Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA (UAM)-UNIDAD IZTAPALAPA

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN
DE CO₂ EN LA ELIMINACIÓN DE N y P DE AGUA
RESIDUAL DE LA UAM IZTAPALAPA,
MEDIANTE EL CULTIVO DE *Chlorella* SP.**

Tesis que presenta

EB. Nancy Nayeli Domínguez Alfaro

Para obtener el título de:

Maestra en Ciencias (Energía Y Medio Ambiente)

Asesor:

Dr. Hugo Joaquín Ávila Paredes

Jurado calificador:

Presidente:

Dra. María de Lourdes Moreno Rivera

Secretaria:

Dra. Blanca Estela Chávez Sandoval

Vocal:

Dr. Emilio Arenas Guerrero

México, Cd. de Méx., junio de 2017

AGRADECIMIENTOS

Por la ayuda proporcionada para la realización de experimentos al Dr. Jaime Eduardo Vernon Carter (Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, UAM Iztapalapa), Ing. María Isabel Reyes Arreozola (Departamento de Biotecnología, UAM Iztapalapa), a la Dra. Margarita Mercedes González Brambila, a la Dra. Blanca Estela Chávez Sandoval y a Martha Beatriz Mijangos Ramírez (Departamento de Energía, UAM Azcapotzalco), Nathaly Hernández Daza (XXVI Verano de la Investigación Científica), Andrea González Gutiérrez, María de Jesús Pineda Pacheco, Eduardo Martínez Niño, Andrea Navarrete Cárdenas, Aralia Carolina Ciciliano Cordero, César Ignacio Ramos Villegas y Gregorio Guzmán González (Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, UAM Iztapalapa) y finalmente, al IBI Alejandro Ferreira Rolón (Encargado de la PTAR, UAM Iztapalapa).

A mis compañeros de posgrado: Jaqueline Hernández Madrigal, Hilda Aydé López Córdoba, Marisol Martínez Hernández, Alejandría Pérez Valseca, César Ramírez Cisneros y Juan Carlos Paredes Ramírez por su amistad y los consejos que me dieron a lo largo de la carrera.

Agradecimiento especial al Dr. Hugo Joaquín Ávila Paredes por la guía, la confianza y la oportunidad de formar parte de este proyecto.

A CONACYT por la beca para mis estudios de Maestría (2015-2016).

DEDICATORIA

A mi familia: mis padres, Teresa Alfaro y Jorge Domínguez, a mis hermanos, Jesús Jorge y Mónica L. que son todo para mí, y por quien siempre busco lograr lo mejor.

“Es imposible interactuar con el agua sin provocarle algún daño: esto es un proceso natural. Así pues, debemos ver con realismo cuáles son los niveles tolerables de contaminación del agua respecto al grado de interacción que se vaya a tener con ella.”

Dr. Manuel Guerrero Legorreta (El Agua, 1991).

ÍNDICES

ÍNDICE DE CONTENIDO

Resumen.....	1
1. Introducción.....	4
2. Marco teórico.....	7
2.1 Problemática del agua en el mundo.....	8
2.2 Aguas residuales domésticas en México.....	10
2.3 Tratamiento de agua residual doméstica.....	11
2.3.1 Sistema de tratamiento de agua residual.....	11
2.3.2 Planta de tratamiento de agua residual (PTAR) de la UAM-I.....	15
2.4 Contaminantes presentes en el agua residual disponibles para biorremediación.....	17
2.4.1 Contaminantes nitrogenados.....	18
2.4.2 Contaminantes fosforados.....	23
2.4.3 Tipos de biorremediación.....	25
2.5 Fitorremediación.....	26
2.5.1 Curva de crecimiento típica de las microalgas.....	29
2.5.2 Condiciones de cultivo.....	31
2.5.2.1 Luz.....	31
2.5.2.2 Temperatura.....	32
2.5.2.3 Oxígeno disuelto (OD).....	33
2.5.2.4 Dióxido de carbono (CO ₂).....	34
2.5.2.5 Potencial de hidrógeno (pH).....	37
2.5.2.6 Nutrientes.....	38
2.5.3 Fitorremediación y productos de valor agregado.....	40
2.5.3.1 Potencial de valor agregado	40
2.5.3.2 Microalgas como fuente de biocombustibles de cuarta generación.....	42
3. Justificación del proyecto.....	45
4. Preguntas de investigación.....	47
5. Hipótesis.....	49
6. Objetivos.....	51
6.1 Objetivo general.....	52
6.2 Objetivos particulares.....	52
7. Metodología experimental.....	53

