de carbono (Prieto, 2020). En otras palabras, realizan la fotosíntesis. Este proceso convierte la energía lumínica absorbida en energía de tipo químico, la cual es utilizable para el desarrollo y crecimiento celular. El NADPH y el ATP son las moléculas en las que se realiza el intercambio para generar la energía química. La fotosíntesis se puede expresar como una reacción de óxido-reducción promovida por la energía de la luz, en la que agua y CO₂ se convierten en oxígeno e hidratos de carbono. Entonces, la estequiometría de la fotosíntesis permite calcular la relación entre: CO₂ fijado, O₂ liberado y glucosa generada: $6 \text{ CO}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O} + \text{luz (energía)} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2$ (Prieto, 2020).

En la Imagen 4 se presenta la propuesta que le valió el Premio Nobel a Calvin (Wikipedia, 2022) la cual consiste en una serie de procesos bioquímicos que se realizan en el estroma de los cloroplastos de los organismos fotosintéticos.

C. vulgaris requiere nutrientes para su crecimiento. La fuente de carbono inorgánico puede utilizar iones de bicarbonato (HCO₃⁻) o dióxido de carbono, que será absorbido mediante una enzima llamada carbono hidrolasa (CA). También requiere específicamente de otros nutrientes como fosfato y nitrógeno. Se reporta que *C. vulgaris* tiene un comportamiento inversamente proporcional con el desarrollo de la densidad celular y la concentración de carbono inorgánico total, que decrece dentro de las 96 h, indicando la reacción de fotosíntesis activa. El pH incrementa en la fase de adaptación a la fase de crecimiento debido a que se producen iones hidroxilo

(OH⁻), donde los iones de bicarbonato son consumidos por la fotosíntesis dentro de la célula de la microalga, siguiendo la reacción: $\text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CO}_2 + \text{OH}^-$ (Kim et al., 2010).

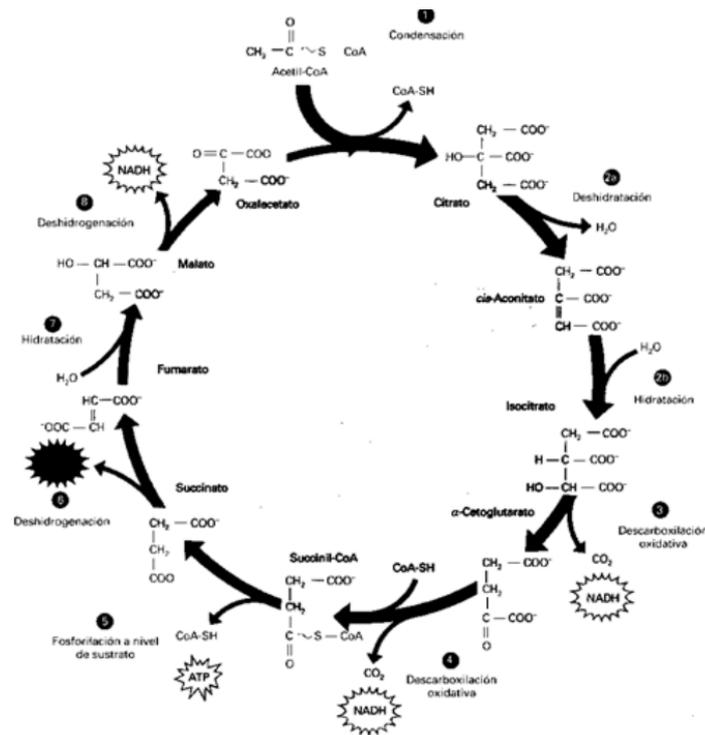


Imagen 4. Ciclo del ácido cítrico. Reacciones, rendimiento energético y regulación (Mathews y van Holde, 1999)

Por último, de acuerdo con diversas fuentes, debido a las características de crecimiento de *C. vulgaris* se le puede encontrar con *Arthrospira maxima* en el mismo nicho ecológico y, por ende, es difícil aislar exitosamente un microorganismo del otro.

2.4.1. Morfología

Chlorella vulgaris es una microalga unicelular de color verde, de forma esférica, no posee flagelo y se encuentra presente en la mayoría de los cuerpos de agua dulce. El color verde lo obtiene de los cloroplastos, los cuales contienen los fotosintetizadores clorofila a y b, que son las estructuras encargadas de realizar la fotosíntesis. Mediante la fotosíntesis se multiplica rápidamente, requiriendo luz solar, carbono inorgánico, agua y minerales (studylib.es).

En la Imagen 5 se muestra la estructura esquemática de *C. vulgaris* que ilustra los distintos organelos.

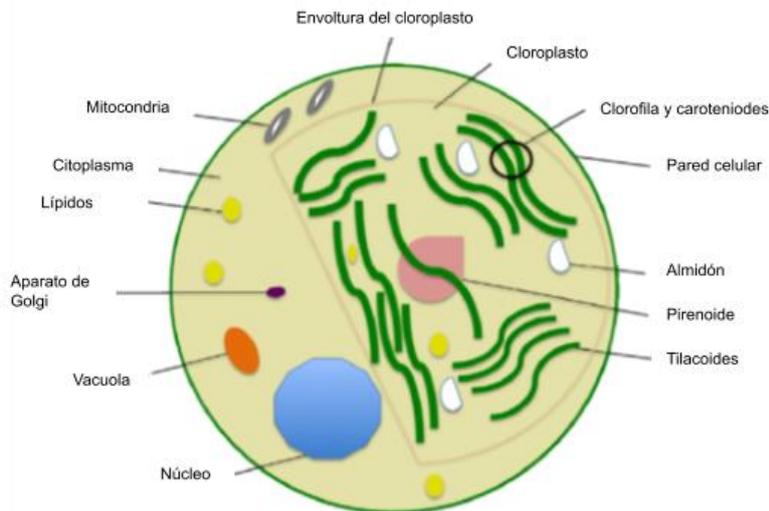


Imagen 5. Estructura esquemática de *C. vulgaris* que ilustra distintos organelos (Safi et al., 2014)

La rigidez de su pared celular, compuesta por glucosamina, preserva la integridad de la célula y es básicamente una protección contra invasores y ambientes hostiles, la cual varía dependiendo de la fase de crecimiento en la que se encuentre. Así, por ejemplo, en sus formaciones tempranas su pared celular es frágil (capa unilaminar densa en electrones de 2 nm de grosor) y en su etapa de maduración aumenta el espesor de su pared celular (17-21 nm de espesor) (Safi et al., 2014). La composición y espesor de la pared celular puede cambiar de acuerdo con las condiciones ambientales a las que esté sometida.

En el caso de su citoplasma, el cual alberga los organelos internos de *C. vulgaris* como el núcleo, vacuolas, su cloroplasto, el aparato de Golgi y la mitocondria, está compuesto por agua, proteínas solubles y minerales.

C. vulgaris tiene un solo cloroplasto con una membrana de doble envoltura compuesta por fosfolípidos; la membrana externa es permeable a metabolitos y algunos iones mientras que la membrana interna tiene la función específica del transporte de proteínas. Además, es el sitio donde se sintetiza el pigmento dominante, la clorofila. El pirenoide contiene altos niveles de ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa (compuesto conocido como RuBisCO) y es el centro de la fijación del dióxido de carbono.

2.4.2. Reproducción

C. vulgaris es una célula reproductiva no móvil (*autospora*), la cual se reproduce asexual y rápidamente. De este modo, dentro de un periodo de 24 horas una célula de *C. vulgaris* se multiplica en las condiciones de reproducción óptimas mediante auto-esporulación.

De esta manera, cuatro células hijas están formando su propia pared celular dentro de la pared celular de la célula madre. Después de la maduración de estas nuevas células formadas, la pared celular de la madre se rompe permitiendo la liberación de las células hijas (Imágenes 6 y 7) y los restos de la célula madre son consumidos como alimento para las nuevas células hijas formadas.

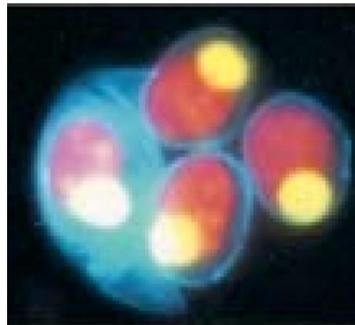


Imagen 6. Nueva célula formada emergiendo del interior de la célula madre después de la eclosión (Safi et al., 2014)

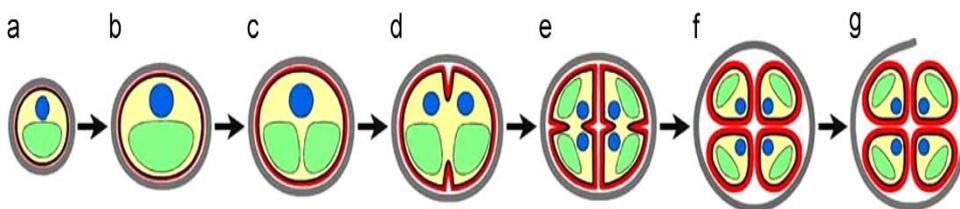


Imagen 7. Dibujo que muestra las diferentes fases de la formación de la pared celular hija en *C. vulgaris*: (a) fase temprana de crecimiento celular; (b) fase tardía de crecimiento celular; (c) cloroplasto, fase divisoria; (d) fase temprana de división de protoplastos; (e) fase de división tardía del protoplasto; (f) fase de maduración de las células hijas y (g) fase de eclosión (Safi et al., 2014)

2.4.3. Producción y cosecha

C. vulgaris tiene una tasa de reproducción rápida y responde a cada conjunto de condiciones de crecimiento. Es notablemente resistente a condiciones desfavorables

e invasores, pero su desempeño depende de la técnica con la que se cultive. Las distintas técnicas de proliferación se muestran en las Tablas 6 y 7.

Tabla 6. Técnicas de proliferación de *C. vulgaris* (Safi et al., 2014)

Desarrollo autótrofo	Sistemas de estanques abiertos	Se categoriza en lagos, lagunas y estanques artificiales, naturales o aguas residuales. Construidos usualmente cerca de plantas industriales las cuales generan una gran descarga de CO ₂ , que es reabsorbido por la biomasa, además capta nitrógeno en forma de NO _x de la atmósfera Permite la exposición de la microalga a la luz, (profundidad de <50 cm) pero, requiere de control ambiental para evitar el riesgo de contaminantes, evaporación de agua y microorganismos invasores
	Fotobio-reactor cerrado	Este se lleva a cabo en un ambiente controlado (pH, intensidad lumínica, temperatura y concentración de CO ₂) para obtener mayor concentración celular. Además se utilizan luces fluorescentes en caso de que la luz natural no sea la suficiente
Desarrollo heterótrofo		Esta técnica no requiere de un suministro de luz y es alimentada con fuente de carbono orgánico. La producción se lleva a cabo en tanques bio-reactores ¹ , donde se obtiene un mayor grado de desarrollo de la biomasa La fuente de carbono usada puede ser glucosa, acetato, glicerol, glutamato. La desventaja de esta técnica de producción es la disponibilidad de los glúcidos u otras fuentes de carbono
Desarrollo mixótrofo		Mediante la combinación de ambas técnicas, ya sea por medio de la fotosíntesis o por el consumo de carbono orgánico. Por lo tanto, las células no son estrictamente dependientes de la luz o sustratos orgánicos para su crecimiento Limita la pérdida de biomasa durante la "fase oscura de la biodegradación" y la reducción de la cantidad de sustrato

Tabla 7. Técnicas de cosecha de *C. vulgaris* (Safi et al., 2014)

Técnica	Descripción
Centrifugación	Se realiza a 5,000 rpm durante 15 minutos, tiene una eficiencia del 95% de recolección La morfología de <i>C. vulgaris</i> permite estas condiciones de centrifugación sin dañar su estructura durante el proceso. Otras técnicas implementan la floculación, flotación y filtración o una combinación para obtener mejores resultados
Floculación	Durante el desarrollo exponencial, por su carga eléctrica negativa, las células se mantienen dispersas. Después de alcanzar la fase estacionaria o la fase de muerte, la carga negativa decrece permitiendo un agregado de células las cuales resultan en un proceso llamado auto-floculación. Este fenómeno está asociado con un pH elevado por la asimilación de CO ₂ , nitrato y fosfato

¹ La palabra biorreactor es correcta. La palabra fermentador se refiere única y exclusivamente a los biorreactores que producen alcohol etílico empleando glucosa como fuente de carbono y *Saccharomyces cerevisiae* como el microorganismo productor (nota de una persona del jurado)

Técnica	Descripción
Flotación	Este método consiste en atrapar células utilizando micro-burbujas de aire; puede ocurrir también de forma natural cuando el contenido de lípidos de la microalga aumenta
Filtración	Debido al tamaño de <i>C.vulgaris</i> la filtración convencional no es un método adecuado para ser aplicado, en cambio la ultrafiltración o micro-filtración es más eficiente

2.4.4. Composición primaria

C. vulgaris es un alga unicelular que es conocida como una de las microalgas de mayor proliferación. Incluye, en base seca, 14-22% de lípidos, 51-58% de proteína, 12-7% de carbohidratos y 4-5% ácidos nucleicos (Kim et al., 2010).

Otra fuente, Safi et al. (2014), reportan que el total de proteínas en una célula madura de *C. vulgaris* representa del 42 al 58% de la biomasa en base seca y varía de acuerdo con las condiciones de proliferación. En el caso de los lípidos, durante las condiciones de desarrollo óptimo *C. vulgaris* puede alcanzar del 5 al 40% de lípidos de la masa seca de la biomasa y esta fracción está compuesta principalmente por glucolípidos, ceras, hidrocarburos, fosfolípidos y pequeñas cantidades de ácidos grasos libres. En el caso de los carbohidratos, el almidón es el poliglúcido más abundante en *C. vulgaris*. Este se localiza generalmente en el cloroplasto y está compuesto por amilosa y amilopectina y, junto con los monoglúcidos, sirven como reservorio de energía para la célula. Durante etapas de limitación de nitrógeno, los carbohidratos totales pueden alcanzar del 12 al 55% de la masa seca.

Otro compuesto que impacta a la composición de *C. vulgaris* es la clorofila, el cual es el pigmento más abundante y representa del 1 al 2% de la masa seca. Además, contiene minerales como microelementos (Na, K, Ca, Mg y P), macroelementos (Cr, Cu, Zn, Mn, Se, I, Fe) y vitaminas (A, B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₇, B₉, B₁₂, C y E) (Safi et al., 2014).

2.5. PARÁMETROS DE PROLIFERACIÓN

Los factores más importantes para lograr una producción de microalgas a escala comercial es que el desarrollo de los sistemas de cultivo sea económica y

ambientalmente factible (González-Delgado et al., 2017; Richmond, 2004), a partir de parámetros como el pH, la temperatura, la intensidad de la luz y la concentración de nutrientes (Moreno-Galván et al., 2012).

Una alternativa es el uso de cultivos mixotróficos, en los que la cantidad de luz reduce la producción de biomasa en comparación con los cultivos heterótrofos (Estévez et al., 2013), además de inducir la producción de macromoléculas de alto valor, gracias al efecto regulatorio de la luz (Li et al., 2007). Sin embargo, aunque este tipo de cultivo es económicamente viable, se requiere de una fuente de carbono de bajo costo y del conocimiento de las concentraciones de experimentación más favorables (Martins et al., 2016), debido a que ciertos cambios en los nutrientes del medio pueden aumentar o inhibir la tasa de desarrollo de las algas (Bhola et al., 2011; Estévez et al., 2013).

Chlorella vulgaris es una microalga mixótrofa que se adapta a distintas condiciones. Es un microorganismo que soporta valores de pH de 7 y un rango de temperatura ambiental de 10 a 25°C ± 2°C (Bhola et al., 2011). Según Hernández y Labbé (2014) el valor del pH de proliferación tiene un valor mínimo de 8.25 ± 0.24 y un máximo de 9.81 ± 0.14 y Ramos y Pizarro en 2018 reportaron que la mayor reproducción experimentada por *C. vulgaris* se encontró en un rango de pH de 8.0 a 9.0. Por otro lado, Laing y Ayala (1990) y Richmond (2004) mencionaron que los valores de temperatura de proliferación óptima llegan a 36°C.

C. vulgaris requiere de iluminación de lámparas con un ciclo de luz-oscuridad 12-12 horas. También deben proporcionársele fuentes de nitrógeno, fósforo y carbono, además de necesitar un suministro de aire continuo por burbujeo o agitación con el fin de proveer aire a los cultivos y garantizar que todas las células estén expuestas a la luz y a los nutrientes del medio (González-Delgado et al., 2017).

2.5.1. Curva de crecimiento de *Chlorella vulgaris*

En cualquier grupo microbiano en un nicho ambiental la supervivencia está influenciada por la exitosa competencia de nutrientes y por el mantenimiento de un acervo de todas las células vivas. Así, si un volumen fijo de un medio líquido se inocula con células microbianas provenientes de un cultivo que ya ha crecido hasta la saturación y se determina y grafica de forma periódica el número de células viables

por mililitro se obtiene de manera general una curva como la que se muestra en la Imagen 8, a la que se conoce como cultivo discontinuo, el cual es un sistema cerrado con recursos finitos (Carroll et al., 2016).

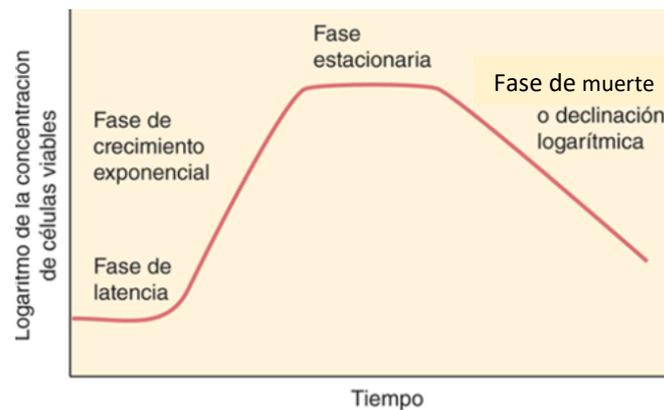


Imagen 8. Curva de reproducción en cultivos discontinuos (Carroll et al., 2016)

En un estudio realizado con *C. vulgaris* por Ramos y Pizarro (2018) se tomaron en cuenta condiciones internas, las cuales fueron controladas por equipos y condiciones externas. En condiciones internas se obtuvo una relación lineal entre los días de estancia en el cultivo control que era un medio enriquecido selectivo. En el caso de las condiciones externas también se obtuvo una relación lineal, aunque de menor coeficiente de determinación, debido a que las condiciones externas eran más difíciles de controlar como la temperatura, la intensidad de luz y los ciclos de luz-oscuridad (Ramos y Pizarro, 2018).

2.5.2. Modelo cinético de Monod

La evaluación de la cinética de proliferación de células de microorganismos, animales o vegetales constituye un aspecto fundamental en el diseño, operación, simulación y predicción del comportamiento de los reactores biológicos. Uno de los modelos empleados con mayor frecuencia es el modelo de Monod para relacionar el efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad específica de formación de biomasa (Calderón, 2017; Duarte, 1996).

La ecuación lleva el nombre de Jacques Monod, quien propuso usar una ecuación para relacionar las tasas de crecimiento microbiano en un ambiente acuoso con la concentración de un nutriente limitante. Tiene la misma forma que la ecuación de

Michaelis y Menten, pero se diferencian en que la de Michaelis y Menten está basada en consideraciones teóricas mientras que la de Monod es empírica (Alcón, 1999; Duarte, 1996).

El modelo de Monod (Ecuaciones 1 y 2) describe la interacción entre el aumento de microorganismos en un cultivo por lotes y la utilización del sustrato limitante del crecimiento en aquellos sistemas donde prácticamente todo el sustrato es transformado en biomasa:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{\mu_M(s,x)}{K_s+s} \quad \dots \text{Ecuación [1] de Monod para el crecimiento de biomasa (Duarte, 1996)}$$

$$\frac{ds}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dx}{dt} \quad \dots \text{Ecuación [2] de Monod para el consumo de sustrato (Duarte, 1996)}$$

donde, $Y_{x/s}$ es el factor de rendimiento de sustrato en producto, (g células)*(g sustrato)⁻¹; s: concentración del sustrato limitante, g/litro; x: concentración de biomasa, (g células secas* Litro⁻¹; μ_M : velocidad específica máxima de crecimiento, (hora)⁻¹; K_s : constante de saturación, g/litro; K_s : concentración del sustrato correspondiente a una velocidad específica de crecimiento igual a $\mu_M/2$ (Duarte, 1996). En 1942, Monod, desarrolló una ecuación muy simple para representar los procesos biológicos. Para ello supuso que, si bien pueden existir muchos sustratos, uno de ellos será el limitante. En este modelo se supone que la producción de biomasa depende exclusivamente de la concentración de este sustrato limitante. Para una reacción biológica del tipo $\alpha s \rightarrow \gamma X$, la velocidad de crecimiento de biomasa puede representarse como sigue:

$$\mu = \mu_{max} \frac{(s)}{s+K_s} \quad \dots \text{Ecuación 3. Velocidad de reacción biológica (reacción única) (Loyola, 2018)}$$

donde μ_{max} =velocidad específica de crecimiento máxima, h⁻¹; K_s =constante de saturación, g/L y s=concentración de sustrato limitante, g/L.

En el siguiente capítulo se presenta la metodología seguida para alcanzar los objetivos establecidos.

CAPÍTULO III METODOLOGÍA

La metodología empleada para esta investigación se presenta esquematizada en la Imagen 9, la cual consta de 8 etapas. Además, se muestra el proceso al que se sometió el agua de pozo, después de la biorremediación y las pruebas que se realizaron.

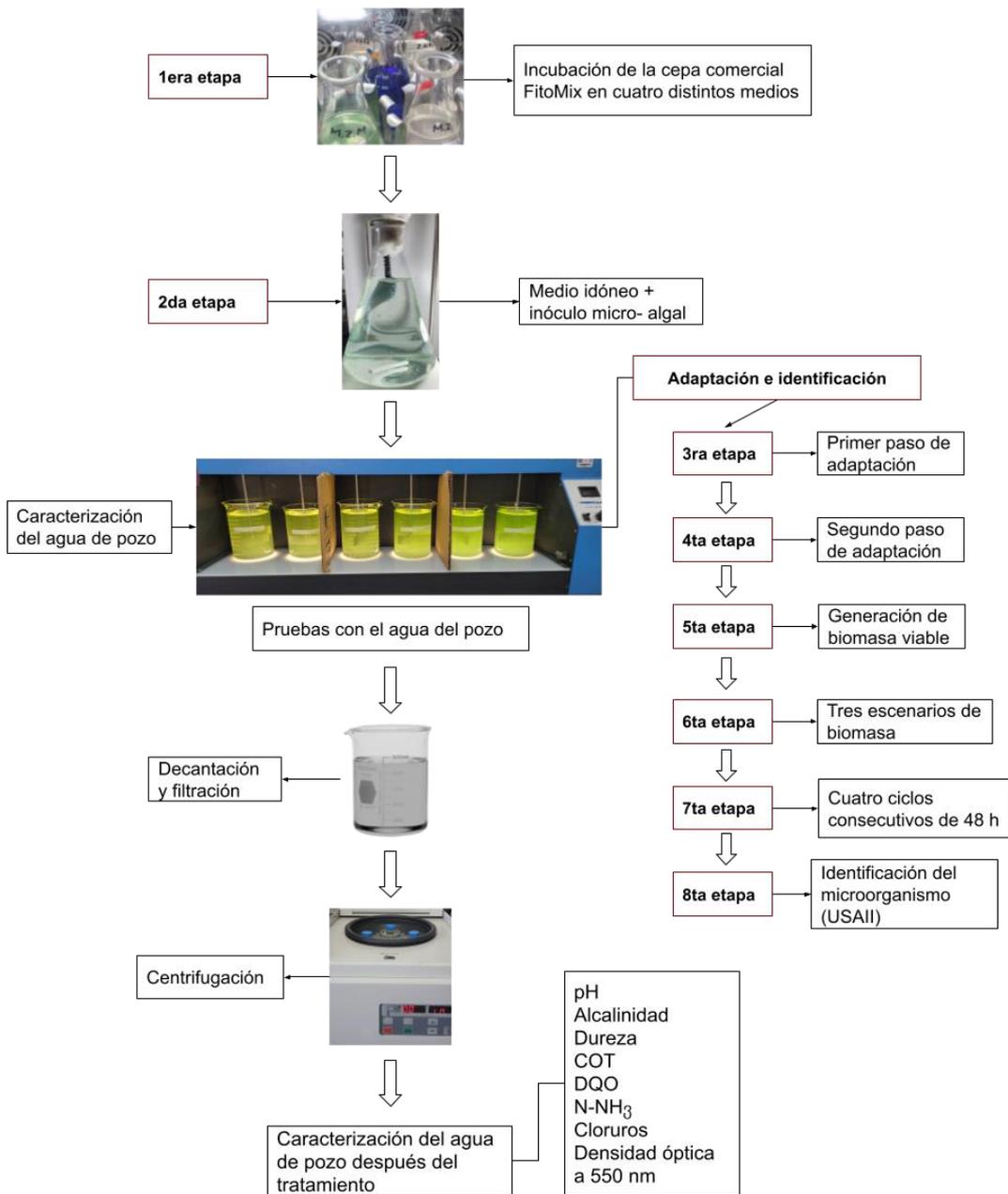


Imagen 9. Diagrama general de la metodología realizada (elaboración propia)

3.1. MUESTRA

El agua del pozo seis de la planta potabilizadora en estudio se trajo a los laboratorios y allí se almacenó en refrigeración a $5\pm 2^{\circ}\text{C}$. Se caracterizó midiéndole el pH, la alcalinidad, la dureza total, el nitrógeno amoniacal, los cloruros, la DQO, el COT y la densidad óptica a 550 nm. Las muestras se analizaron por duplicado con excepción del pH por triplicado y el COT con una sola muestra. Un primer lote se usó para las etapas 3 a 5. Para continuar con la investigación se trajo un segundo lote que se usó para las etapas 6 y 7.

Para la caracterización del agua de pozo se tomaron en cuenta los cloruros. Es importante mencionar que la nueva NOM-127-SSA1-2021 ya no presenta límites para los cloruros. Para esta investigación se consideró el límite planteado en su versión anterior, NOM-127-SSA1-1994 (DOF, 2000).

En cuanto a la demanda química de oxígeno se usa primordialmente para las aguas residuales; sin embargo, puede usarse también para el agua potable. La única norma que actualmente contempla esta variable es la NOM-001-SEMARNAT-2021 (DOF, 2022). El valor que se usó como control fue el establecido por la Comisión Nacional del Agua para aguas superficiales no contaminadas (CONAGUA-SEMARNAT, 2009).

3.2. INÓCULO

El inóculo utilizado para esta investigación fue una cepa comercial de microalga *Spirulina maxima* para iniciar un cultivo (marca FitoMix). Era una unidad de 500 mL en suspensión acuosa en medio Zarrouk, de acuerdo con las especificaciones del fabricante. En el ANEXO 5 se encuentra la composición de este medio.

En un inciso subsecuente se describe lo señalado en la Imagen 9 como la Etapa 1 de los cuatro medios de cultivo empleados en esta investigación para encontrar el idóneo. También en el ANEXO 5 se encuentra su composición.

3.3. MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS Y SECUENCIA EXPERIMENTAL

En la primera etapa se colocaron los cuatro medios de cultivo con diferentes formulaciones tomadas de la literatura (Shi et al., 2016; Silos, 2021) para seleccionar el medio más adecuado para la proliferación de la cepa. Adicionalmente, se preparó un medio más, un quinto medio, con la misma formulación que el medio Zarrouk con fertilizante, pero en lugar de colocar el reactivo KNO_3 se adicionó NH_4Cl . En la Tabla 8 se describe la composición química y las cantidades utilizadas para dichos medios de cultivo. En el ANEXO 5, como se mencionó antes, se describe con precisión lo que se adicionó realmente a los medios de cultivo estudiados.

Tabla 8. Formulación de los medios de cultivo para el crecimiento del consorcio

Reactivos químicos	Medios seleccionados [g/L]				
	Zarrouk con fertilizante	Zarrouk modificado con fertilizante	RM6		Conway
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	0.2	0.15	$(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$	2.1
NaCl	1	5	0.5	ZnCl_2	2.1
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.04	---	0.04	MnCl_2	0.36
NaNO_3	2.5	---	2.5	NaNO_3	100
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01	---	- -	CoCl_2	2.1
NaHCO_3	16.8	8.0	8.0	CuSO_4	2.1
KH_2PO_4	0.41	---	- -	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	20
EDTA	0.08	---	- -	EDTA	45.0
KNO_3	- -	2.0	- -	H_3BO_4	33.6
K_2SO_4	1.00	0.1	- -	-	- -
CaCl_2	0.04		- -	-	- -
KCl	- -	- -	0.898	-	- -
Fertilizante*	1.0	1.0	1.25	-	- -
Referencia	Shi et al., 2016; Silos, 2021				

*Fertilizante, 17-17-17: 17% Nitrógeno total (no especificado en el producto), 17% P_2O_5 , 17% K_2O .

Los medios tienen diferencias en las cantidades de reactivo y en sus principales fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo como se ve en la Tabla 9.

Tabla 9. Diferencia en las principales fuentes de nutrientes de los medios de cultivo seleccionados

Medio	Fuente de carbono	Fuente de nitrógeno	Fuente de fósforo
Zarrouk con fertilizante	$NaHCO_3$, 16.8 g/L	$NaNO_3$, 2.5 g/L y fertilizante, 1 g/L	KH_2PO_4 , 0.41 g/L y fertilizante, 1 g/L
Z. modificado con fertilizante	$NaHCO_3$, 8 g/L	KNO_3 , 2 g/L y fertilizante, 1 g/L	Fertilizante, 1 g/L
RM6	$NaHCO_3$, 8 g/L	$NaNO_3$	Fertilizante, 1.25 g/L
Conway	---	$(NH_4)_2MoO_4$, 100 g/L y $NaNO_3$, 2.1 g/L	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 20 g/L

A los medios se les realizaron modificaciones en su formulación. Por ejemplo, el medio Zarrouk (Shi et al., 2016) lleva en su formulación elementos traza los cuales en esta investigación se intercambiaron por el fertilizante inorgánico granulado "17-17-17" para uso doméstico de la marca Vigoro. El medio Zarrouk modificado se realizó de conformidad con lo descrito por Silos (2021); sin embargo, hay otras variantes como la reportada por Rojas et al., en 2012. Los medios también sufrieron modificaciones de acuerdo con la disponibilidad de reactivos en el Laboratorio 301, como fue el caso del medio RM6 el cual contiene super-fosfato simple o en el medio Zarrouk modificado que tiene el difosfato de amonio en su composición descrita por Silos (2021) y los cuales se remplazaron por fertilizante (N_2 total, P_2O_5 , K_2O) [Ver ANEXO 5].

Una vez que los medios se pusieron en los matraces, se inoculó con 1.0 mL de la cepa comercial micro-algal FitoMix. Los matraces se colocaron dentro de una incubadora y se sometieron a condiciones determinadas con agitación de 40 rpm, luz blanca (lámpara de 100 W) y temperatura de 35°C constantes. El lapso de estudio fue de dos semanas, ya que, al llegar a ese tiempo, la biomasa algal se había lisado y por ello se suspendió el experimento. En esta etapa, el desarrollo del consorcio se observó de manera cualitativa por medio de la coloración de la solución y mediante la toma de una gota de medio que se colocó en un portaobjetos y se visualizó en un

microscopio Olympus CH30 con un objetivo de 10 X, evaluando la abundancia subjetivamente.

La segunda etapa fue el escalamiento a 2 L de capacidad en un matraz Erlenmeyer. Se vertieron 2 L del medio que diera los mejores resultados y se inoculó nuevamente con FitoMix con 10 mL. Se acondicionó con agitación de 50 rpm y luz blanca con una lámpara de 150 W constantes por un periodo de 27 días. Durante este periodo se hizo el seguimiento del pH y se estableció que el valor de pH se mantuviera en un intervalo entre 7 a 9. El sistema se alimentó con $NaHCO_3$ o con ácido cítrico cada vez que el valor de pH se encontraba fuera del intervalo deseado, por arriba o por debajo del límite superior. La cantidad colocada fue la necesaria para reducir el pH una unidad y así nivelar los valores del pH dentro del intervalo deseado. Este lapso de 27 días se debió a que hubo días feriados en la UNAM y no se contaba con apoyo logístico por lo que se mantuvo el sistema.

Una vez alcanzada una concentración de biomasa suficiente, se recuperó la biomasa mediante filtración en un tamiz de 90 hilos, con una apertura aproximada de 0.160 mm. Después, la biomasa se centrifugó a 3,000 rpm durante 15 minutos en una centrifuga Sol-Bat. Esta biomasa recuperada se evaluó preliminarmente con el agua del pozo de la PTAP cooperante para definir su viabilidad.

Una vez obtenida la biomasa centrifugada, se pesaron seis distintas cantidades de biomasa (0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45 y 0.50 g/L en base húmeda) que constituyeron la tercera etapa o primer paso de adaptación de la biomasa algal. Se colocaron en seis distintos vasos de precipitados de un litro con agua del pozo. Los sistemas se colocaron en un sistema usado tradicionalmente para lo que en Ingeniería Ambiental se conoce como 'pruebas de jarras', Jartester PB-700™ de Phipps&Bird™, con agitación de 40 rpm y luz blanca (lámpara de 15 W) constantes.

El lapso de estudio de esta etapa fue de nueve días a lo largo de los cuales se fue midiendo el pH diariamente a la misma hora (excepto los fines de semana) con un potenciómetro Thermo Scientific Orion 2 Star. Adicionalmente, se realizó el seguimiento del desarrollo de las células bajo el microscopio como en la etapa

anterior. La evolución y comportamiento de los valores del pH determinaron los nueve días (cuando el valor ya no incrementaba).

En la cuarta etapa, se implementó una segunda etapa de adaptación de la biomasa algal obtenida de la tercera etapa, la cual se distribuyó en los 6 vasos. Se colocaron seis distintas cantidades de biomasa de 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45 y 0.50 g/L en base húmeda, previamente centrifugadas a 3,000 rpm durante 15 minutos, en cada uno de los vasos de precipitados con un litro del agua de pozo y se sometieron a las mismas condiciones que la etapa posterior. De igual forma que en la etapa anterior, se midió el pH de lunes a viernes y el desarrollo de las células vistas bajo el microscopio. La cuarta etapa tuvo una duración de catorce días siguiendo la pauta del pH y del color verde que indicaba que seguía siendo viable la biomasa algal.

Quinta etapa. En esta etapa se colocó la misma cantidad de biomasa (5.0 g/L base húmeda) para todos los vasos, obtenida de unir todas las biomasas algales del experimento anterior. Las condiciones son la mismas que en las etapas 3 y 4. También, se realizó la determinación de sólidos suspendidos totales (SST) y la curva patrón de la densidad óptica medida a 550 nm en un espectrofotómetro UV-Vis, DLAB SP-UV1000. En el ANEXO 6 se presenta la metodología seguida para este procedimiento. La duración de esta etapa fue de siete días, lapso en el que el valor del pH con respecto a los días se mantuviera constante y, asimismo, se realizó para generar biomasa adaptada al influente problema.

Con la biomasa viable generada en la etapa cinco se implementó la sexta etapa. Esta consistió en exponer la eficiencia del tratamiento de biorremediación, para ello se colocaron, por pares, en los vasos de precipitados las cantidades de biomasa algal siguientes: 2.0, 3.0 y 5.0 g/L en base húmeda (BH). La toma de muestras se realizó cada 24 horas durante siete días. Las pruebas realizadas para el monitoreo y para la caracterización del agua extraída del pozo, fueron: Valor de pH, alcalinidad, dureza total, nitrógeno amoniacal, cloruros, DQO, COT y densidad óptica a 550 nm. Las muestras se analizaron por duplicado con excepción del pH por triplicado y el COT con una sola muestra.

Para la séptima etapa, las condiciones se modificaron para prevenir la lisis celular o la producción de metabolitos. Con base en el artículo de Safi et al. (2014) se realizaron cuatro ciclos consecutivos de 48 horas con la misma agua. La biomasa algal se lavaba siendo que siempre se colaba la misma cantidad de inóculo que desde un inicio de la etapa por litro de agua del pozo, es decir, 5 g/L en base húmeda.

Durante esta etapa, séptima etapa, pasadas las 48 horas de cada ciclo se filtraba el medio líquido con un filtro de celulosa con un tamaño de poro aproximado de 11 μm para recuperar la biomasa algal. A esta biomasa se le realizaron de dos a tres lavados con agua desionizada y se centrifugaron a 3,000 rpm durante 15 min. La biomasa algal previamente lavada se colocaba de nuevo en el sobrenadante, se completaba un litro de agua de pozo tratada y se dejaba durante otro ciclo de 48 horas. Este proceso se realizó hasta cumplir con los cuatro ciclos. Durante los cuatro ciclos se realizó el seguimiento analítico con las variables de estudio (pH, alcalinidad, dureza total, nitrógeno amoniacal, cloruros, DQO, COT y densidad óptica a 550 nm). Las muestras se analizaron por duplicado con excepción del pH por triplicado y el COT con una sola muestra.

Para la octava etapa se recuperó la biomasa algal para realizar estudios a fin de identificar el microorganismo dominante, con el que se realizaron las etapas cuatro a siete, ya que se consideró que hubo una cepa que sobrevivió al agua de pozo de la planta potabilizadora cooperante.

3.4. PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO

Se tomó una muestra de biomasa para ser analizada bajo el microscopio Olympus CH30 y poder identificar al microorganismo mediante sus características fenotípicas, es decir, su morfología, requerimientos nutricionales, ambiente y la simbiosis con otros microorganismos.

La muestra fue enviada para ser analizada a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAI), al Laboratorio de Proteómica, perteneciente a la Facultad de Química, UNAM. Se realizó la purificación de la biomasa con fenol básico para obtener proteínas de alta pureza y una vez obtenido el perfil se hizo una

comparación con la base de datos UniProt, que es un repositorio gratuito central de datos sobre proteínas.

3.4.1. Purificación con fenol básico de proteínas de alta pureza

En las técnicas de purificación de proteínas se deben conocer las propiedades de las biomoléculas para determinar el protocolo de purificación. Se inicia seleccionando la muestra biológica, el método y la condición para lisar las células con la finalidad de exponer a las proteínas. Posteriormente, se obtiene una mezcla con todos los componentes de la célula como las biomoléculas, metabolitos y fragmentos de estructuras celulares. A partir de este momento, es imperante mantener a la proteína de interés en condiciones óptimas que le permitan preservar su función y estructura (Ramírez-Carreto et al., 2021). La técnica de purificación, procedimiento señalado por Ramírez-Carreto et al. (2021), representada en la Imagen 10, consiste en los siguientes pasos:

Paso ①. Elección de la muestra, puede ser células en suspensión o tejido total.

Paso ②. Selección de la solución amortiguadora adecuada para realizar la ruptura del tejido y la extracción de la proteína total en su forma soluble sin afectar las características estructurales y funcionales de la proteína de interés. Este paso se trabaja a 4°C, de forma rápida y en presencia de inhibidores de proteasas para proteger a las proteínas de la degradación.

Paso ③. Determinar el método que se empleará para lisar la membrana celular. Estos métodos pueden ser físicos como: **A-** la homogeneización manual o mecanizada, **B-** la sonicación, **C-** mediante ciclos de congelación y descongelación, **D-** químicos como el uso de detergentes como el Tritón X-100 o **E-** lisis por choque osmótico.

Se puede emplear más de un paso de extracción y la combinación de métodos químicos y físicos.

Paso ④. El aclaramiento consiste en separar fragmentos celulares de las proteínas solubles mediante centrifugación.

Paso ⑤. Cuantificación de la cantidad de proteína en el extracto usando un espectrofotómetro.

Paso ⑥. Purificación de proteínas del extracto.