7.1 Diagrama del diseño experimental.....	54
7.1.1 Investigación bibliográfica.....	55
7.1.2 Cepas seleccionadas: características de las especies y condiciones de cultivo.....	55
7.1.3 Mantenimiento y propagación de las cepas de <i>Chlorella</i> sp.	56
7.1.3.1 Diseño del sistema de aireación para cultivo en botella de 1 L.....	57
7.2 Cultivo de <i>Chlorella</i> sp. en medio basado con fertilizantes comerciales.....	58
7.2.1 Evaluación de fertilizantes comerciales como medio de cultivo para la cepa.....	58
7.2.2 Determinación de las cinéticas de crecimiento.....	59
7.2.3 Extracción de lípidos de <i>Chlorella</i> sp. mantenida en medios de cultivo basado en fertilizantes comerciales.....	60
7.3 Caracterización fisicoquímica del efluente del reactor UASB de la PTAR de la UAM Iztapalapa como medio de cultivo para <i>Chlorella</i> sp.	61
7.3.1 Muestreo del agua residual.....	61
7.3.2 Caracterización fisicoquímica del agua residual.....	61
7.4 Evaluación del crecimiento y la remoción de nitrógeno y fósforo de agua residual con <i>Chlorella</i> sp. a diferentes concentraciones de CO ₂	63
7.5 Gabinete.....	65
8. Resultados y discusión	67
8.1 Mantenimiento y propagación de las cepas de <i>Chlorella</i> sp.	68
8.2 Evaluación de fertilizantes comerciales como medio de cultivo.....	69
8.3 Cinética de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714 en medio de cultivo basado en fertilizantes comerciales	69
8.4 Contenido lipídico de <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714 mantenida en medios de cultivo basados en fertilizantes comerciales.....	73
8.5 Caracterización fisicoquímica del agua residual doméstica de la PTAR de la UAM-I.....	75
8.6 Cinética de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714 en agua residual doméstica a diferentes concentraciones de CO ₂	76
8.7 Remoción de nitrógeno y fósforo con <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714 en agua residual doméstica a diferentes concentraciones de CO ₂	81
9. Conclusiones.....	92
10. Referencias.....	95
11. Anexos.....	110

11.1 Taxonomía de las especies de <i>Chlorella</i> sp.	111
11.2 Mantenimiento de las cepas.....	111
11.3 Determinación de la concentración de la demanda química de oxígeno (DQO).....	116
11.4 Determinación de la concentración de nitrato.....	117
11.5 Determinación de la concentración de nitrito.....	118
11.6 Determinación de la concentración de fosfato.....	120
11.7 Curvas estándar de los nutrientes.....	122
11.8 Medio de cultivo Bold 3N modificado con pH 7.....	124
11.9 Contenido de los fertilizantes comerciales en los experimentos.....	124
11.10 Curvas estándar de <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714 en distintos medios.....	126
11.11 Curva de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714 en agua residual de la UAM Iztapalapa, aireada con bomba de aire.....	128
Ponencias.....	129

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Destino de las extracciones mundiales de agua dulce: Consumo y producción de aguas residuales por sector principal de uso del agua, aproximadamente 2010 (WWAP, 2017).....	8
Figura 2. Porcentaje de aguas residuales no tratadas en 2015 en países con diferentes niveles de rentas y aspiraciones para 2030 (50% de reducción sobre la base de 2015).....	9
Figura 3. Agua residual municipal tratada en México (CONAGUA, 2014).....	11
Figura 4. Esquema de los procesos en serie que conforman el sistema de una planta de tratamiento de aguas residuales.....	12
Figura 5. Planta de tratamiento de la UAM Iztapalapa: (1) cárcamo con rejilla, (2) desarenador, (3) reactor anaerobio de flujo ascendente o UASB, (4) humedales artificiales, (5) ozonizador, (6) cárcamo con agua residual tratada.....	16
Figura 6. Efecto del pH sobre la proporción entre amonio y amoníaco (Denmead et al., 1960).....	19
Figura 7. Efecto del pH sobre el proceso de nitrificación (Shamas, 1986).....	21
Figura 8. Efecto de la temperatura sobre la actividad nitrificante (Shamas, 1986).....	22
Figura 9. Efecto del pH sobre la fracción molar de fósforo total (Saha, 1996).....	24