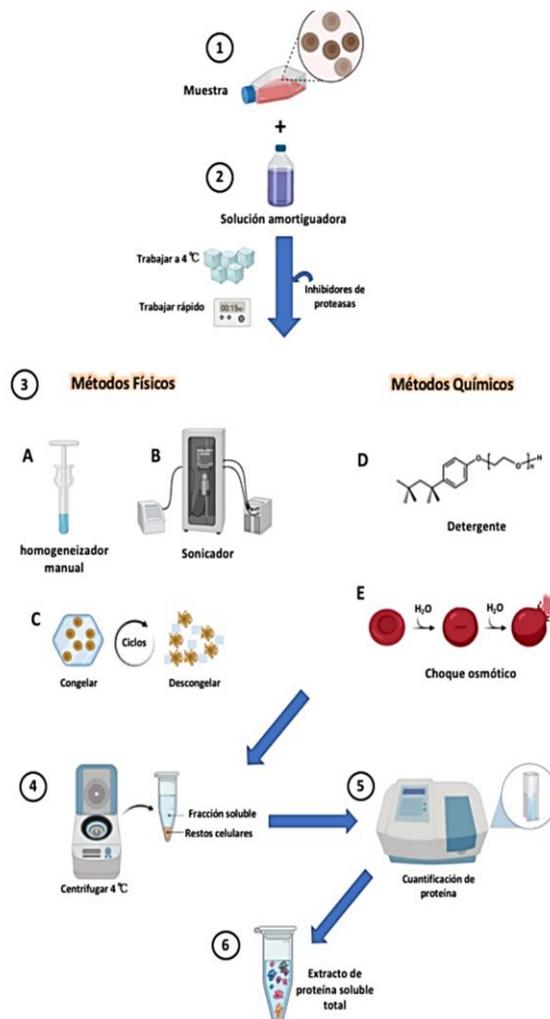


Imagen 10. Diagrama general de un extracto proteico (Ramírez-Carretero et. al. 2021)

El procedimiento que realmente se siguió en esta investigación fue montado por el personal académico de la USAII. Se tomó un gramo de muestra, la cual se maceró utilizando un “Polytron” (homogeneizador manual), se le agregaron 6 mL de fenol con un pH 8.8. También se le agregaron 5 mL de solución amortiguadora de extracción (100 mM tris HCl, pH 8.8, 10 mM EDTA, 900 mM sacarosa y 0.4% de 2-beta mercaptoetanol). Se colocó de nuevo en el “polytron”, aplicándose cinco pulsos de un minuto de duración alternando en un minuto de hielo. Al finalizar, se colocó en hielo durante diez minutos y se centrifugó a 8,000 rpm durante 30 minutos. Se tomó la fase orgánica y se depositó en un tubo Falcon de 50 mL nuevo y se agregaron 25 mL de acetato de amonio 100 mM en metanol. Se agitó y se dejó reposar por 16 h a -20°C. Después se centrifugó a 8,000 rpm por 30 minutos para obtener la pastilla de precipitado y se descartó el sobrenadante. La pastilla se lavó con 5 mL de acetato de amonio en metanol dos veces y se centrifugó a 8,000 rpm durante 10 min después de

cada lavado, posteriormente se lavó la pastilla de igual forma con acetona al 80% dos veces y un último lavado con etanol al 70%. La pastilla se resuspendió en 1,000 μL de *buffer* IEF y se almacenó a -20°C para su posterior estudio.

3.4.2. Base de datos “UniProt”

Una vez obtenida la proteína pura, se cuantificó la cantidad de proteína en un equipo Nanodrop 2000 (Estados Unidos) y se inyectó la muestra en un espectrómetro de masas.

La muestra fue analizada y comparada en la base de datos “UniProt”, abreviatura de *The Universal Protein Resource* la cual proporciona un recurso central sobre secuencias de proteínas y anotaciones funcionales con tres componentes de base de datos. Para conocer el microorganismo, se comparó el perfil de proteínas extraído de la biomasa contra el perfil de proteínas de dos cepas.

3.4.3. Análisis estadísticos

En la etapa seis se analizaron 3 escenarios distintos. Como ya se mencionó anteriormente, se colocaron tres distintas cantidades de biomasa algal, base húmeda, en un litro de agua de pozo. Las cantidades empleadas fueron de 2, 3 y 5 g/L.

Uno de los análisis para identificar la cantidad de biomasa algal preferible fue realizar un análisis de varianza, ANDEVA. Una prueba de análisis de varianza es un tipo de prueba estadística que se utiliza para determinar si existe una diferencia estadísticamente significativa entre dos o más grupos mediante la comprobación de las diferencias de las medias utilizando la varianza (Arteaga, 2022).

En el ANEXO 7 se muestran los resultados obtenidos de realizar los análisis de varianza. Se realizaron para las pruebas de pH, DQO, dureza y cloruros. Se hizo el análisis de varianza a estos, a excepción del pH, porque mostraron, en algún punto del tratamiento, la reducción de su concentración (aunque al final del tratamiento no hayan mostrado reducción).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS EXPERIMENTALES

En este apartado se expone los resultados pertinentes de cada etapa realizada en la metodología.

4.1.1. Etapa 1: Verificación de la viabilidad de los distintos medios

De los cuatro medios propuestos, el medio destacado fue el medio Zarrouk con fertilizante, ya que la proliferación de la cepa comercial FitoMix micro-algal fue satisfactoria en este. El quinto medio tampoco mostró un crecimiento de la cepa FitoMix. Se seleccionó de manera cualitativa, ya que la cepa FitoMix intensificó la coloración verdosa como se muestra en la Imagen 11, excepto en el medio Conway, donde se observó el crecimiento únicamente por el microscopio. También se observó una gota de cada uno de los medios bajo el microscopio y fue el medio Zarrouk con fertilizante en el único donde se desarrollaron algas. Posteriormente, se realizó el escalamiento para producir suficiente biomasa algal.

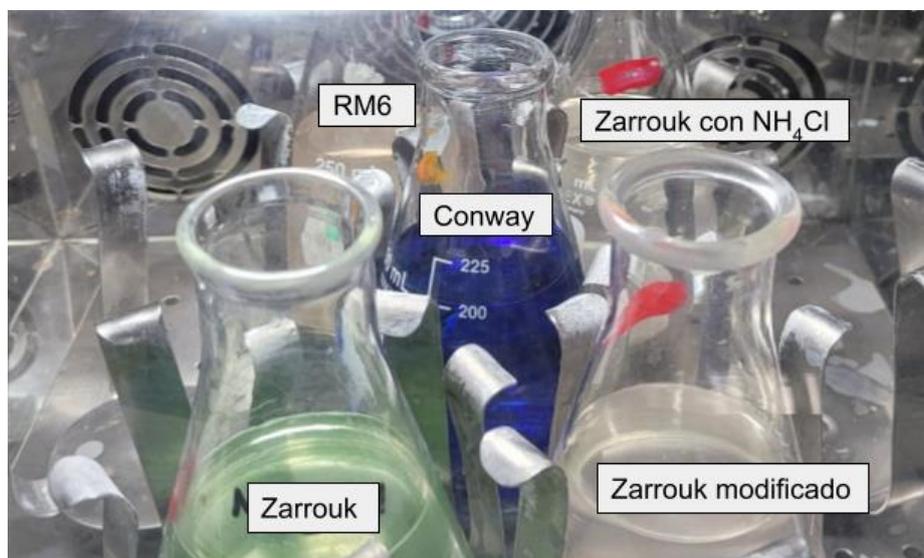


Imagen 11. Comparación de los medios de proliferación de la cepa comercial FitoMix después de dos semanas de estudio

4.1.2. Etapa 2: Escalamiento del sistema en el medio idóneo

Se colocaron 10 mL de inóculo de la cepa comercial FitoMix en el medio Zarrouk con fertilizante en un matraz de dos litros. Se observó el desarrollo cualitativamente, mediante el cambio de la coloración, el cual se tornó a un verde más intenso y también por la modificación del pH del medio, el cual se mantuvo en un rango de 7 a 9, con la adición de bicarbonato de sodio o ácido cítrico, como se mencionó en la metodología. Adicionalmente, se analizó una gota de la suspensión bajo el microscopio para monitorear su desarrollo. Se observó a un microorganismo predominante que, de acuerdo con la cepa comercial, es *Arthrospira maxima*.

En la Imagen 12 se muestran los cambios ocurridos en el matraz de dos litros. En un inicio el medio luce translúcido y al pasar los días esta característica disminuye, la coloración se intensifica hasta una tonalidad verde oscura. En la parte inferior de la Imagen 12 se observa la evolución de la población de la cepa FitoMix (*A. maxima*) vista bajo el microscopio. Esta se reprodujo periódicamente hasta aumentar su población.

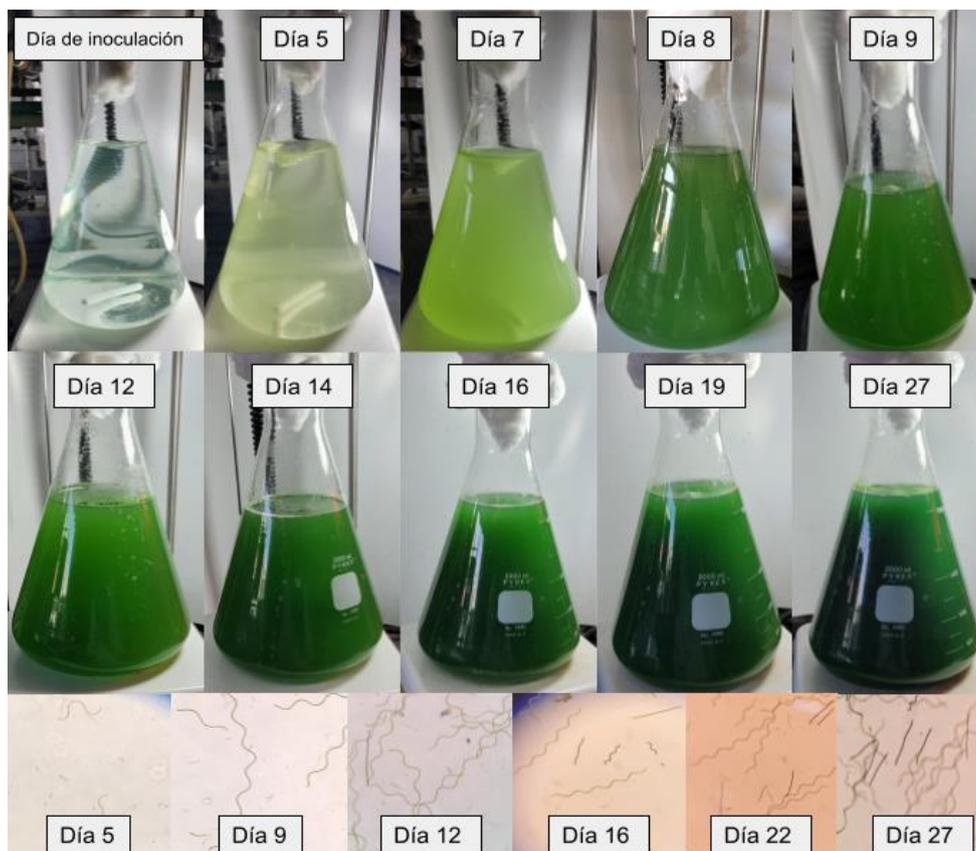


Imagen 12. Evolución del consorcio FitoMix en el medio Zarrouk (superior) y su evolución bajo el microscopio en objetivo 10 X (inferior)

La proliferación experimentada por la cepa FitoMix en el medio Zarrouk con fertilizante generó la cantidad de biomasa algal necesaria para realizar las pruebas de adaptación al agua del pozo, es decir se realizó el primer paso de adaptación.

4.1.3. Etapa 3: Primer paso de adaptación

Primera etapa de adaptación, Imagen 13. En la parte superior de la imagen se observan los cambios que tuvieron los seis distintos sistemas (con distintas cantidades de biomasa inicial: 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45 y 0.50 g/L de influente). La disposición de los vasos es izquierda a derecha con menor a mayor cantidad de inóculo, respectivamente. El principal cambio fue la coloración de los vasos, los cuales cambiaron de un color verde hasta uno amarillo, también fue observada bajo el microscopio con un lente 10 X (parte inferior de la Imagen 13) donde se percibió que el microorganismo de forma de espiral cesó su crecimiento y disminuyó su población, por lo cual se pensó que los microorganismos se lisaron.

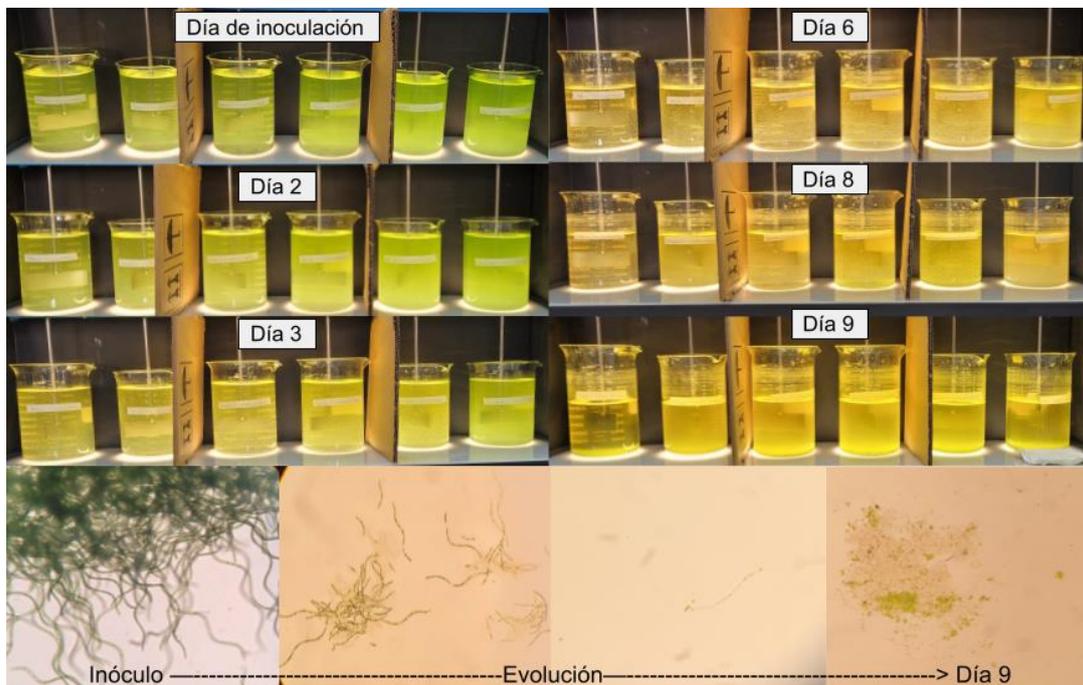
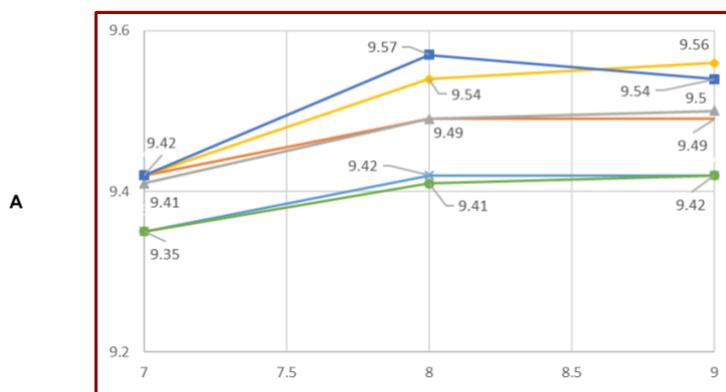
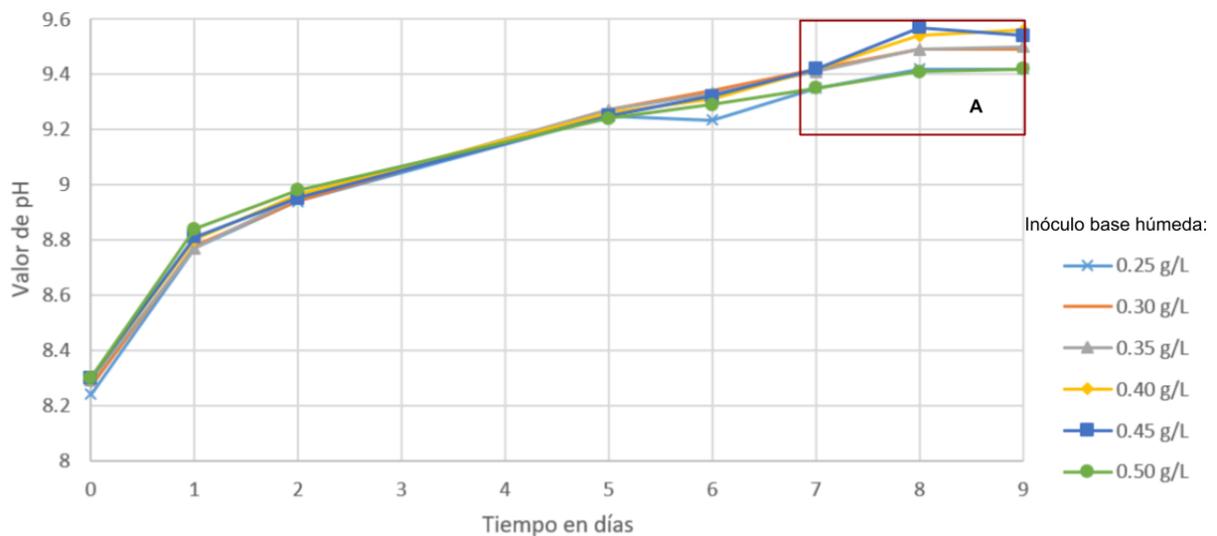


Imagen 13. Primer paso de adaptación en el agua del pozo de la PTAP cooperante

En esta etapa de adaptación se midió el pH del agua de pozo cada 24 horas, durante un periodo de 9 días y con los datos obtenidos se realizó una gráfica de los valores de pH con respecto de los días del experimento (Gráfica 1). Se graficó para cada una de las distintas cantidades de biomasa colocadas en los seis vasos de precipitados

de un litro. Los resultados de cambio del pH respecto a los días para cada uno de los escenarios se muestran en la Gráfica 1.



Gráfica 1. Comportamiento del pH de acuerdo con las distintas cantidades de biomasa inicial en g/L en un periodo de nueve días

Los sistemas tuvieron un incremento de pH a pesar de la muerte celular del microorganismo predominante. Al analizar las muestras bajo el microscopio, Olympus CH30, se observó la presencia de otro microorganismo de morfología esférica completamente distinto a la cepa inicial, el cual tenía forma de espiral alargada. Entonces, el microorganismo que al inicio estaba de forma predominante en el medio Zarrouk con fertilizante no sobrevivió a las condiciones que tenía el agua de pozo.

La biomasa algal resultante, de los seis vasos y los nueve días, se recuperó en un filtro de celulosa, se centrifugó y se sometió a un segundo ciclo de adaptación. Se

realizó este procedimiento debido a que el microorganismo mantuvo la tendencia de aumentar el pH.

4.1.4. Etapa 4: Segundo paso de adaptación

En este segundo paso de adaptación se observó el desarrollo del nuevo microorganismo.

De igual forma que en las etapas anteriores, el parámetro cualitativo para identificar la proliferación exitosa se manifestó por la evolución de la coloración del sistema, como se muestra en la Imagen 14. Conforme avanzó este periodo de adaptación, la coloración de los vasos se tornó nuevamente a un color verde. Adicionalmente, al observar la población bajo el microscopio, las células del microorganismo sobreviviente aumentaron considerablemente. Su forma era esférica.

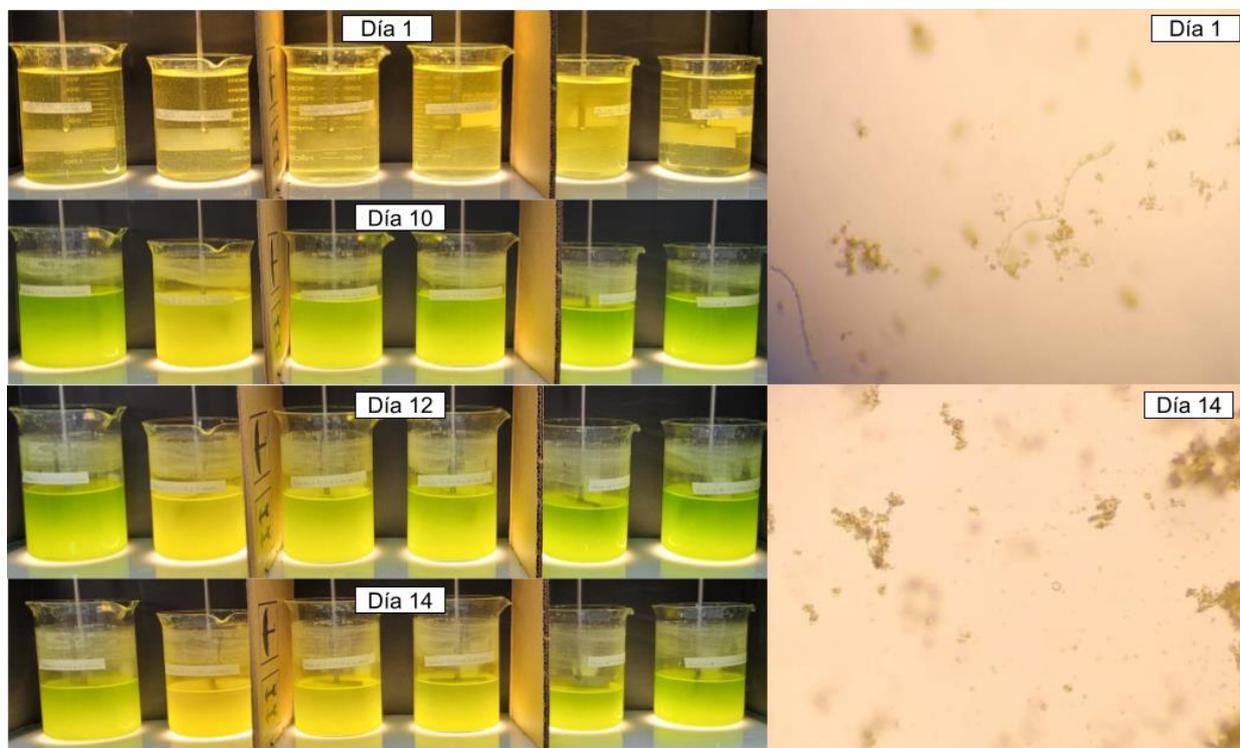


Imagen 14. Segundo paso de adaptación del microorganismo sobreviviente

En este segundo paso de adaptación se observó un aumento de la concentración celular y un cambio de la coloración de manera cualitativa hacia el verde (presencia de clorofila), mientras que cuantitativamente se determinó un aumento del pH, lo que permite inferir un consumo de nutrientes y una proliferación del microorganismo.

Como resultado de este segundo paso de adaptación, se favoreció el crecimiento celular y consecuentemente la obtención de biomasa viable, aunque no suficiente por lo cual se realizó la etapa 5. La etapa siguiente se generó biomasa viable para las etapas 6 y 7, donde se usó el segundo lote de agua de pozo.

4.1.5. Etapa 5: Generación de biomasa viable

Para la quinta etapa se centrifugaron las biomásas algales de los seis vasos y con ella se reinocularon nuevamente seis vasos con un litro de agua de pozo, todas con un inóculo de 5 g/L base húmeda. Se siguió el comportamiento mediante su pH. Dicho experimento tuvo una duración de siete días, donde a partir de este tiempo ya no se observaron cambios significativos en el valor de pH.

A continuación, en la Imagen 15, se muestra la evolución de la coloración. A medida que avanzan los días, el paso de la luz disminuye y la coloración verde se vuelve intensa. Para medirla se implementó la determinación de la densidad óptica de los sistemas a una longitud de onda de 550 nm.

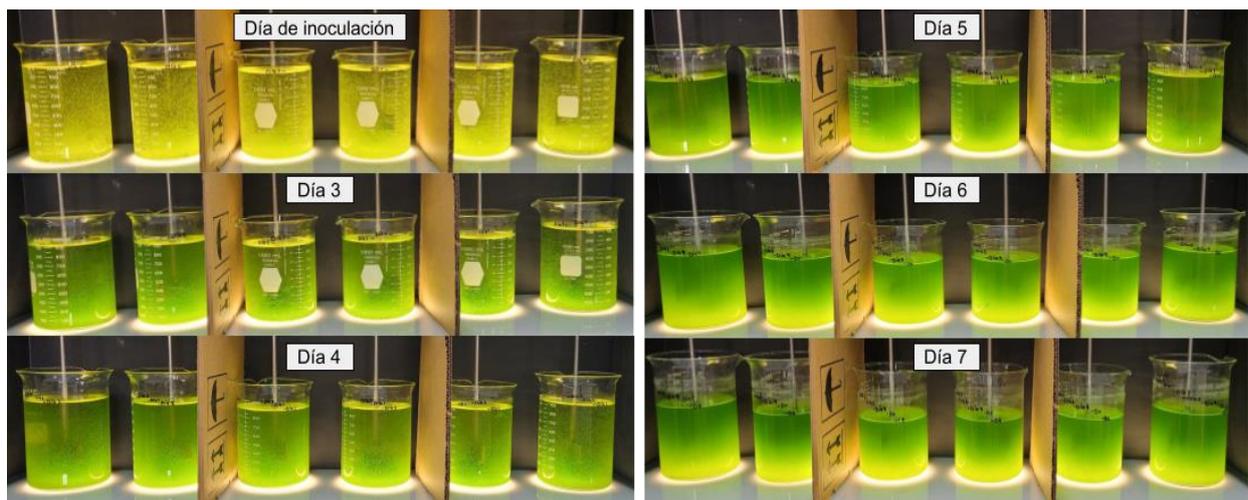
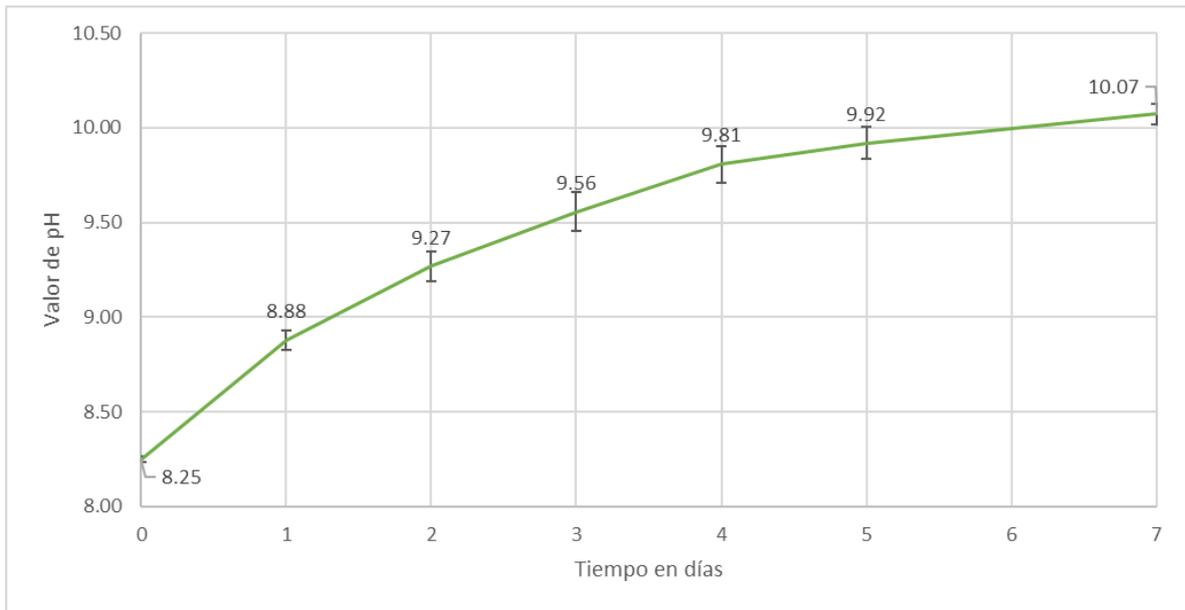


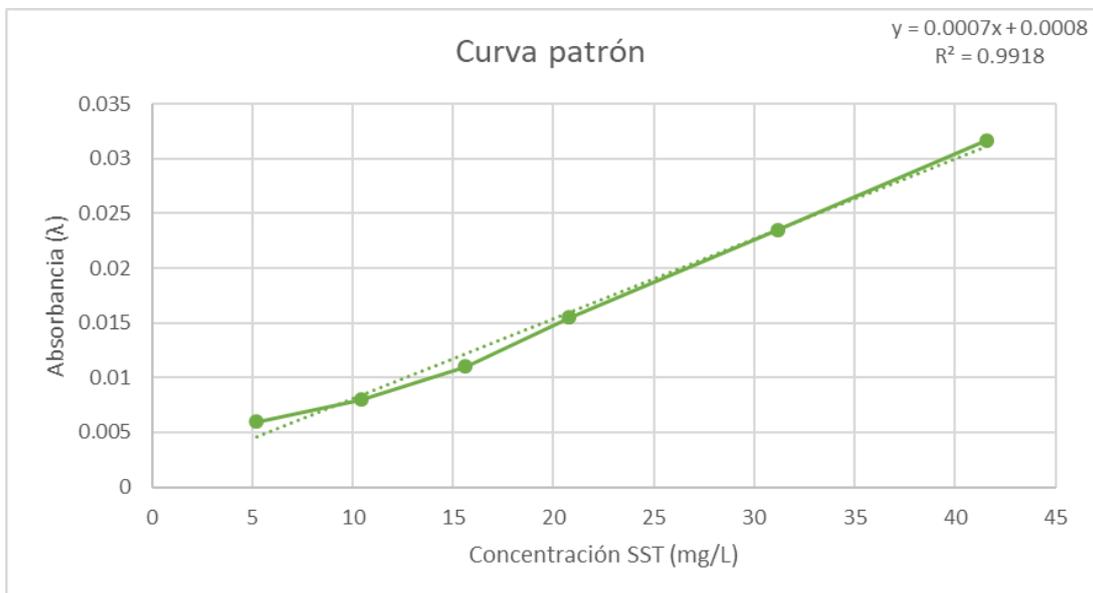
Imagen 15. Quinta etapa. Generación de biomasa y repetitividad de la modificación del pH de acuerdo con la biomasa inicial de cinco gramos base húmeda

Los resultados del seguimiento del pH se muestran en la Gráfica 2 y la curva patrón para la medición de la densidad óptica se muestra en la Gráfica 3, que se realizó por medio de los SST tomando 10 mL del sistema con biomasa inicial de 5 g/L. La curva patrón se construyó en un inicio para cuantificar la cantidad de microorganismos en los experimentos.



Gráfica 2. Modificación del pH (promedio de los seis vasos inoculados con 5.0 g/L BH) con respecto del tiempo en días y su desviación estándar de los datos por triplicado

El comportamiento del experimento fue el siguiente, el pH aumentó un 21.76% con respecto del pH inicial que fue de 8.27. Por otro lado, con la biomasa generada en esta prueba, se realizó la medición de SST en los recipientes determinando la densidad óptica a diferentes diluciones de la biomasa para generar la curva de absorbancia (ABS) a una longitud de onda de 550 nm vs. los SST. Con esto se obtuvo una metodología reproducible para cuantificar la biomasa para experimentos futuros.



Gráfica 3. Curva patrón para la evaluación de la concentración de biomasa algal como densidad óptica, realizada a 550 nm

La relación entre las dos variables fue lineal y está representada por la ecuación $Y=0.0007x+0.0008$ con un coeficiente de correlación $r^2=0.9918$. Por medio de esta ecuación se realizó la determinación de la concentración real de la biomasa en mg SST /L en base seca.

A continuación, la sexta etapa se realizó para conocer la incidencia que tiene la cantidad de biomasa inicial en el tratamiento del agua de pozo, donde se probaron tres escenarios.

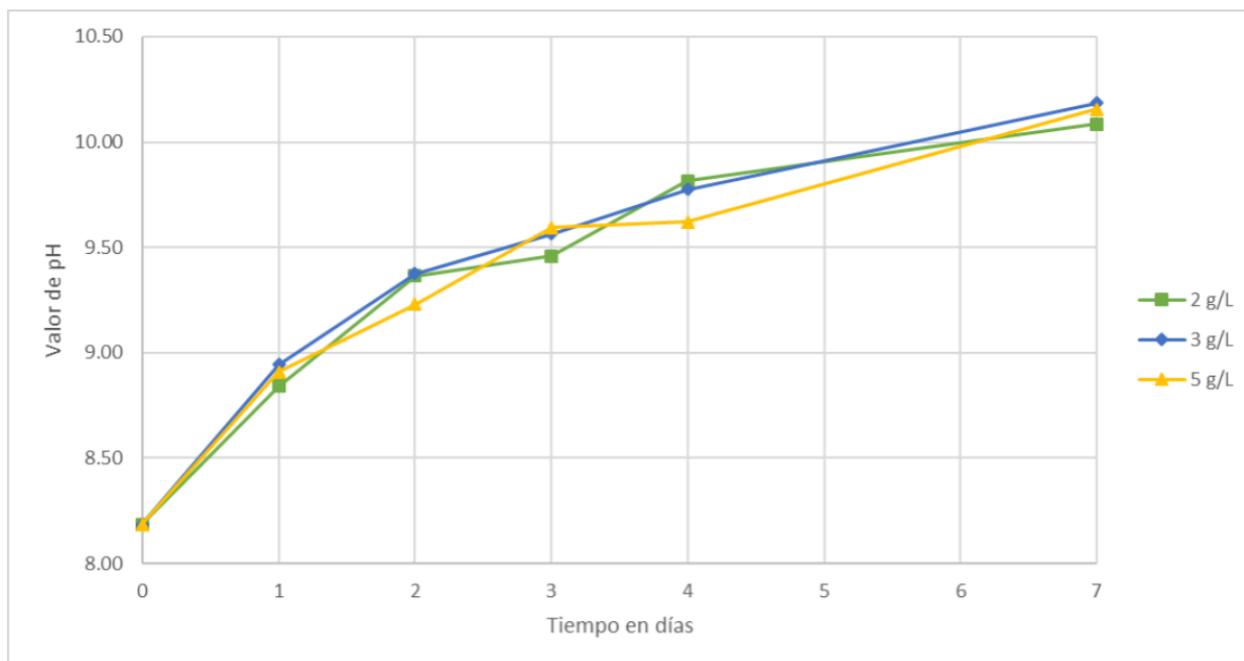
4.1.6. Etapa 6: Evaluación de la cantidad de biomasa que dio estadísticamente los mejores resultados

El objetivo principal de esta etapa fue identificar el escenario que manifestara los mejores porcentajes de reducción de las pruebas establecidas de monitoreo del tratamiento del agua de pozo y también registrar el valor máximo de pH para saber si este alcanzaba el requerido para la precipitación de carbonatos, en un periodo de siete días. Los escenarios realizados fueron tres (por duplicado), con distintas cantidades de biomasa inicial: 2, 3 y 5 g BH de biomasa algal, obtenida de recolectarlas de los seis vasos de la etapa anterior, por litro de agua de pozo.

En esta etapa, como la anterior, la coloración verde permaneció. Se observó que ya no hubo un cambio de coloración desfavorable, el cual se definió empíricamente por una coloración amarilla, indicando la falta de clorofila.

Las evaluaciones de las distintas pruebas de seguimiento se realizaron cada 24 horas y con los datos obtenidos, para cada una de las pruebas, se construyeron las Gráficas 4 a 9, donde se representaba el comportamiento de los tres distintos escenarios de inóculo inicial, es decir, escenario uno- 2.0 g/L, escenario dos- 3.0 g/L y escenario tres- 5.0 g/L.

En primer lugar, se representó la evolución del pH para los tres escenarios en la Gráfica 4.



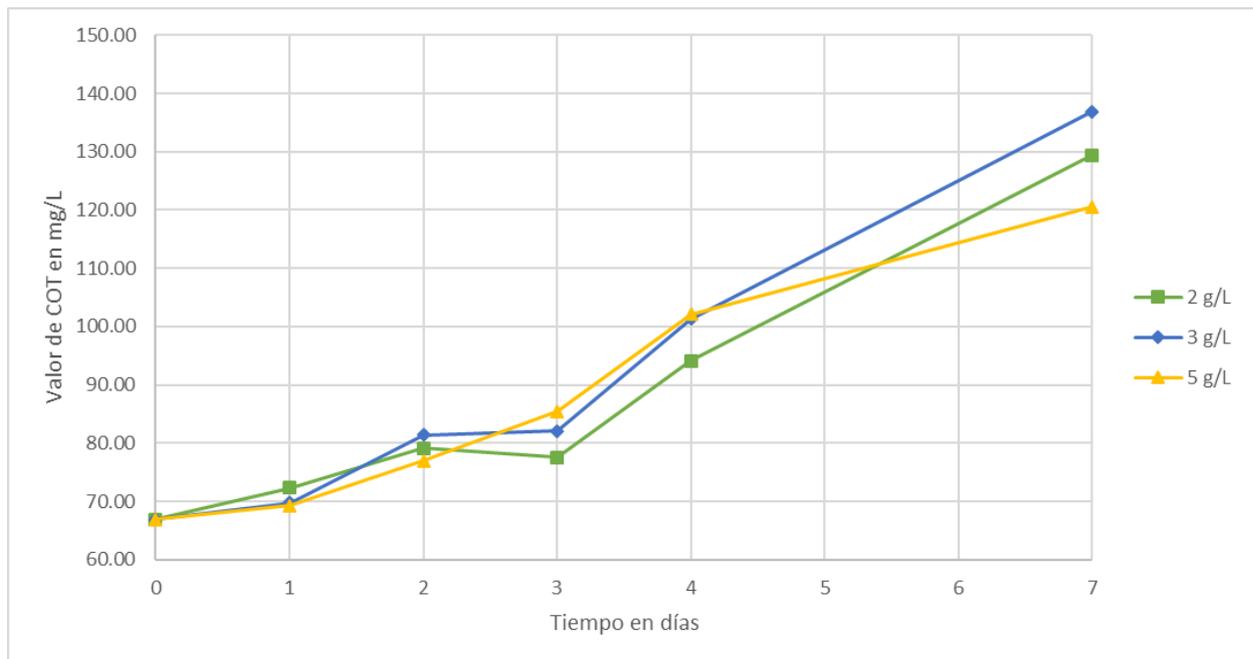
Día	Biomasa 2 g/L		Biomasa 3 g/L		Biomasa 5 g/L	
	Promedio	σ	Promedio	σ	Promedio	σ
0	8.19	0.0071	8.19	0.0071	8.19	0.0071
1	8.84	0.0424	8.95	0.0071	8.91	0.0141
2	9.37	0.0071	9.38	0.0071	9.23	0.0000
3	9.46	0.0141	9.57	0.0212	9.60	0.0071
4	9.82	0.0071	9.78	0.0071	9.62	0.0000
7	10.09	0.0071	10.19	0.0212	10.16	0.0071

Gráfica 4. Comportamiento del pH (promedio) respecto a la cantidad de inóculo inicial

El pH en los tres escenarios aumentó de manera semejante; La biomasa de 3 g/L alcanzó el valor más alto con un pH de 10.19, seguido del escenario de 5 g/L con un valor de pH máximo 10.16 y, por último, el escenario de 2 g/L con un pH de 10.09. El análisis de varianza demostró, de acuerdo con la Tabla A-7.1 ubicada en el ANEXO A7, con un 95% de confianza, que sí hubo diferencia significativa entre los sistemas, es decir, que la cantidad de biomasa colocada como inóculo afectó el valor de pH final alcanzado.

La siguiente prueba analizada fue la de carbono orgánico total (COT), obteniendo el comportamiento mostrado en la Gráfica 5.

A diferencia del pH, para la prueba de COT no se buscó que el valor aumentara sino, por el contrario, que disminuyera.