Figura 10. Remoción de nitrógeno total (NT) y fósforo total (PT), en miligramos por litro de agua residual doméstica por día, obtenidos de Choi & Lee, 2012 (1); Dinesh et al., 2015 (2); Su et al., 2012 (3); Su et al., 2012' (4).....	27
Figura 11. Curva de crecimiento típica de una cepa de microalga, densidad celular (concentración de células o biomasa) con respecto al tiempo.....	29
Figura 12. Capacidad de captura de CO ₂ de diferentes especies de microalgas (Ho et al., 2011).....	36
Figura 13. Efecto del CO ₂ en el pH de una solución acuosa a 25°C (Allende, 1976).....	37
Figura 14. Contenido de lípidos de algunas especies de microalgas (Arias et al., 2013).....	44
Figura 15. Información contenida en la etiqueta de cada recipiente de las muestras biológicas.....	56
Figura 16. Esquemas de duplicado y escalado de las muestras biológicas: a) Duplicado de muestra biológica o cepa (50 % biomasa + 50 % medio de cultivo en cada tubo), b) Escalado de muestra biológica (100 % biomasa + 100 % medio de cultivo en la botella final).....	57
Figura 17. Diagrama del sistema de aireación para el mantenimiento de microalgas, con un solo puerto.....	58
Figura 18. Diagrama del sistema de cultivo para el experimento de microalgas con fertilizantes comerciales como medio de cultivo, con un solo puerto de muestreo	59
Figura 19. Sistemas para extracción de lípidos: a) extractor Soxhlet, b) destilación del solvente.....	61
Figura 20. Diagrama del sistema de cultivo con tres puertos para el experimento de microalgas con agua residual como medio de cultivo y suministro de aire con CO ₂	64
Figura 21. Curvas de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714 en medios con los fertilizantes Folim®, Vita® y Bold 3N modificado, a una temperatura de 25 ± 2 °C.....	70
Figura 22. Curvas de pH de <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714 en medios con los fertilizantes Folim®, Vita® y Bold 3N modificado, a una temperatura de 25 ± 2 °C.....	71
Figura 23. Concentración de biomasa y porcentaje de lípidos extraídos de <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714.....	74
Figura 24. Curvas de crecimiento en densidad celular de <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714, cultivada a diferentes concentraciones de CO ₂ a 25.5 ± 1.0 °C.....	76

Figura 25. Cantidad de biopelícula obtenida durante el crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714, cultivada a diferentes concentraciones de CO ₂	77
Figura 26. Esquema de la biopelícula de <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714, formada a los 36 días de cultivo a diferentes concentraciones de CO ₂	78
Figura 27. Curvas de pH de <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714, cultivada a diferentes concentraciones de CO ₂ , a 25.5 ± 1.0 °C.....	79
Figura 28. Curvas de remoción de nitrato con <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714 a diferentes concentraciones de CO ₂	82
Figura 29. Curvas de remoción de nitrito con <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714 a diferentes concentraciones de CO ₂	82
Figura 30. Curvas de remoción de amonio con <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714 a diferentes concentraciones de CO ₂	83
Figura 31. Curvas de remoción de amoniaco con <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714 a diferentes concentraciones de CO ₂	84
Figura 32. Curvas de remoción de fosfato con <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714 a diferentes concentraciones de CO ₂	85
Figura 33. Logaritmo de la concentración de cada forma de los nutrientes presentes en el agua residual de la UAM-I en función del pH. Elaboración propia, con programa MEDUSA 1.0.....	86
Figura 34. Curvas de remoción de la concentración de nitrógeno total (NT) por <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714 a diferentes concentraciones de CO ₂	87
Figura 35. Curvas de remoción de la concentración de fósforo total (PT) por <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714 a diferentes concentraciones de CO ₂	87