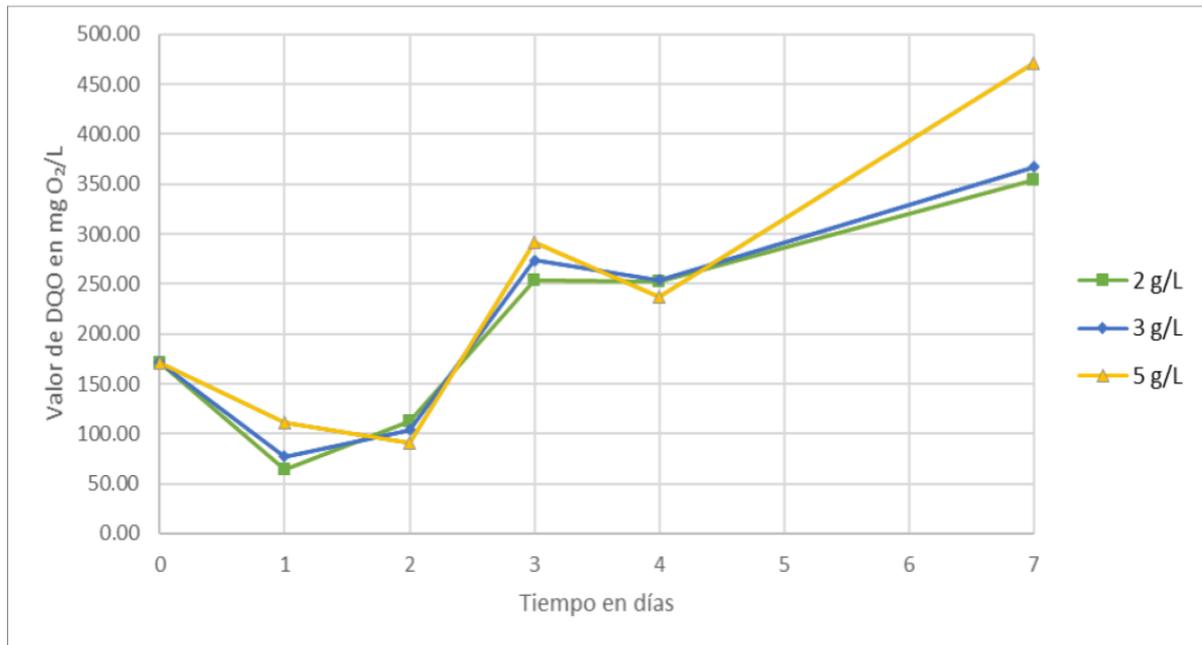
Gráfica 5. Comportamiento del valor de COT con las distintas cantidades iniciales de biomasa

El comportamiento de los tres escenarios fue desfavorable debido a que en los tres casos aumentó. El escenario de 3.0 g/L de biomasa algal inicial fue el que tuvo el mayor aumento, de 69.98 mg COT/L de diferencia con el valor inicial, mientras que los otros dos sistemas de 2.0 y 5.0 g/L tuvieron una diferencia de 62.48 y 53.58 mg/L de COT, respectivamente, con el valor inicial (de 66.92 mg COT/L). Esto podría indicar que la biomasa prefiere el carbono inorgánico. Este hallazgo da la pauta para continuar la investigación.

En todas las demás pruebas, excluyendo el pH, se buscó una disminución en sus valores, que significara una remoción en los contaminantes con la biorremediación. La DQO tuvo un comportamiento de remoción favorable en los primeros días de tratamiento. En la Gráfica 6 se presentan las modificaciones de los valores de la DQO con el tratamiento.

El comportamiento que tuvo la biorremediación en los tres escenarios es variable, ya que es favorable en los primeros dos días de tratamiento y también desfavorable a

partir del tercer día. A pesar de ello, el enfoque en el intervalo donde el tratamiento es favorable es un hallazgo importante.

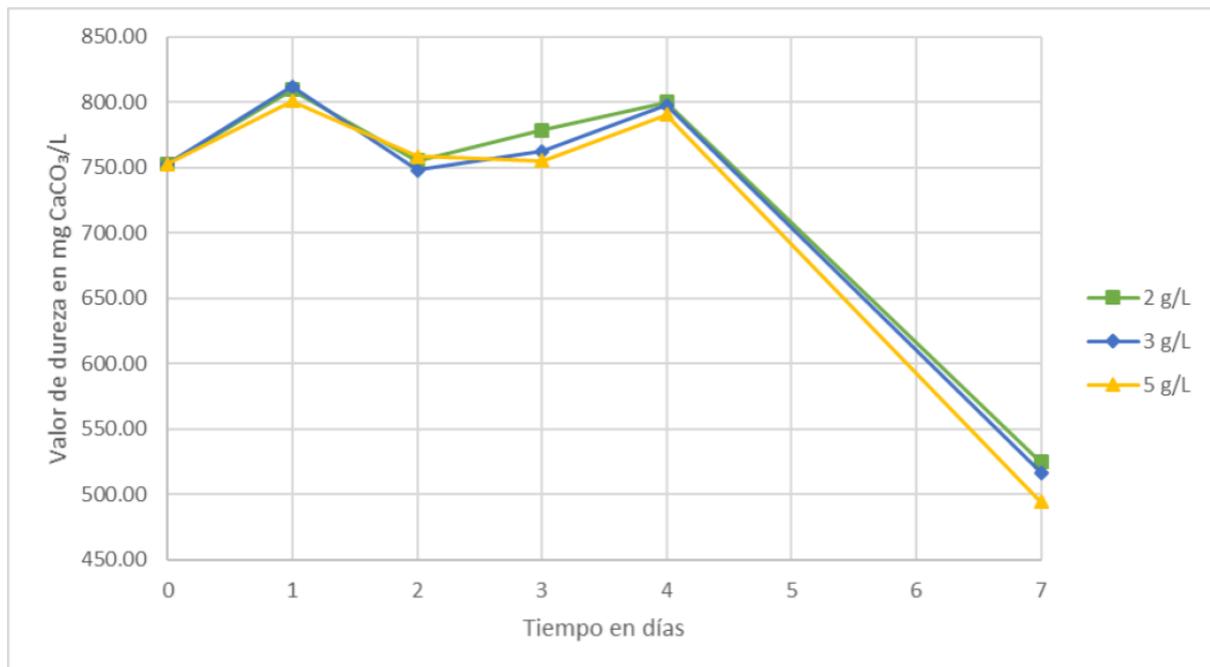


Día	Biomasa 2 g/L		Biomasa 3 g/L		Biomasa 5 g/L	
	Promedio	σ	Promedio	σ	Promedio	σ
0	171.00	11.79	171	11.79	171.00	11.79
1	64.00	18.86	77	9.43	110.67	51.85
2	112.33	2.36	104	18.86	90.67	9.43
3	254.00	47.14	274	51.85	292.33	11.79
4	252.33	7.07	254	4.71	237.33	0.00
7	354.00	33.00	367	9.43	470.67	4.71

Gráfica 6. Comportamiento de la prueba DQO respecto a los días con los distintos tratamientos de biomasa inicial

Los porcentajes de reducción de cada uno de los sistemas fueron de 62.57, 54.97 y 46.98%, respectivamente, para cada una de las cantidades iniciales de biomasa de 2, 3 y 5 g/L y la dispersión de dichos valores (cuando el porcentaje de reducción es mayor) tiene poca variabilidad, lo que indicaría reproducibilidad. Adicionalmente, se realizó un análisis de varianza (Tabla A-7.2. ubicada en el ANEXO A7) que indica que no hubo diferencia significativa entre las medias de los tres escenarios para los valores donde hubo mayor reducción. Por otro lado, desfavorablemente, los valores de DQO aumentaron y al día final del tratamiento aumentaron 107, 114.62 y 175.24%, respectivamente.

Otra prueba realizada fue la dureza total. Dicho comportamiento se muestra en la Gráfica 7, donde el mayor grado de remoción significativo se vio hasta el último día de estudio.



Día	Biomasa 2 g/L		Biomasa 3 g/L		Biomasa 5 g/L	
	Promedio	σ	Promedio	σ	Promedio	σ
0	752.98	4.99	752.98	4.99	752.98	4.99
1	809.46	4.99	811.81	0.00	801.22	4.99
2	755.33	0.00	748.27	0.00	758.86	4.99
3	778.86	4.99	762.39	0.00	755.33	0.00
4	800.04	4.99	797.69	0.00	790.63	0.00
7	524.72	0.00	516.58	0.00	494.22	2.88

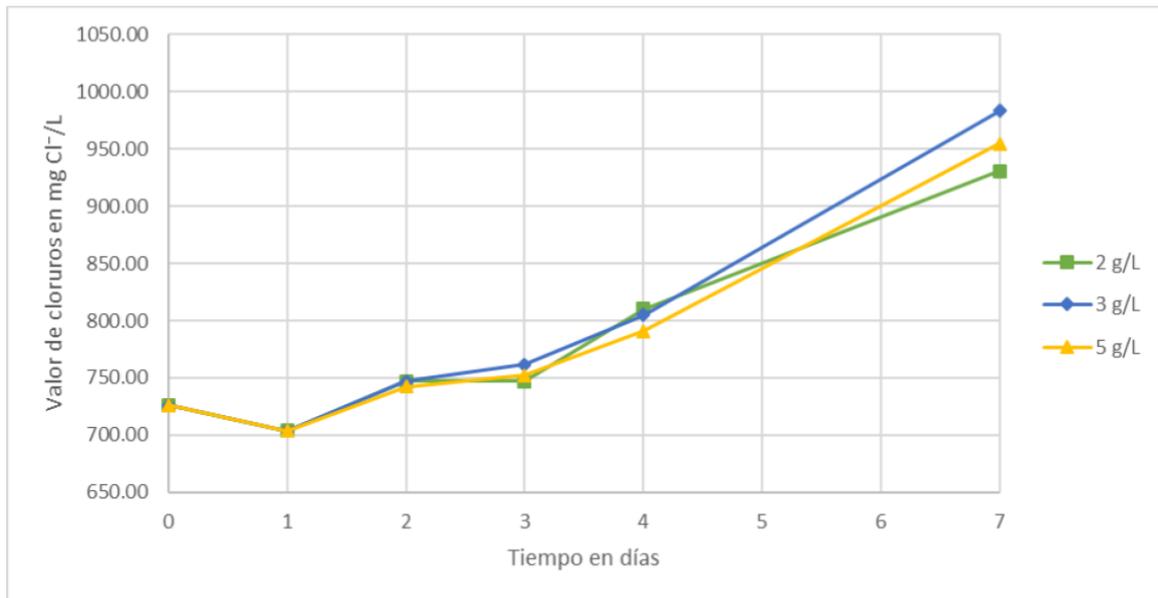
Gráfica 7. Comportamiento de la dureza total de los tres distintos sistemas de biomasa inicial

Como puede observarse en la gráfica anteriormente expuesta, se muestra una disminución en el segundo día del escenario 2, es decir, con 3 g/L de biomasa inicial, sin embargo, la mayor reducción obtenida fue hasta el día 7 para los tres escenarios. Los porcentajes de reducción, partiendo desde el primer día hasta el último día de estudio, fueron de 30.31, 31.39 y 34.36%, respectivamente.

El tratamiento que tuvo un mejor desempeño fue el escenario tres, con 5.0 g/L BH de biomasa inicial. Este cumple con el límite máximo permitido de dureza total que menciona la NOM 127-SSA1-2021 (DOF, 2022), el cual tiene un valor de 500 mg CaCO₃/L. En cuanto al análisis de varianza, ANDEVA (Tabla A-7.3 ubicada en el

ANEXO A7), indica que al menos una es diferente y, por lo tanto, el resultado sí es dependiente de la cantidad de inóculo que se coloque.

La penúltima prueba que se realizó con el biotratamiento fue la de cloruros [$\text{mg Cl}^-/\text{L}$] la cual se expone en la Gráfica 8.



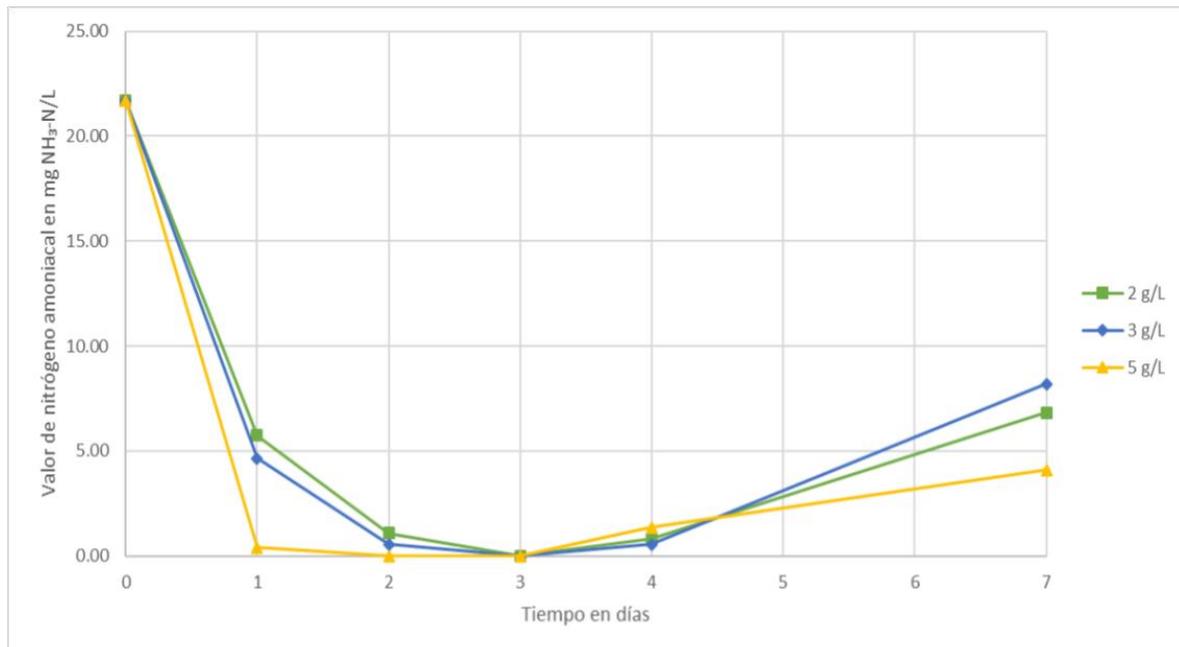
Día	Biomasa 2 g/L		Biomasa 3 g/L		Biomasa 5 g/L	
	Promedio	σ	Promedio	σ	Promedio	σ
0	726.39	5.57	726.37	5.57	726.39	5.57
1	703.89	0.00	703.89	0.00	703.90	13.64
2	747.29	6.82	747.29	6.82	742.46	0.00
3	747.29	6.82	761.75	0.00	752.11	0.00
4	809.96	13.63	805.14	6.82	790.68	0.00
7	930.49	6.82	983.52	0.00	954.59	0.00

Gráfica 8. Comportamiento del contenido de cloruros dependiente de los tres sistemas de biomasa inicial

En el día uno, los escenarios tuvieron un comportamiento favorable, donde los tres escenarios redujeron 3.09% de su valor inicial. En los días posteriores hubo un aumento en el contenido de cloruros. De acuerdo con el análisis de varianza correspondiente (Tabla A-7.4 ubicada en el ANEXO A7) indica que no hubo diferencia entre los tratamientos, por ende, la cantidad de biomasa que se coloque (ya sea 2, 3 o 5 g/L) estaría dando el mismo resultado.

Por último, se analizó el comportamiento que tuvo el tratamiento con la prueba de nitrógeno amoniacal. En la Gráfica 9 se muestra este comportamiento. En la gráfica

se muestra que el escenario de 5 g/L tuvo éxito, con la reducción del 100% de nitrógeno amoniacal en el día 2 y en el día siguiente, día 3, todos los sistemas tuvieron el 100% de remoción de nitrógeno amoniacal.



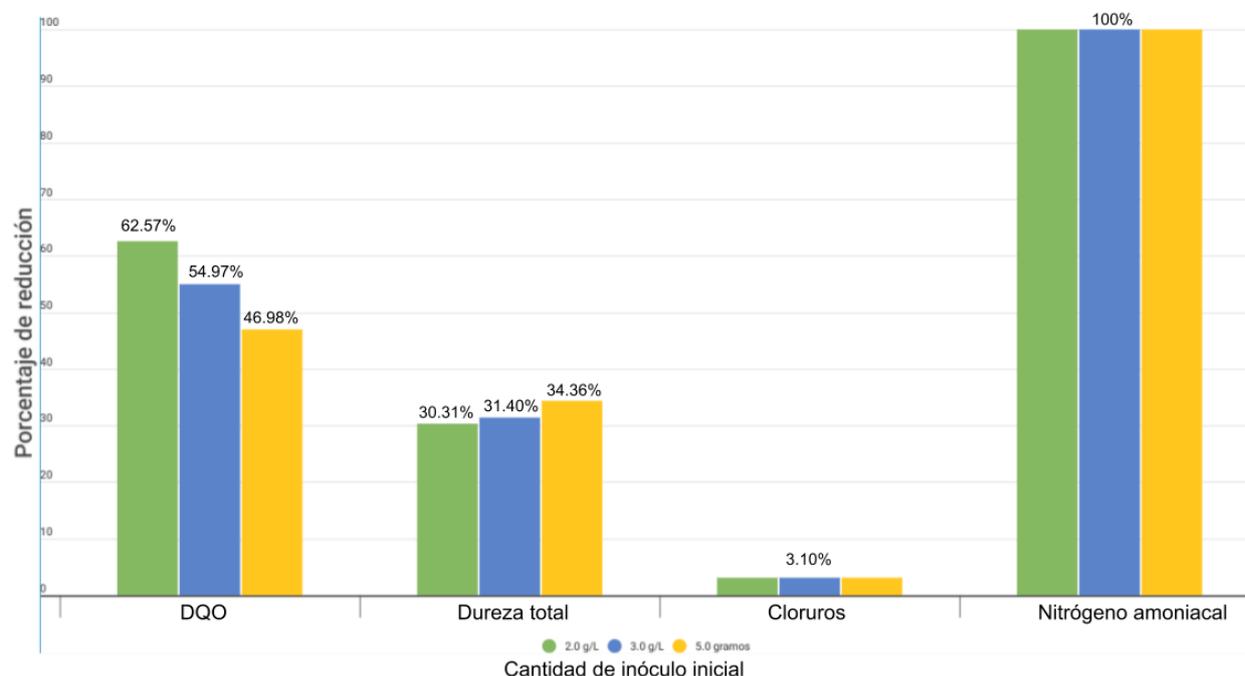
Día	Biomasa 2 g/L		Biomasa 3 g/L		Biomasa 5 g/L	
	Promedio	σ	Promedio	σ	Promedio	σ
0	21.68	0.32	21.68	0.32	21.68	0.32
1	5.74	0.39	4.65	0.39	0.41	0.19
2	1.09	0.00	0.55	0.00	0.00	0.00
3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.82	0.39	0.55	0.00	1.37	0.39
7	6.83	0.39	8.20	0.00	4.10	1.93

Gráfica 9. Comportamiento del valor de nitrógeno amoniacal con las tres distintas cantidades de biomasa inicial

Para determinar la cantidad de biomasa algal que se utilizaría como inóculo para la siguiente etapa se hizo la Gráfica 10. Esta muestra los porcentajes de reducción máxima dentro del periodo de los 7 días de tratamiento. Complementario a la Gráfica 10, se sintetizó la información en la Tabla 10, con los valores mínimos obtenidos de las pruebas y los días donde se lograron dichos valores.

Para el valor de pH, el escenario 2 fue el que tuvo el aumento más significativo. Después, para la DQO no hubo diferencia significativa entre el comportamiento de los escenarios. Para la dureza, sí hubo diferencia significativa y el escenario que tuvo un

mejor porcentaje de reducción fue el escenario 3. En el caso de la prueba de cloruros, los tres escenarios no tuvieron diferencia significativa y, por último, para el nitrógeno amoniacal los tres escenarios tuvieron un porcentaje de reducción del 100%, aunque, en días y periodos distintos, siendo el escenario 3 el óptimo.



Gráfica 10. Porcentaje de remoción **máximo** dentro de los 7 días de tratamiento de las pruebas de DQO, dureza total, cloruros y nitrógeno amoniacal

Tabla 10. Valores máximos de remoción obtenidos en las pruebas con los tres distintos tratamientos y su cumplimiento con la normativa

Prueba	Valor permisible	Agua de pozo	Valor obtenido/día		
			2 g/L base húmeda	3 g/L base húmeda	5g/L base húmeda
pH	6.5 a 8.5 ¹	8.18	10.09	10.19	10.16
Cloruros [mg Cl ⁻ /L]	≤ 250 ²	726.39	703.89/ Día 1	703.89/ Día 1	703.90/ Día 1
Dureza [mg CaCO ₃ /L]	≤500 ¹	752.98	524.72/ Día 7	516.58/ Día 7	494.92/ Día 7
Nitrógeno amoniacal [mg N-NH ₃ /L]	≤0.5 ¹	21.68	0/ Día 3	0/ Día 3	0/ Día 2 y 3
DQO [mg O ₂ /L]	≤10 (E) ³ 10-20 (B) 20-40 (A) 40-200 (C) >200 (FC)	171.0	64.0/ Día 1	77.0/ Día 1	90.67/Día 2

¹ NOM-127-SSA1-2021 (DOF, 2022)

² NOM-127-SSA1- 1994 (DOF, 2000)

³ CONAGUA-SEMARNAT (2009)

También, se realizó la determinación de alcalinidad, pero el valor aumentaba ya que el consumo de los contaminantes por el microorganismo tiende a aumentar el pH y, por ende, la producción de grupos hidroxilo que afectan a esta determinación. Al final del estudio se esperaba que al retirar la biomasa el valor de alcalinidad disminuyera, pero no sucedió así. Este es otro punto que deberá estudiarse en investigaciones futuras.

Adicionalmente, se calculó la velocidad específica para cada uno de los escenarios. Para ello se graficó la concentración de biomasa algal con respecto del tiempo y se identificó la fase de crecimiento exponencial. Posteriormente, se graficó el logaritmo natural del cambio de concentración de la biomasa algal con respecto del tiempo para la linealidad del comportamiento y obtener la ecuación de la recta.

En los escenarios 1 y 2, no se observaron fases de crecimiento exponencial. En el escenario con 5 g/L sí se observó la fase exponencial, por lo que los valores se transformaron para un comportamiento lineal y se procedió a obtener la velocidad o rapidez específica de crecimiento (μ). Esta es la pendiente, es decir, es la razón de cambio de la biomasa con respecto al tiempo. De la ecuación: $y = 0.0112x + 0.0715$, μ es igual a $0.0112 h^{-1}$

Para comprender mejor lo que significa esta velocidad específica de crecimiento se calculó el valor del tiempo de duplicación, que expresa el tiempo medio de generación o sea el periodo promedio de un ciclo completo de división celular. Este último se obtiene por medio de $\frac{\ln 2}{\mu}$, que dio un valor de 61.88 h, el cual representa el caso donde la población celular se duplica.

4.1.7. Etapa 7: Valoración del biotratamiento con nuevas condiciones

En la etapa anterior se realizó un análisis de la cantidad de inóculo adecuada para obtener los mejores resultados. Dicho análisis fue presentado en la Gráfica 10 y, de acuerdo con esto, la cantidad de inóculo idónea fue la de 5 g/L en base húmeda.

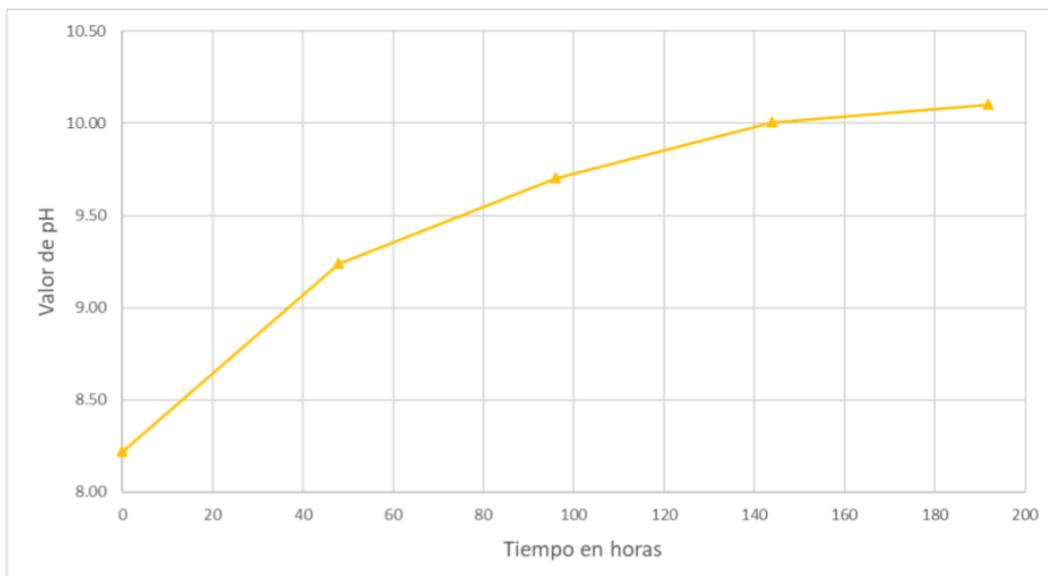
Adicionalmente, se implementó una estrategia para evitar que los valores de las pruebas aumentaran, las cuales se pensó que se debían a la lisis de los microorganismos. Esta implementación se realizó conforme a lo reportado por Safi et al., en el 2014, quienes mencionan que mantuvieron el porcentaje de reducción de nitrógeno amoniacal al 100% realizando cuatro ciclos consecutivos de 48 h. Por ello, una vez implementado el sistema, la biomasa se lavaba pasadas las 48 h hasta realizar un total de cuatro lavados. En cada lavado la biomasa se centrifugaba a 3000 rpm durante 15 minutos y se colocaba de nuevo el sistema con 5 g/L de agua de pozo.

En la Imagen 16 se muestran los vasos donde se realizó el tratamiento. Es importante mencionar que se tomaban muestras solamente del primer vaso para ser analizadas y los dos vasos restantes servían de reserva para mantener el volumen de un litro del primer vaso.



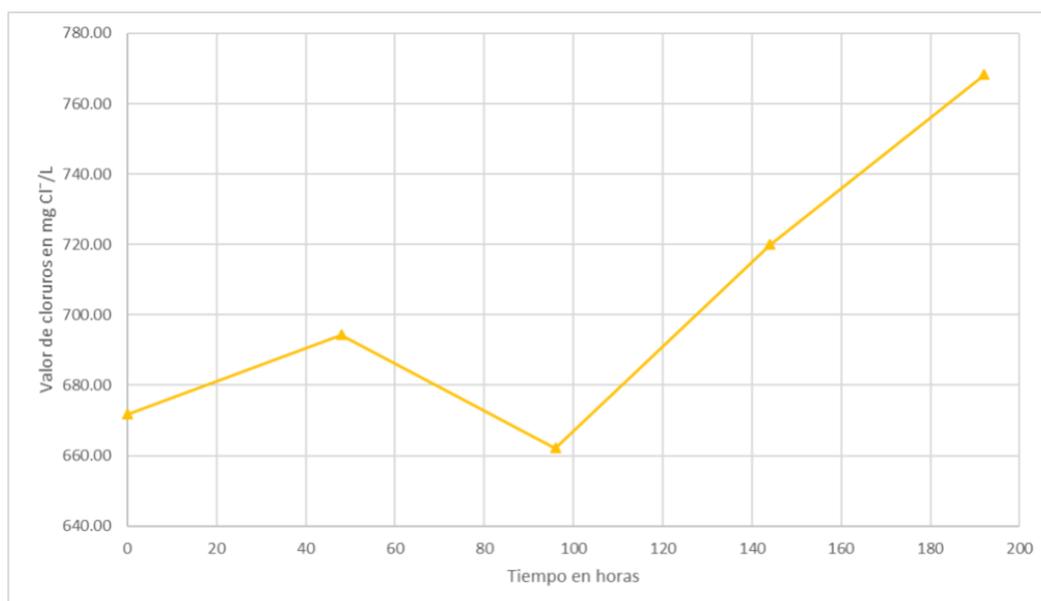
Imagen 16. Séptima etapa, implementación de cuatro ciclos consecutivos de 48 horas

Se graficaron los datos obtenidos de las pruebas (pH, cloruros, dureza, nitrógeno amoniacal, DQO y COT) y con ellos se hicieron las Gráficas 11 a la 16. En ellas se muestra la evolución de los valores con respecto al tiempo en días, donde pudo observarse cómo disminuían y aumentaban con respecto de los valores permitidos. De acuerdo con las Gráficas 11 a 16, el nitrógeno amoniacal alcanzó un porcentaje de reducción del 100% y se logró mantener así durante los cuatro lavados de 48 h. En el caso del carbono orgánico total no se logró una reducción como ya había ocurrido en la Etapa 6. En cambio, aumentó con respecto del valor inicial. En el caso de la DQO se tuvo una reducción hasta el tercer lavado y para cloruros y dureza se obtuvieron porcentajes de reducción del 1.43 y 13.94%, respectivamente, ambos en el segundo lavado.



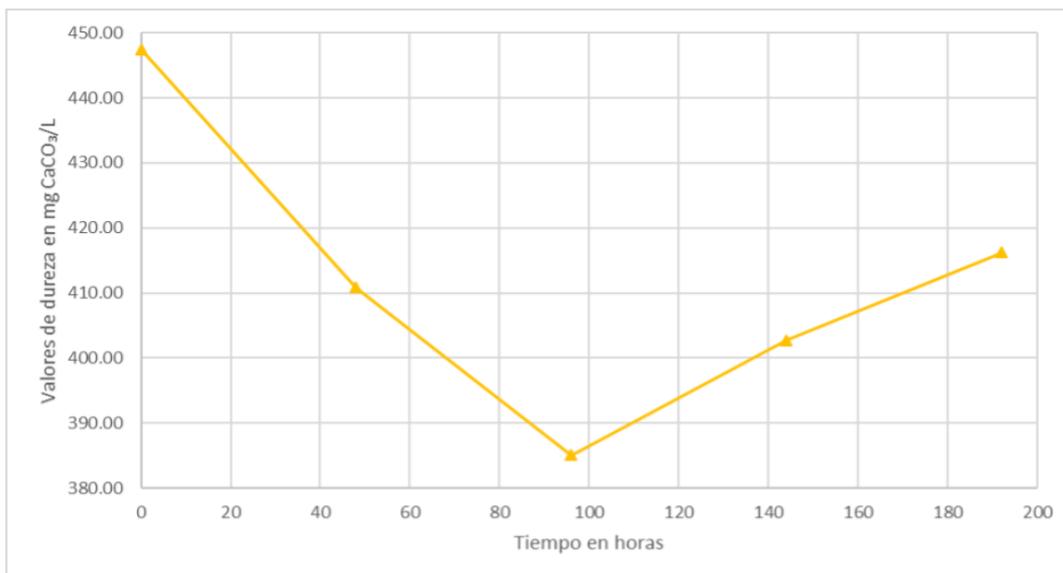
Hora	pH 1	pH 2	pH 3	Promedio	D. estandar
0	8.22	8.22	8.22	8.22	0.00
48	9.22	9.25	9.24	9.24	0.02
96	9.71	9.70	9.69	9.70	0.01
144	10.01	10.02	9.99	10.01	0.02
192	10.11	10.09	10.11	10.10	0.01

Gráfica 11. Comportamiento del pH con los cuatro lavados consecutivos de la biomasa algal de 48 horas



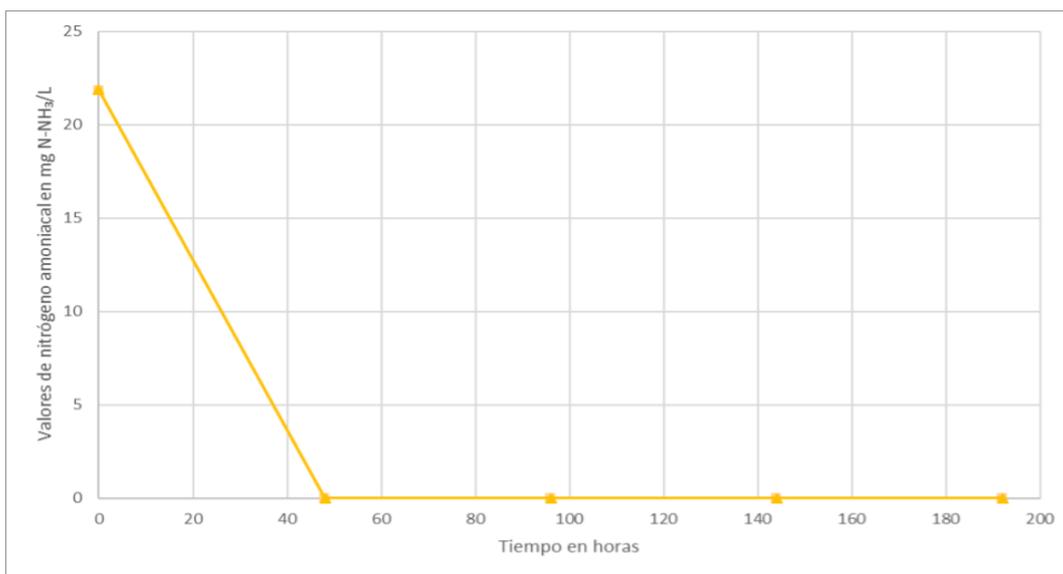
Hora	mg Cl ⁻ /L (1)	mg Cl ⁻ /L (2)	mg Cl ⁻ /L (3)	Promedio	D. estandar
0	665.32	674.97	674.97	671.75	5.57
48	694.25	694.25	694.25	694.25	0.00
96	655.68	665.32	665.32	662.11	5.57
144	723.18	713.54	723.18	719.97	5.57
192	761.75	781.03	761.75	768.18	11.13

Gráfica 12. Comportamiento de los valores de cloruros respecto a los cuatro lavados de biomasa algal de 48 horas cada uno



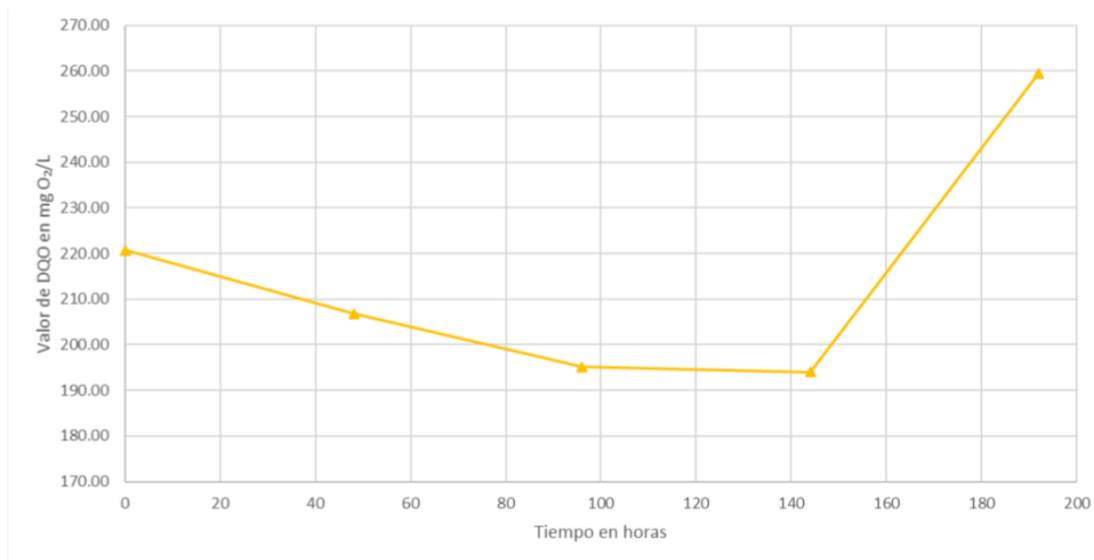
Hora	mg CaCO ₃ /L (1)	mg CaCO ₃ /L (2)	mg CaCO ₃ /L (3)	Promedio	D. estandar
0	447.44	447.44	447.44	447.44	0.00
48	410.83	414.89	406.76	410.83	4.07
96	382.35	382.35	390.49	385.06	4.70
144	406.76	398.62	402.69	402.69	4.07
192	414.89	414.89	418.96	416.25	2.35

Gráfica 13. Comportamiento de los valores de dureza total respecto a los cuatro lavados consecutivos de la biomasa algal de 48 horas



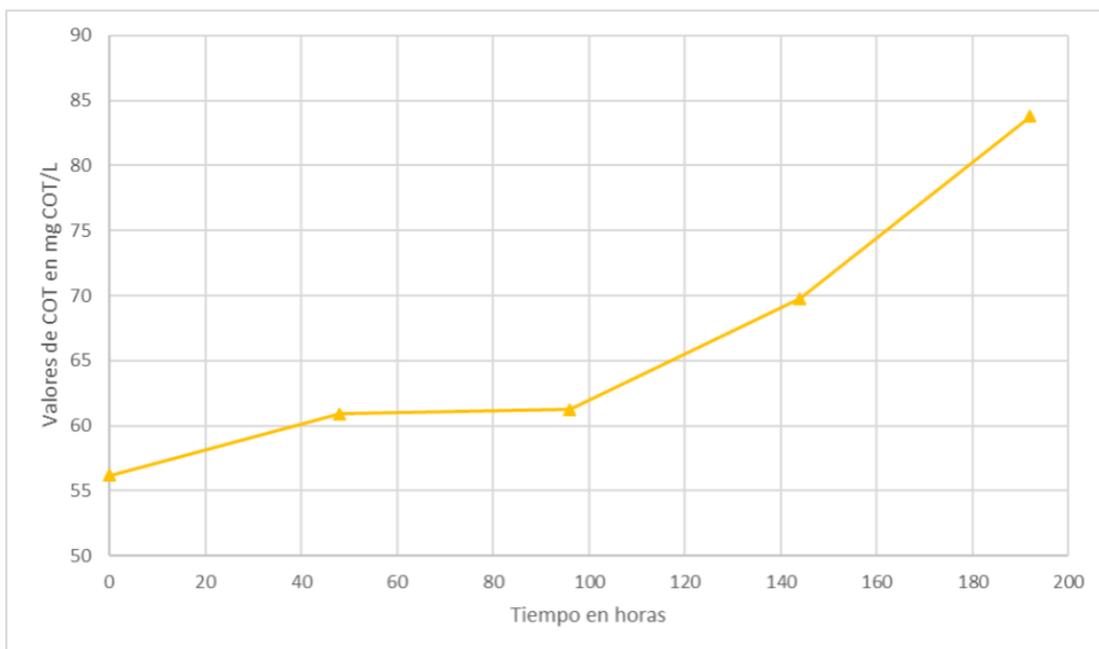
Hora	mg N-NH ₃ /L (1)	mg N-NH ₃ /L (2)	mg N-NH ₃ /L (3)	Promedio	D. estandar
0	21.86	21.86	21.86	21.86	0
48	0	0	0	0	0
96	0	0	0	0	0
144	0	0	0	0	0
192	0	0	0	0	0

Gráfica 14. Comportamiento de los valores del nitrógeno amoniacal a lo largo de los cuatro lavados consecutivos de 48 horas de la biomasa algal



Hora	mg O ₂ /L (1)	mg O ₂ /L (2)	mg O ₂ /L (3)	Promedio	D. estandar
0	225.66	230.66	205.66	220.66	13.23
48	195.66	215.66	209.00	206.77	10.18
96	170.66	207.33	207.33	195.11	21.17
144	197.33	197.33	187.33	194.00	5.77
192	258.99	274.00	245.66	259.55	14.18

Gráfica 15. Comportamiento de los valores de DQO respecto a las horas donde se realizaron los lavados de biomasa algal



Hora	mg COT/L
0	56.18
48	60.91
96	61.25
144	69.76
192	83.76

Gráfica 16. Comportamiento de los valores de COT respecto a las horas donde se realizaron lavados de la biomasa algal

Para comprender mejor el comportamiento de los valores obtenidos se tabularon (Tabla 11) para compararlos considerando su reducción en las pruebas realizadas de la etapa 7 y su cumplimiento con la normativa, además del día en el cual se obtuvieron dichos valores.

Tabla 11. Valores obtenidos en las pruebas con el biotratamiento, con cuatro lavados cada 48 horas consecutivos y su cumplimiento con la normativa

Prueba	Valor permisible	Normatividad	Agua de pozo	Lavado 1	Lavado 2	Lavado 3	Lavado 4
pH	6.5 a 8.5	NOM-127-SSA1-2017	8.22	9.24	9.70	10.01	10.10
Cloruros [mg Cl ⁻ /L]	≤ 250	NOM-127-SSA1-1994	671.75	694.25	662.11	719.97	768.18
Dureza [mg CaCO ₃ /L]	≤500	NOM-127-SSA1-2017	447.44	410.83	385.06	402.69	416.25
Nitrógeno amoniacal [mg N-NH ₃ /L]	≤0.5	NOM-127-SSA1-2017	21.86	0	0	0	0
DQO [mg O ₂ /L]	≤10 (E) 10-20 (B) 20-40 (A) 40-200 (C) >200 (FC)	CONAGUA-SEMARNAT 2009	220.66	206.77	195.11	194.0	259.55
COT [mg COT/L]	0.1- 25 En agua residuales >100	Godoy, R. 2021	56.18	60.91	61.25	69.76	83.76

E) excelente calidad, (B) buena calidad, (A) calidad aceptable, (C) contaminada y (FC) fuertemente contaminada

Los valores que entran dentro de las especificaciones de la normativa son dureza y nitrógeno amoniacal.

Adicionalmente, se realizó el cálculo para determinar la velocidad específica de crecimiento del microorganismo.

Se obtuvo la siguiente ecuación de la recta: $y = 0.0089x - 0.0301$, donde la pendiente de esta línea recta es la velocidad específica de crecimiento (μ) $0.0089 h^{-1}$ y el tiempo de duplicación es de 77.88 h.

Después de obtener el panorama de la biorremediación con el microorganismo presente en esta y la etapa anterior, se realizó la identificación de este, en la Etapa 8.

4.1.8. Etapa 8: Identificación del microorganismo

En la primera etapa de adaptación se observó la persistencia de un microorganismo, que sobrevivió a las condiciones del agua de pozo. Este microorganismo pudo observarse dentro del consorcio en las etapas uno y dos, aunque no de manera predominante.

La primera identificación realizada fue fenotípicamente, donde se buscaron perfiles de microorganismos que se adecuaran a la especie vista bajo el microscopio y de aquellas encontradas en condiciones ambientales similares. La morfología observada fue la de un microorganismo esférico y de color verde. De acuerdo con estos parámetros se encontró una especie la cual fue *Chlorella vulgaris*, como se muestra en la siguiente Imagen 17.

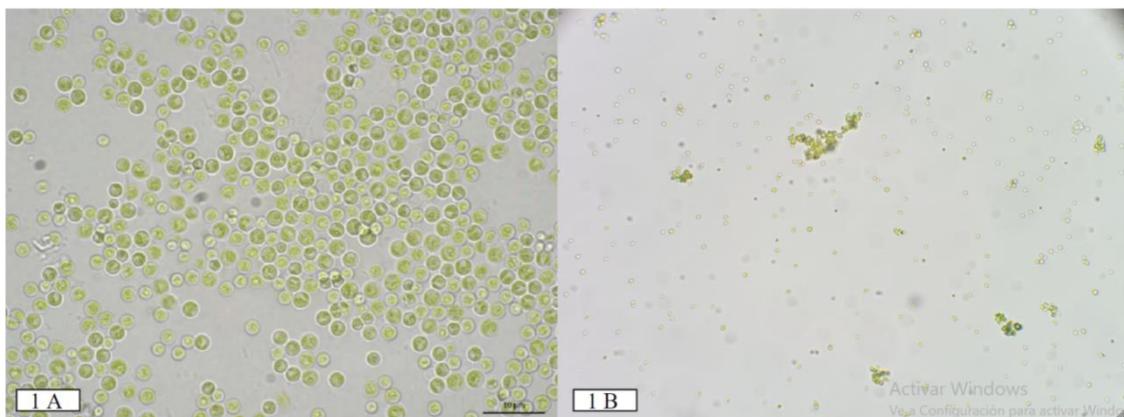


Imagen 17. Comparacion visual de *Chlorella vulgaris*; 1A- *C. vulgaris* KNUA027 vista bajo microscopio a 1000 x (Ji Won Hong, Japón) y 1B- Biomasa vista bajo microscopio 10 x

Con dicha premisa, se realizó un estudio donde se llevó a cabo la purificación de proteínas de alta pureza con fenol básico (Imagen 18) para obtener el perfil de proteínas de la biomasa y compararlo con dos especies en una base de datos. Las especies fueron *Arthrospira maxima* y *Chlorella vulgaris*.

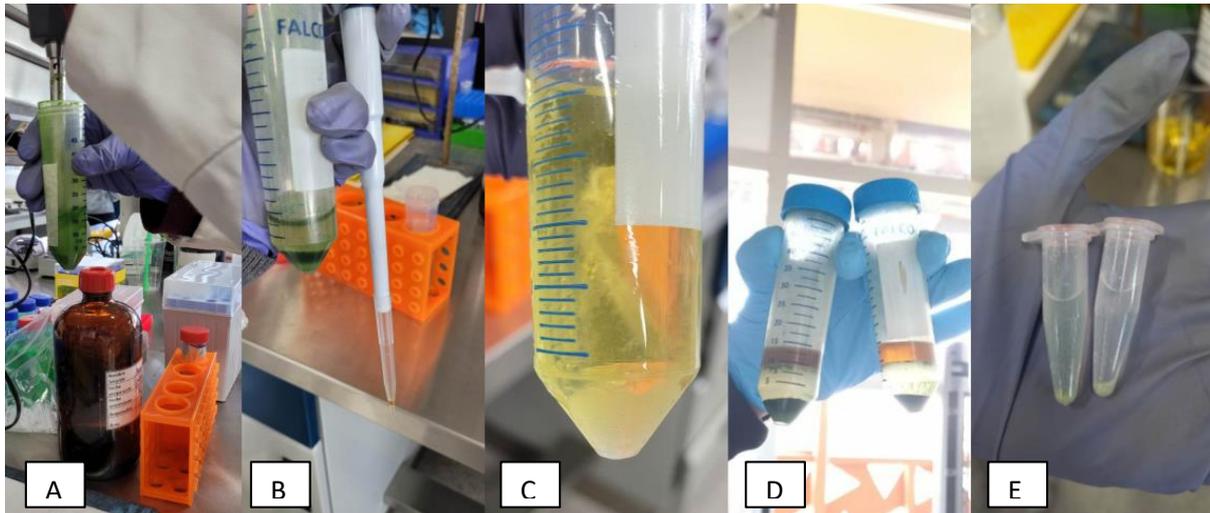


Imagen 18. Purificación de proteína de alta pureza con fenol básico: A- Gramo de muestra procesada con el homogeneizador manual; B- Obtención de la fase orgánica que se depositó en un tubo de 50 mL nuevo; C- Sobrenadante de las proteínas; D- Extractos de proteína y fragmentos de otras biomoléculas; E- Obtención de la pastilla de precipitado

El resultado del recuento del perfil de proteínas de la biomasa con la base de datos arrojó la concordancia total con el perfil de *Chlorella vulgaris*. En específico, una proteína determinó el resultado. Esta fue una parte de los fragmentos de actina de *Chlorella vulgaris* con un 99% de seguridad ya que el equipo está especializado para no dar falsos positivos.

4.2. DISCUSIÓN FINAL

La implementación de la biomasa algal en la que predominó *Chlorella vulgaris* para el tratamiento de agua de origen subterráneo fue favorable para la reducción de ciertos contaminantes, como el nitrógeno amoniacal y la dureza y que cumplen con lo especificado en la normativa mexicana, NOM 127-SSA12021 (DOF, 2022). Los límites máximos permisibles para la dureza y el nitrógeno amoniacal en la norma se reportan como $500 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$ y $0.50 \text{ mg N} - \text{NH}_3/\text{L}$, respectivamente.

En la Etapa 6 y 7 la dureza se encontró por debajo de lo que indica la norma, para el tratamiento que utilizó 5 g/L de inóculo. En el caso del nitrógeno amoniacal todos los escenarios obtuvieron valores de $0 \text{ mg N} - \text{NH}_3/\text{L}$.

Los valores de las pruebas de DQO y de cloruros no están especificados en la NOM 127-SSA1-2021 (DOF, 2022). Sin embargo, los valores para la clasificación de la demanda química de oxígeno son de: $\leq 10 \text{ mg/L}$ como excelente, (10-20] mg/L buena calidad, (20-40] mg/L aceptable, (40-200] mg/L contaminada y $>200 \text{ mg/L}$ fuertemente contaminada (Conagua, 2009). Para la prueba de cloruros el valor máximo permisible es de $250 \text{ mg Cl}^-/\text{L}$, este último de acuerdo con la NOM-127-SSA1-1994 (DOF, 2000).

El biotratamiento logró reducir los valores de DQO para los tres escenarios en la Etapa 6 respecto a su valor inicial, pero clasificaron como agua contaminada, puesto que se encontraron dentro del rango de 40 a 200 mg/L. En cuanto a los valores de cloruros en las Etapas 6 y 7 no se cumplió con lo establecido por la normativa.

Históricamente, la PTAP de Tláhuac usa cal para realizar el ablandamiento químico debido a la problemática que presenta por los valores elevados de dureza, una posible solución es la implementación del biotratamiento con biomasa algal, donde predomina *Chlorella vulgaris*, ya que puede lograr el remplazo de este reactivo, ser de menor impacto ambiental y generar menores costos en el futuro.

A continuación, se presenta el último capítulo de esta tesis.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

De acuerdo con el objetivo general que era el de evaluar el desempeño de una biomasa comercial en el tratamiento de agua de origen subterráneo mediante pruebas de tratabilidad eliminando contaminantes específicos del agua puede concluirse que se cumplió para dos pruebas de las seis implementadas para el seguimiento.

Las seis pruebas implementadas fueron pH, dureza, DQO, COT, cloruros y nitrógeno amoniacal. Hubo dos pruebas que mostraron una reducción de los valores y las cuales cumplieron con lo establecido por la normativa (NOM-127-SSA1-2021- DOF,2022), las cuales fueron nitrógeno amoniacal y dureza.

De las cuatro variables restantes, dos de ellas, aunque mostraron reducciones modestas, no cumplieron con lo establecido. Éstas fueron cloruros y DQO.

La materia orgánica definitivamente debe ser abordada en otro estudio.

Para el caso del pH, también deben continuarse las investigaciones para elucidar lo que está ocurriendo en el sistema.

Dentro de los objetivos específicos, con respecto del de la valoración de la adaptabilidad del inóculo mixto mediante pruebas de proliferación para el tratamiento de agua de origen subterráneo con alto contenido de dureza, alcalinidad, materia orgánica y nitrógeno se obtuvo un microorganismo algal que logró alcanzar el objetivo general con dos de las seis variables estudiadas. Esto también involucró el segundo objetivo específico al realizar las pruebas de tratabilidad del agua de origen subterráneo utilizando diferentes concentraciones de los microorganismos viables evaluando la reducción de contaminantes específicos. Aunque las concentraciones

reales no se calcularon porque se usó base húmeda, se estableció la metodología para que en futuras investigaciones se use siempre base seca.

Una vez reconociendo que el microorganismo predominante reduce dos contaminantes del agua de pozo se identificó mediante una técnica de purificación de proteínas para que, en futuras investigaciones, pueda aprovecharse este conocimiento. Por medio de una purificación de proteínas de alta pureza con fenol básico y la comparación de esta en una base de datos UniProt, se determinó que el microorganismo predominante se trataba de la conocida y muy estudiada alga *Chlorella vulgaris*.

5.2. RECOMENDACIONES

Para complementación de este proyecto se recomienda hacer un experimento con biomasa de la cepa pura de *Chlorella vulgaris*, para comparar y controlar su comportamiento en el agua de pozo. Además de usar el inóculo en base seca para eliminar el sesgo que pudiese interferir en las mediciones de los monitoreos.

También se recomienda implementar evaluaciones complementarias a las ya realizadas como DBO, sodio, oxígeno disuelto y pruebas sanitarias microbiológicas, por mencionar algunos.

Realizar modificaciones en las condiciones de experimentación como el uso de una luz de longitud de onda distinta, ya que esta puede cambiar los resultados obtenidos, por ejemplo, la implementación de luz roja (λ 700 nm) propicia la proliferación de *C. vulgaris* y esto podría generar mejores resultados. Otra condición sería la de implementar distintas cantidades de inóculo y tiempos de lavado de biomasa.

En el caso de la biomasa algal que se genere del tratamiento, se sugiere realizar estudios bromatológicos para conocer la composición de sus macros y micronutrientes y saber si es idónea para la venta comercial como suplemento alimenticio o materia prima para algún producto.

ANEXOS

ANEXO 1. FUNDAMENTO Y MÉTODO DE LAS PRUEBAS REALIZADAS EN LA METODOLOGÍA

Tabla A1. Fundamento y método de las pruebas realizadas en la metodología

Prueba	Fundamento	Método
pH	El pH definido por Sorensen como: - $\log[H^+]$ Es el factor de "intensidad" de la acidez	Electroquímico- 4500 H ⁺ (4-95) Baird et al., 2017
Alcalinidad	Es la capacidad que tiene el agua para neutralizar ácidos Es la suma de todas las bases valorables pH de punto final empleado 4.5	Valoración- 2320(2-37) Baird et al., 2017
Dureza	Es la suma de las concentraciones de calcio y magnesio	Valoración con EDTA- B.10 NOM-127-SSA1-2021
COT	Consiste en múltiples compuestos orgánicos en varios estados de oxidación, las cuales deben de ser convertidos a CO ₂ (específicamente NPOC)	Combustión a altas temperaturas 5310 (5-26) Baird et al., 2017
DQO	Cantidad de equivalentes o gramos de agente oxidante gastados en la oxidación de los compuestos presentes en la muestra	Reflujo cerrado, método colorimétrico 5220 (5-21) Baird et al., 2017
N-NH ₃	Está presente de forma natural en los cuerpos de agua como producto de la degradación de la materia orgánica e inorgánica	4500-. Destilación preliminar (4-114) Valorimétrico (4-116) Baird et al., 2017
Cloruros	En la forma de Cl ⁻ es uno de los principales aniones inorgánicos presentes en agua potable y residual	Argentométrico 4500-Cl ⁻ (4-75) Baird et al., 2017

ANEXO 2. REACTIVOS UTILIZADOS PARA LA REALIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE MONITOREO EN LA METODOLOGÍA

En la Tabla A2, se describen los reactivos utilizados y fueron los descritos en los métodos de acuerdo al anexo anterior (ANEXO 1).

Tabla A2. Reactivos utilizados para las pruebas de monitoreo de la biorremediación

Reactivos para uso...					
Común	Dureza	COT	DQO	N-NH ₃	Cloruros
<i>Agua desionizada</i>	<i>CaCO₃</i>	<i>H₂SO₄</i>	<i>H₂SO₄</i>	<i>Na₂B₄O₇ 10H₂O</i>	<i>AgNO₃</i>
<i>Extran</i>	<i>HCl</i>	<i>HNO₃ al 30%</i>	<i>HgSO₄</i>	<i>NaOH</i>	<i>NaCl</i>
	<i>NaOH</i>	<i>C₈H₅KO₄</i>	<i>K₂Cr₂O₇</i>	<i>H₃BO₃</i>	<i>K₂CrO₄</i>
	<i>Rojo de metilo</i>		<i>AgSO₄</i>	<i>H₂SO₄</i>	
			<i>KHC₈H₄O₄</i>	<i>NaCO₃</i>	

ANEXO 3. MATERIALES UTILIZADOS PARA LA REALIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA

Los materiales utilizados en la metodología fueron los siguientes:

Tabla A3. Materiales volumétricos, no volumétricos, de uso específico, y de soporte y sostén

Tipo de material	Nombre	Uso
Volumétrico	Bureta de 25.0 mL	Valoraciones
	Matraces aforados 25.0 mL, 50.0 mL	Diluciones
	Pipetas 5.0 mL, 10.0 mL	Alícuotas
No volumétrico	Vaso pp 25 mL, 50 mL, 1000 mL	Disolver y contener componentes
	Matraz Erlenmeyer 250 mL	Contener muestra
	Probeta 50 mL	Medir volúmenes
	Pipeta Pasteur	
De uso específico	Tubos Büchi	Destilación con sosa
	Pinzas para tubos Büchi	Sostén del tubo caliente
	Tubos Hach	Para determinación DQO
	Tubos COT	Para determinación COT
	Propipeta	Traspasar líquidos
	Charolas de aluminio	Para secar la muestra y reactivos
	Celdas de cuarzo	Medición de densidad óptica
	Embudo de vidrio o Büchner	Filtración de influente
	Piseta	Para el agua desionizada
	Papel filtro celulosa de 11 µm	Para lavados
De soporte y sostén	Soporte universal	Para la bureta y embudo de vidrio

ANEXO 4. EQUIPOS UTILIZADOS PARA LA REALIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA

Tabla A4. Equipos utilizados en la metodología y el uso que se les dio

Equipo	Uso
Potenciómetro Thermo Scientific, Orion 2 Star	Medición de pH Medición del punto de equivalencia en la prueba de alcalinidad
Agitador magnético, modelo 4802-00 COLE-PARMER	Agitación en valoraciones Agitación disoluciones
Balanza analítica, OHAUS ® Pioneer	Uso común, pesar muestra, biomasa y reactivos
TOC-V _{SCN} Shimadzu	Determinación de carbono orgánico total
Estufa	Secado de biomasa Reacción de DQO a 148 °C
Espectrofotómetro EP-UV 1000. DIAB	Medición de DQO a 600 nm Medición de densidad óptica a 550 nm
Vortex	Mezcla de tubos para DQO
Büchi para destilación unidad K-350	Destilación básica para N-NH ₃
Balanza granataria	Masa de tubos Falcon y canastillas de centrífuga
Centrífuga SOL-BAT	Separación de biomasa-influente
Jartester, PB-700. Phipps & Bird	Ciclos
Microscopio, Olympus CH30	Revisión de morfología del microorganismo

ANEXO 5. DIFERENTES MEDIOS SELECCIONADOS PARA EL CRECIMIENTO DEL CONSORCIO COMERCIAL

➤ Medio de cultivo Zarrouk (Shi et al., 2016):

El medio Zarrouk es utilizado tradicionalmente para el cultivo de cianobacterias del género *Arthrospira* (Zarrouk, 1966, citado por Romero et al., 2017). Su composición es la siguiente.

En g/L. $NaHCO_3$, 1680; NaCl, 1.00; KH_2PO_4 , 0.41; K_2SO_4 , 1.00; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0.20; $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$, 0.04; $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0.01 y Na_2EDTA , 0.08., adición de elementos traza, 1.0 mL solución A₅ y 1.0 mL de la solución B₆.

La solución de elementos traza A₅ tiene, en g/L, H_3BO_3 , 2.86; MoO_3 , 0.01; $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0.022; $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$, 0.08.

La solución de elementos traza B₆ tiene, en g/L, NH_4VO_3 , 22.90; $NiSO_3 \cdot 7 H_2O$, 47.80; $NaWO_4$, 17.90; $Ti_2(SO_4)_3$, 40.00; $Co(NO_3) \cdot 6 H_2O$, 4.40.

Se prepararon las soluciones de elementos traza A₅ y B₆ y se cultivó en este medio de Zarrouk el inóculo comercial (FitoMix) pero, no proliferó ningún organismo. Los microorganismos que se encontraban en suspensión en el inóculo tomaron una tonalidad amarilla y al observar en el microscopio una muestra no se encontró ninguna *Arthrospira maxima*.

Por recomendación del asesor, en vez de preparar las soluciones A₅ y B₆ se adicionó un fertilizante comercial del que la etiqueta señala que contiene una proporción 17% de fósforo como P_2O_5 , 17% de potasio como K_2O y 17% de N (que no existe, por lo que se ignora en qué formulación química está el nitrógeno). La Figura A-5.1 presenta una fotografía del saco de fertilizante. A este medio modificado con el fertilizante se le denominó Medio Zarrouk con fertilizante.

A continuación, se describen los otros dos medios. El primero de ellos se tomó de una tesis profesional de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí y aparece como medio de cultivo Zarrouk modificado (Silos, 2021). El segundo de ellos también

procede de esta tesis y allí aparece como medio de cultivo Conway. Este es un medio de cultivo clásico utilizado para cultivar microalgas en fotobiorreactores. Las Tablas A-5-1 y A-5.2 presentan su composición.



Figura A-5.1. Fertilizante comercial empleado en los experimentos adicionando 10 g en 2 litros de medio de cultivo de Zarrouk sin las soluciones de elementos traza

Tabla A-5.1. Medio de cultivo Zarrouk modificado (Silos, 2021)

MgSO ₄ ·7H ₂ O	NaCl	NaHCO ₃	KNO ₃	DAP (Difosfato de amonio)	K ₂ SO ₄	CaO	Hierro	Oligoelementos
0.2	5.0	8.0	2.0	0.1	0.1	0.007	0.1	0.05

Tabla A-5.2. Medio de Cultivo Conway

NaNO ₃	EDTA	H ₃ BO ₃	(NH ₄) ₂ MoO ₄ ·	ZnCl ₂	MnCl ₂	CoCl ₂	CuSO ₄	NaH ₂ PO ₄ - H ₂ O
100.0	45.0	33.6	2.1	2.1	0.36	2.1	2.1	20.0

Generalmente este medio se utiliza para cultivos masivos (Zarrouk, 1996, citado por Rojas et al., 2012), hay otras variantes como el descrito por Rojas et al., 2012, a continuación:

Nutrientes/Solución	MI (g/L)
<i>NaHCO</i> ₃	8.4
NaCl	5
<i>KNO</i> ₃	0.8
<i>(NH</i> ₄ <i>)</i> ₂ <i>HPO</i> ₄ (mL/L)	0.35
EDTAFe (mL/L)	0.16
<i>MgSO</i> ₄	0.02

Medio de cultivo RM6

“El medio RM6 es 73% más económico que el medio Zarrouk. El medio RM6, el cual es de bajo costo y es comparable con el medio de Zarrouk en cuanto al rendimiento de biomasa y contenido de AG de interés, así como el contenido de clorofila en los cultivos de *A. maxima*” (Silos, 2021):

MgSO ₄ ·7H ₂ O	NaCl	NaHCO ₃	NaNO ₃	NaHCO ₃	KCl	Super fosfato simple
0.15	0.5	0.04	2.5	8.0	0.898	1.25

ANEXO 6. CURVA PATRÓN DE LA DENSIDAD ÓPTICA MEDIDA A 550 nm

Para construir la curva patrón de la densidad óptica primero se realizó la determinación de SST. Se colocó un papel filtro de fibra de vidrio a masa constante y se colocó una suspensión de 10 mL de agua de pozo con biomasa algal, de igual forma se secó a 105°C hasta masa constante. Una vez determinada la concentración en mg/L se realizaron distintas diluciones de la suspensión de agua de pozo y biomasa algal. Obtenidas las diluciones se les realizó la lectura a 550 nm en el espectrofotómetro UV-Vis.

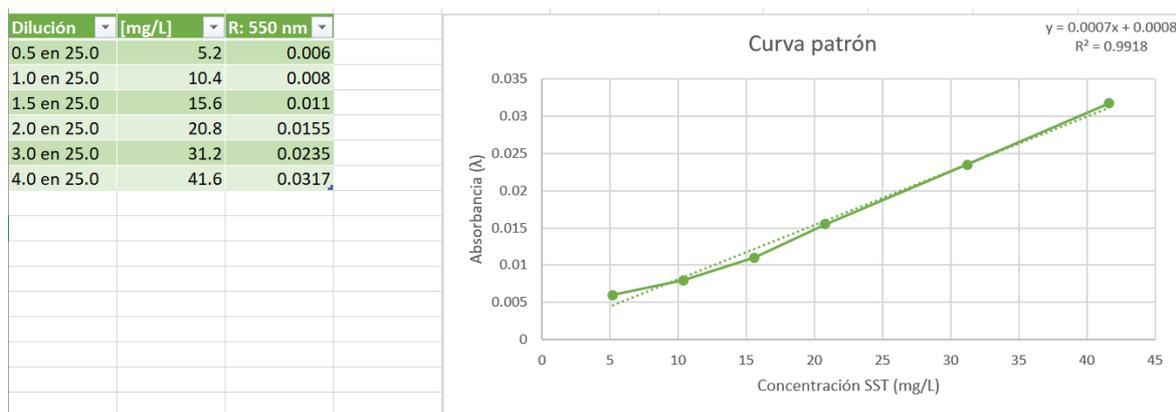


Figura A-6.1. Curva patrón para densidad óptica

ANEXO 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS DATOS EXPERIMENTALES

Para los análisis de varianza se parte de la premisa de:

H0. Todas son iguales

H1. Al menos una es diferente

Y el criterio $F_c > F_t$, entonces, H0 se rechaza.

Tabla A-7.1. Análisis de varianza para el pH de la Etapa 6

F.V	SC	g.l.	MC	Fc	Criterio	Conclusión
Tratamiento	0.0105	2	5.25×10^{-3}	26.25	$F_c > F_t$	Al menos una es diferente
Error	0.0006	3	2×10^{-4}	Ft, 95%		
Total	0.0111	5		9.552		

Tabla A-7.2. Análisis de varianza para el DQO de la Etapa 6

F.V	SC	g.l.	MC	Fc	Decisión	Conclusión
Tratamiento	2309.29	2	1154.64	1.11	$F_c < F_t$	Todas son iguales
Error	3130.67	3	1043.55	Ft, 95%		
Total	439.96	5		9.552		

Tabla A-7.3. Análisis de varianza para la dureza total de la Etapa 6

F.V	SC	g.l.	MC	Fc	Decisión	Conclusión
Tratamiento	998	2	499	180.79	$F_c > F_t$	Al menos una es diferente
Error	8.28	3	2.76	Ft, 95%		
Total	1006.28	5		9.552		

Tabla A-7.4. Análisis de varianza para cloruros de la Etapa 6

F.V	SC	g.l.	MC	Fc	Decisión	Conclusión
Tratamiento	1×10^{-3}	2	5×10^{-4}	8.06×10^{-6}	$F_c < F_t$	Todas son iguales
Error	186.05	3	62.02	Ft, 95%		
Total	186.05	5		9.552		

ANEXO 8. DISPOSICIÓN CONTROLADA DE LOS RESIDUOS DE ESTA INVESTIGACIÓN

Los residuos producidos en esta experimentación no fueron tratados en el laboratorio, se almacenaron de manera separada y sus contenedores fueron identificados con etiquetas proporcionadas por las autoridades de la Facultad de Química para, posteriormente, ser entregados a la Unidad de Gestión Ambiental de la propia Facultad de Química de la UNAM (UGA), para su tratamiento y disposición controlada.

REFERENCIAS

- Abatenh, E., Gizaw, B., Tsegaye, Z., Wassie, M. 2017. The role of microorganisms in bioremediation- A review. Open J. Environ. Biol. 2(1): 038-046. DOI: <https://doi.org/10.17352/ojeb.000007>
- Ahmad F., Khan, A. U., Yasar, A. 2013. The potential of *Chlorella vulgaris* for wastewater treatment and biodiesel production. Pakistan Journal of Botany. 45(S1): 461-465.
- Alcón, A.1999. Desarrollo de modelos cinéticos para bioprocesos: Aplicación a la producción de xantano. Madrid. <https://eprints.ucm.es/3549/1/T23512.pdf>
- Arteaga, G. 2022. Que es el ANOVA (Análisis de la varianza). Testsiteforme. <https://www.testsiteforme.com/que-es-el-analisis-de-varianza-anova/>
- Baird, B. R., Eaton, E. A., Rice, W. E. 2017. Standard methods for the examination of water and wastewater, 23rd edition. Washington, DC. Estados Unidos.
- Belén, R. 2021. Carbono Orgánico Total. Centro Universitario de estudios medioambientales. Vínculo: <https://rehip.unr.edu.ar/bitstream/handle>
- Bholá, V., Desikan, R., Santosh, S., Subburamu, K., Sanniyasi, E., Bux, F. 2011. Effects of parameters affecting biomass yield and thermal behaviour of *Chlorella vulgaris*. Journal of Bioscience and Bioengineering. 111(3): 377-382.
- Boyd, E. C. 2020. Water quality, an introduction. Springer Nature. Tercera edición. Switzerland. Suiza.

- Calderón, J. F. 2017. Ajuste de un modelo cinético para el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* en la fermentación de un sustrato complejo. Educational Psychology Journal. 2(2): 65-72.

DOI: <https://hdl.handle.net/20.500.11839/6598>

- Carroll, K. C., Hobden, J. A., Miller, S., Morse, S. A., Mietzner, T. A., Detrick, B., Mitchell, T. G., McKerrow, J. H., Sakanari, J. A. 2016. Microbiología médica. Capítulo 4. Crecimiento, supervivencia y muerte de microorganismos. 27va edición. Lange. San Francisco. Estados Unidos.
- CDCP. 2022. *Water sources*. Center for disease control and prevention. [https://www.cdc.gov/healthywater/drinking/public/water_sources.html#:~:text=Source%20water%20refers%20to%20bodies,\(for%20example%2C%20an%20aquifer\)](https://www.cdc.gov/healthywater/drinking/public/water_sources.html#:~:text=Source%20water%20refers%20to%20bodies,(for%20example%2C%20an%20aquifer))
- Chen, F. 1996. *High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth*. Trends Biotechnol. 14: 421-426.
DOI: [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(96\)10060-3](https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)10060-3)
- Ciferri, O. 1983. Spirulina, the Edible Microorganism. *Microbiological reviews*. 47(4): 551-578. DOI: <https://doi.org/10.1128%2Fmr.47.4.551-578.1983>
- Coelho, L. M., Rezende, H. C., Coelho, L. M., de Sousa, P. A. R., Melo, D. F. O., Coelho, N. M. M. 2015. Bioremediation of Polluted Waters Using Microorganisms. *Advances in Bioremediation of Wastewater and Polluted Soil*. DOI: 10.5772/60770
- Cohen, Z. 1997. The Chemicals of Spirulina. *Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, Cell-Biology and Biotechnology*. A. Vonshak, Ed. Taylor y Francis, pp. 175-204. London, Reino Unido.
[https://www.scirp.org/\(S\(czeh2tfqyw2orz553k1w0r45\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1052188](https://www.scirp.org/(S(czeh2tfqyw2orz553k1w0r45))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1052188)

- CONAGUA, SEMARNAT. 2009. Estadísticas del agua en México.
https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe_resumen14/06_agua/6_2_1.html
- CONAGUA. 2019. Manual de agua potable, alcantarillado y saneamiento, libro 24. Enlace: <https://files.conagua.gob.mx/conagua/mapas/SGAPDS-1-15-Libro24.pdf>
- Davis, M.L. 2010. Water and wastewater engineering. Design principles and practice. The McGraw-Hill Education, Inc. Capítulo 7. Lime-soda softening. Michigan, Estados Unidos.
- Degrémont. 2007. Water Treatment Handbook. Lavoisier. Francia.
- Demain, A. L., Adrio, J. L. 2008. Contributions of microorganisms to industrial biology. Molecular Biotechnology. 38(1): 41–55.
<https://doi.org/10.1007/s12033-007-0035-z>
- DOF. 2000. Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización". Secretaría de Salud. Poder Ejecutivo Federal. Ciudad de México, México.
- DOF. 2005. Norma Oficial Mexicana NOM-230-SSA1-2002, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano, requisitos sanitarios que se deben cumplir en los sistemas de abastecimiento públicos y privados durante el manejo del agua. Procedimientos sanitarios para el muestreo. Secretaría de Salud. Poder Ejecutivo Federal. Ciudad de México, México.
- DOF. 2009. Diario Oficial (Primera Sección). Modificación del inciso 0, el encabezado de la Tabla 13, el último párrafo del Anexo B y el apartado Signo decimal de la Tabla 21 de la Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI-2002, Sistema general de unidades de medida. CUARTO.- Se modifica el

encabezado de la tabla 13 para quedar como sigue: Tabla 21 – Reglas para la escritura de los números y su signo decimal. Signo decimal: El signo decimal debe ser una coma sobre la línea (,) o un punto sobre la línea (.). Si la magnitud de un número es menor que la unidad, el signo decimal debe ser precedido por un cero. Diario Oficial de la Federación: Jueves 24 de septiembre de 2009. Poder Ejecutivo Federal. Estados Unidos Mexicanos.

- DOF. 2020. Norma Oficial Mexicana NOM-179-SSA1-2020, Agua para uso y consumo humano. Control de la calidad del agua distribuida por los sistemas de abastecimiento de agua. Secretaría de Salud. Poder Ejecutivo Federal. Ciudad de México, México.
- DOF. 2022. Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-2021, Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de la calidad del agua. Secretaría de Salud. Poder Ejecutivo Federal. Ciudad de México, México.
- Duarte, A. 1996. Evaluación de los parámetros cinéticos de la ecuación de Monod. Ingeniería e Investigación. 33: 123-138.
<https://doi.org/10.15446/ing.investig.n33.20908>
- Estévez, L., Barajas, A., Barajas, C., Kafarov, V. 2013. Improvement of lipid productivity on *Chlorella vulgaris* using waste glycerol and sodium acetate. Ciencia, Tecnología y Futuro. 5(2): 113-126.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46529147009>
- Faust, S. D., Osman L. A. 1998. Chemistry of water treatment. Segunda edición. Boca Ratón, Florida. <https://doi.org/10.1201/9781315139265>
- Fernández, A. M., Izquierdo, E., Rodríguez, E. 2019. Taxonomía e importancia de "*Spirulina*" *Arthrospira jenneri* (Cyanophyceae: Oscillatoriaceae). Arnaldoa. 26(3). http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2413-32992019000300016

- Ferrera-Cerrato, R. G., Rojas-Avelizapa, N., Poggi-Varaldo, H., Alarcón, A., Cañizares-Villanueva, R. 2006. Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 48(2): 179-187. <https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2006/mi062s.pdf>
- Godoy, R. 2021. Carbono orgánico total. Centro universitario de estudio medioambientales. Seminario semanal. <https://rehip.unr.edu.ar/server/api/core/bitstreams/169b9525-0e84-4df4-8997-fd9b2bc87cc7/content>
- González-Delgado, A., Barajas-Solano, A., Ardila-Álvarez, A. 2017. Producción de biomasa y proteínas de *Chlorella vulgaris* Beyerinck (*Chlorellales: Chlorellaceae*) a través del diseño de medios de cultivo selectivos. *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecuaria*. 18(3): 451-461. <http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v18n3/0122-8706-ccta-18-03-00451.pdf>
- Hernández, F. 2016. Efecto de la deficiencia de nitrógeno y la radiación UV en la actividad fotosintética y en los compuestos antioxidantes de las cianobacterias *Spirulina (arthrospira) maxima* y *Phormidium persicinum*. La Paz, Baja California Sur. <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/496>
- Hernández, P. A., Labbé, J. I. 2014. Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 49(2): 157-173. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. *The Plant Journal for Cell and Molecular Biology*. 54(4): 621–639. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x>

- IGRAC. 2001. ¿Qué es el agua subterránea? *International Groundwater Resources Assessment Centre*. <https://www.un-igrac.org/es/es/que-es-agua-subterranea>
- Igunnu, T. E., Chen, Z. G. 2014. Produced water treatment technologies. *International Journal of Low-Carbon Technologies*. 9(3):157-177.
DOI: <https://doi.org/10.1093/ijlct/cts049>
- IMTA. 2019. Estudios de diagnóstico, diseños funcionales y elaboración de términos de referencia para la rehabilitación integral de seis plantas potabilizadoras en la ciudad de México. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. Ciudad de México, México.
- Kim, J., Lingaraju, B., Rheame, R., Lee, J., Siddiqui, K. 2010. Removal of ammonia from wastewater effluent by *Chlorella vulgaris*. *Tsinghua Science and Technology*. 15(4): 391-396. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1007-0214\(10\)70078-X](https://doi.org/10.1016/S1007-0214(10)70078-X)
- Kumar, A., Bisht, B., Joshi, V. D., Dhewa, T. 2011. Review on bioremediation of polluted environment: A management tool. *International Journal of Environmental Sciences*. 1(6): 1079–1093.
- Laing, I., Ayala, F. 1990. Commercial mass culture techniques for producing microalgae. *Introduction to Applied Phycology*. Akatsuka. 447-477.
- Latin American Journal of Aquatic Research, Special Issue. (40): 763-771. <https://dx.doi.org/103856/vol40-issue3-fulltext-23>
- Li, X., Xu, H., Wu, Q. 2007. Large scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*. 98(4): 764-771. DOI: <https://doi.org/10.1002/bit.21489>

- Loyola, I. 2018. Capítulo 8. Introducción a biorreactores. Autobiografía de San Ignacio Loyola, 134-153. <https://doi.org/10.2307/j.ctv893j76.10>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D., Clark, D. P. 2015. *Biology of microorganisms*. Pearson Education, Inc. 694. Illinois, Estados Unidos.
- Martins, A., Mata, T., Oliveira, O., Oliveira, S., Mendes, A., Caetano, N. 2016. Sustainability evaluation of biodiesel from *Arthrospira platensis* and *Chlorella vulgaris* under mixotrophic conditions and salinity stress. *Chemical Engineering Transactions*. 49: 571-576.
- Mathews y Van Holde, 1999. Tema 30. Ciclo del ácido cítrico. Reacciones, rendimiento energético y regulación. Reacciones anapleróticas. Ciclo del ácido glioxílico. *Bioquímica*. Ed. McGraw Hill. Cap 14: 533-545.
<https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Ciclo%20de%20Krebs.pdf>
- Moreno-Galván, A., Rojas-Tapias, D., Bonilla, R. 2012. Desarrollo y evaluación de un medio de cultivo alternativo para la multiplicación de *Azospirillum brasilense* C16 mediante diseños estadísticos secuenciados. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 13(2): 201-206.
- Nicolaou, S. A., Gaida, S. M., Papoutsakis, E. T. 2010. A comparative view of metabolite and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing: From biofuels and chemicals, to biocatalysis and bioremediation. *Metabolic Engineering*. 12(4): 307–331.
- Oliart-Ros, R. M., Sánchez-Otero, M. G., Manresa-Presas, Ángeles. 2016. Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. *CienciaUAT*. 11(1): 79-90.
DOI: <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v11i1.556>

- Pacheco, D., Rocha, C. A., Pereira, L., Verdelhos, T. 2020. Microalgae Water Bioremediation: Trends and Hot Topics. Applied Sciences, 10(5). [file:///C:/Users/HP/Downloads/applsci-10-01886%20\(8\).pdf](file:///C:/Users/HP/Downloads/applsci-10-01886%20(8).pdf)
- Parsons, S. A., Jefferson, B. 2006. Introduction to potable water treatment process. Blackwell Publishing Ltd. Inglaterra. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781444305470>
- Prieto, I., 2020. Estudio del crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* y su capacidad de depuración de agua residual. Universidad de Almería, España.
- Quintero, E., Arredondo, B.O., Flores E., Virgen, M., Barrera, E., Carballo, M. G. Maldonado, A. 2016. Selección de un medio de cultivo a nivel laboratorio para el cultivo de la cianobacteria *Spirulina (Arthrospira maxima)* y cuantificación de los nutraceuticos. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos. 1(1): 532-537. Enlace: <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/1/4/91.pdf>
- Ramírez-Carreto, S., Miranda-Zaragoza, B., Rodríguez-Almazán, C. 2021. Purificación de proteínas. Mensaje Bioquímico. 45: 35-47. <http://bq.facmed.unam.mx/tab/wp-content/uploads/2021/06/7-Rodriguez-Purificacion.pdf>
- Ramos, R., Pizarro, R. 2018. Crecimiento y capacidad de biorremediación de *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophycea, Chlorophyta) cultivada en aguas residuales generadas en el cultivo del pez dorado *Seriola lalandi* (Perciformes: Carangidae). Revista de Biología Marina y Oceanografía. 53(1): 75-86. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572018000100075>
- Richmond, A. 2004. Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: An overview. Hydrobiology. 512(1): 33-37. DOI: <https://doi.org/10.1023/B:HYDR.0000020365.06145.36>

- Rojas, Elizabet, Ávila, Marcela, Parada, Gustavo. (2012). Aplicación de estrategias nutricionales y su efecto en el crecimiento en el cultivo continuo de *Spirulina* (*Arthrospira platensis*). Latin american journal of aquatic research, 40(Special Issue), 763-771. <https://dx.doi.org/103856/vol40-issue3-fulltext-23>
- Romero, L., Guevara, M., Félix, J. 2017. *Growth and pigments of Spirulina subsalsa grown at different salinities and nitrogen concentrations*. Tiempo y Economía. 1(2). DOI: <https://doi.org/10.21789/22561498.1402>
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pierre-Yves, P., Vaca-Garcia, C. 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews. (35): 265-2788. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>
- Shi, W., Li, S., Li, G., Wang, W., Chen, Q., Li, Y., Ling X. 2016. Investigation of main factors affecting the growth rate of Spirulina. Optik. 127(16): 6688-6694. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijleo.2016.04.125>
- Shiomi, N. 2015. Capítulo 1. Bioremediation of Polluted Waters Using Microorganisms. En: Advances in Bioremediation of Wastewater and Polluted Soil. Coelho L. M., Rezende H. C., de Sousa P. A., Melo D. F., Coelho N. M. pp. 284. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/60770>
- Silos, A. C. 2021. Efecto del medio de cultivo sobre el crecimiento y valor nutricional de *Arthrospira maxima*. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.
<https://repositorioinstitucional.uaslp.mx/xmlui/handle/i/7409>
- Studylib. 2013. *Chlorella vulgaris*. <https://studylib.es/doc/4467717/chlorella-vulgaris>
- Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y., Wang, Y., Ruan, R. 2010. Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal