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Características del reactor UASB de la UAM Iztapalapa (2011).....	16
TABLA 2. Formas del nitrógeno inorgánico, en agua residual doméstica, según su estado de oxidación (EPA, 1998).....	18
TABLA 3. Efecto del pH en la disociación del NH ₃ en agua.....	20
TABLA 4. Mínima y máxima iluminación, frecuencia de luz y fotoperiodo de distintas especies de microalgas.....	32
TABLA 5. Temperatura óptima y cantidad de biomasa obtenida (g/L·d) a esa temperatura, de distintas especies de microalgas.....	33

TABLA 6. Cantidad de oxígeno disuelto inicial y final en un determinado tiempo de cultivo y productividad de biomasa para cuatro diferentes especies.....	34
TABLA 7. Especies de microalgas, su velocidad o fijación diaria de CO ₂ y el crecimiento o productividad de biomasa (% o g/L·d).....	35
TABLA 8. Especies de microalgas, su pH óptimo y biomasa producida (g/L·d); diferencia de pH respecto al tiempo para <i>Chlorella</i> sp.....	38
TABLA 9. Algunos medios de cultivo definidos que se utilizan para microalgas.....	39
TABLA 10. Contenido de compuestos de valor agregado en <i>Chlorella vulgaris</i> en g/100 g de peso seco (Safi et al., 2014).....	41
TABLA 11. Flujos de CO ₂ , aire y total suministrados a los cultivos.....	63
TABLA 12. Técnicas utilizadas para la medición de nutrientes en el fotómetro multiparamétrico HI 83203.....	65
TABLA 13. Escalamiento de las 3 cepas mantenidas en laboratorio, a lo largo de 15 meses.....	68
TABLA 14. Solubilidad de los fertilizantes después del ajuste a pH 7.....	69
TABLA 15. Productividad de densidad celular de crecimiento en la fase exponencial y tasa específica de crecimiento.....	72
TABLA 16. Concentración de biomasa y porcentaje de lípidos extraídos de <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714.....	74
TABLA 17. Temperatura y pH registrados para el influente y efluente del reactor UASB de la UAM-I.....	75
TABLA 18. Caracterización fisicoquímica de las muestras de influente y efluente del reactor UASB de la UAM-I.....	75
TABLA 19. Productividades de densidad celular de <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714 en la fase exponencial.....	80
TABLA 20. Porcentaje de remoción de N y P en agua residual con <i>Chlorella vulgaris</i> de estudios reportados en la literatura.....	89

SIGLAS Y ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius.
μ	Constante específica de velocidad de crecimiento (h^{-1})
μ_{max}	Constante máxima específica de velocidad de crecimiento (velocidad máxima de crecimiento por unidad de biomasa) y tiene unidades de tiempo h^{-1} .
cél	células.
CONAGUA	Comisión Nacional del Agua en México.
d	Día.
DBO ₅	Demanda biológica de oxígeno después de 5 días de incubación a 20 °C.
DQO	Demanda química de oxígeno.
e ⁻	Electrón.
EGSB	Expanded Granular Sludge Bed (Reactor de Lecho Granular Expandido).
EPA	U.S. Environmental Protection Agency (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos).
H ₂ O _d	Agua destilada.
H ₂ O _r	Agua residual.
HI	Hanna Instrument®.
hm ³	Hectómetro cúbico, equivalente a un ggalitro (1×10^9 L).
Hz	Hercio o hertz, unidad de frecuencia.
K _s	Constante de solubilidad.
L.	Inicial del apellido de Carl Linnaeus, taxónomo.
L	Litro.
LED	Light Emitting Diode (Diodo emisor de luz).
Ln	Logaritmo natural
Lux	Unidad para la iluminancia o nivel de iluminación equivale a 1 lumen/m^3 o $1 \text{ cd} \cdot \text{sr/m}^2$.
M _{bio}	Peso molar de la biomasa calculado respecto a la composición de la biomasa.
MO	Materia orgánica.
N- NH ₃	Nitrógeno de ión amoniac.

N- NH ₄ ⁺	Nitrógeno de ión amonio.
N-NO ₃ ⁻	Nitrógeno de ión nitrato.
NOM	Norma Oficial Mexicana.
NP	Relación nitrógeno-fósforo.
NPK	Relación nitrógeno-fósforo-potasio.
NT	Nitrógeno total.
OD	Oxígeno disuelto.
pH	Potencial de hidrógeno.
pK _a	Constante de disociación ácida.
PT	Fósforo total.
PTAR	Planta de tratamiento de aguas residuales.
RGB	Red-Green-Blue, al variar la intensidad de corriente de cada led se producen diferentes colores.
SBR	Sequential Batch Reactors (Reactor de Lotes Secuenciales).
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
sp.	Especie.
UASB	Upflow Anaerobic Blanket (Reactor Anaerobio de Flujo Ascendente, RAFA).
UTEX	University of Texas at Austin (Universidad de Texas en Austin).
UV	Luz ultravioleta.
vvm	Tasa de aireación, flujo de aire entre volumen del líquido (L/min·L _{Liq.}).

RESUMEN

RESUMEN

Al proceso de remover contaminantes del agua residual a través del metabolismo de las microalgas se le conoce como ficorremediación, éstas son capaces de remover el nitrógeno y el fósforo aprovechándolos para su crecimiento; al ser microorganismos autótrofos pueden realizar fotosíntesis por ello también son eficientes en la mitigación de CO₂. Entre sus aplicaciones también se encuentra el aprovechamiento de sus metabolitos (colorantes, proteínas y lípidos), aunque la producción de dichos compuestos varía según la especie y las condiciones de cultivo. Por otro lado, las microalgas presentan la ventaja de poderse adaptar y cultivar en distintos medios (por ejemplo, distintos tipos de agua residual o fertilizantes comerciales), aumentando así su nivel de sustentabilidad. Entre los 8 y 12 géneros, que se encuentran en aguas residuales y que además tienen una alta capacidad de captación de CO₂, se encuentra el género *Chlorella* sp. por lo que fue seleccionado como sistema modelo del presente estudio con el fin de acoplar la ficorremediación con la mitigación de CO₂.

La metodología se realizó en dos partes: (1) la evaluación de cinco fertilizantes comerciales como medio de cultivo para lograr una económica y alta producción de biomasa, y (2) la evaluación de la cantidad de remoción de N y P del efluente del reactor UASB de la PTAR de la UAM-I a distintas concentraciones de CO₂, por la misma cepa.

La cepa seleccionada en el laboratorio fue *Chlorella vulgaris* UTEX 2714, ésta se mantenía en Bold 3N modificado y las condiciones de cultivo en las que se tenía eran: agitación manual diaria, temperatura y pH iniciales de 26 °C y 7, respectivamente; ciclos de luz: oscuridad de 12-12 h cada uno a una intensidad de 570 lux.

La primera parte de la experimentación se realizó en matraces Erlenmeyer de 125 mL, con 95 mL de medio de cultivo con 50% de inóculo, por triplicado, durante 12 días (mismas condiciones de cultivo). Los 5 fertilizantes comerciales (Scotts®, Miracle-Gro®, Vita®, FixaFol® y Folim®) fueron ajustados a pH 7 y con una concentración de nitrógeno de 0.1 g/L, igual que su medio de referencia (Bold 3N modificado). De los fertilizantes evaluados, los que no presentaron precipitados fueron Folim® y Vita®; la densidad celular obtenida en el periodo de estudio fue de $(8.1 \pm 1.28) \times 10^6$ cél/mL y $(3.82 \pm 0.7) \times 10^6$ cél/mL, respectivamente. También se encontró que el contenido de lípidos fue de 56.79 ± 1.94 % para Folim® y 51.64 ± 1.42 % para Vita® (éste se determinó con sistema Soxhlet).

Para el medio de referencia los resultados obtenidos fueron: $(6.46 \pm 1.74) \times 10^6$ cél/mL y 40 ± 0.11 % de lípidos.

La segunda parte de la experimentación se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 mL, con 200 mL de medio de cultivo con 50% de inóculo, por duplicado, durante 20 días (mismas condiciones de cultivo). El sistema fue suministrado con un flujo de aireación de 0.96 L/min con 0, 2 y 10 % de CO₂. La densidad celular alcanzada en el periodo de estudio fue de $(1.09 \pm 0.28) \times 10^7$ cél/mL sin CO₂, $(1.19 \pm 0.82) \times 10^7$ cél/mL con 2 % de CO₂ y $(5.42 \pm 0.44) \times 10^6$ cél/mL con 10 % de CO₂. También se encontró una mayor formación de biopelícula y biomasa suspendida a 2 % de CO₂ que sin y a 10 % de CO₂, esta fue de: 0.34 ± 0.001 g, 0.23 ± 0.001 g y 0.05 ± 0.001 g, respectivamente. En cuanto a la remoción de nutrientes se observó un porcentaje de remoción de NT de: 92.28 ± 7.88 % sin CO₂, 100.00 ± 1.65 % con 2 % CO₂ y 89.22 ± 6.10 % con 10 % de CO₂; y de PT de 81.74 ± 0.08 % de remoción sin CO₂, 89.04 ± 0.08 % con 2 % CO₂ y 74.43 ± 0.08 % con 10 % de CO₂.

Finalmente se concluyó que el fertilizante Folim[®] es adecuado como medio de cultivo para *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 al tener un crecimiento similar al del medio Bold 3N modificado (su medio de cultivo convencional) y que la misma cepa es capaz de crecer en agua residual con un flujo de 2 % de CO₂ como sin él; en cuya concentración de dióxido de carbono, la eliminación de NT y PT es la mayor. Por lo que el mejor porcentaje, de los evaluados en éste estudio, para acoplar la eliminación de nutrientes y la mitigación de CO₂ con *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 es a 2 %.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Los contaminantes del agua pueden ser de muy diversa índole: residuos sólidos, líquidos o gaseosos; sólidos en suspensión, materia tóxica, microorganismos infecciosos, etc. Estas sustancias dan al agua propiedades indeseables como corrosividad, toxicidad, mal olor, mal sabor y mala apariencia (Guerrero, 1991). Las aguas contaminadas pueden restaurarse a una condición de reuso, para ello es necesario identificar su composición y poder dar así el tratamiento adecuado para la eliminación de cada una de las sustancias indeseables del agua. En ello también se considera el destino final del agua. Estos tratamientos suelen ser muy complejos y costosos (Guerrero, 1991). Los métodos aplicados en el tratamiento de efluentes o agua contaminada se clasifican en tres tipos: físicos, químicos y biológicos; en general, los métodos físicos y químicos son más costosos que los biológicos (Ranuka et al., 2015). Además, la mayoría de los métodos químicos aumentan el pH, la conductividad y la carga global de la materia disuelta en las aguas residuales, mientras que el biotratamiento o tratamiento biológico de las aguas residuales, el uso de plantas y microorganismos, son una opción más económica (Ranuka et al., 2015). De manera general, las aguas con desechos líquidos procedentes de diferentes sectores industriales (agroindustria, alimentaria, petroquímica) y las aguas negras municipales son tratadas por vía biológica (como se mencionará en la sección 2.2.1 Sistema de tratamiento de agua residual, 4.Tratamiento terciario), en que los microorganismos juegan un papel importante en el proceso de depuración de agua residual. Actualmente el uso de plantas acuáticas, procesos bacteriológicos y microalgas para la remediación de agua residual, son algunas opciones para mejorar la calidad del agua tratada además de aumentar la eficiencia de las plantas de tratamiento (Angelakis et al., 1999; Celis et al., 2005).

La fitorremediación es el uso de plantas (incluidas las algas o plantas inferiores) y microflora asociada para la eliminación o la biotransformación de contaminantes incluyendo nutrientes, metales pesados, etc. de las aguas residuales y parecen ser una opción prometedora. (Ranuka et al., 2015). El tratamiento de aguas residuales con microalgas, se conoce como ficorremediación; es un término relativamente reciente (John, 2000). La ficorremediación es particularmente atractiva porque tiene la capacidad de hacer frente a más de un problema a la vez. Los atributos prometedores de las microalgas, son tales como (1) una capacidad fotosintética mayor en comparación con las plantas superiores, (2) tolerancia a condiciones extremas, (3) capacidad para incorporar el exceso de nutrientes tales como nitrógeno y fósforo de aguas residuales para su

crecimiento, por lo que los elimina con facilidad, (4) la capacidad de reducir las emisiones de gases de efecto invernadero como el dióxido de carbono (CO₂), y (5) amplias aplicaciones para la biomasa cosechada.

En el contexto antes descrito, el estudio reportado aquí está enfocado en determinar la capacidad de remoción de nitrógeno y fósforo, al acoplarse a la mitigación de CO₂.

MARCO TEÓRICO

2. MARCO TEÓRICO

2.1 PROBLEMÁTICA DEL AGUA EN EL MUNDO

La disponibilidad de agua promedio anual en el mundo es de aproximadamente 1,386 millones de km³, de los cuales el 97.5 % es agua salada y sólo el 2.5 %, es decir 35 millones de km³, es agua dulce. De esta cantidad casi el 70 % no está disponible para consumo humano debido a que se encuentra en forma de glaciares, nieve o hielo (CONAGUA, 2011).

El agua dulce es el recurso más importante para la humanidad y está presente en todas sus actividades sociales, económicas y ambientales. Según la UNESCO uno de los problemas más importantes a nivel mundial de los últimos años, ha sido el abasto de agua para las comunidades en general, en algunos casos, esto se ha debido a la falta de uso racional por parte de la población (WWAP, 2017).

La FAO calcula que cada año se extraen en el mundo unos 3.928 km³ de agua dulce. Se estima que el 44 % de dicha agua (1.716 km³ al año) se consume principalmente en la agricultura a través de la evaporación en las tierras de cultivo irrigadas. El 56 % restante (2.212 km³ al año) se libera en el medio ambiente como aguas residuales en forma de efluentes municipales e industriales y agua de drenaje agrícola (figura 1).

Figura 1. Destino de las extracciones mundiales de agua dulce: Consumo y producción de aguas residuales por sector principal de uso del agua, aproximadamente 2010 (WWAP, 2017).

Se prevé que la demanda de agua en el mundo entero aumente en las próximas décadas. Además de la demanda de agua en el sector agrícola, que es responsable del 70 % de la captación de agua a nivel mundial, se prevén grandes aumentos en la demanda de agua, en particular para la industria y la producción de energía (WWAP, 2015).

Tener demasiada agua (inundaciones) o extrema escasez (sequía), lo que a menudo va acompañado de agua demasiado sucia (concentraciones más elevadas de contaminación en ambos extremos), hace que la necesidad de aprovechar las aguas residuales sea aún mayor. La ONU afirma que, con el fin de garantizar el suministro de agua, se deben proteger los sistemas hídricos vulnerables, reducir el impacto de desastres como las inundaciones y las sequías, garantizar el acceso al agua y sus servicios, y gestionar de forma adaptada y equitativa los recursos hídricos (WWAP, 2015).

En todos los países, excepto los más desarrollados, la mayor parte de las aguas residuales se vierte directamente al medio ambiente sin un tratamiento adecuado, es decir, aproximadamente solo dos terceras partes de la población mundial tienen acceso al saneamiento mejorado (UNICEF/WHO, 2015). Esto tiene repercusiones negativas en la salud humana, la productividad económica, la calidad de los recursos de agua dulce ambiental y los ecosistemas. Otra desventaja son los costes de recolecta que ascienden a más del 60 % del presupuesto total de la gestión de las aguas residuales, en particular en comunidades con baja densidad de población (Massoud et al., 2009), debido a las diferencias en los niveles actuales de tratamiento de las aguas residuales, supondrán una carga económica mayor para los países con rentas bajas y medio-bajas (Figura 2).

Figura 2. Porcentaje de aguas residuales no tratadas en 2015 en países con diferentes niveles de rentas y aspiraciones para 2030 (50 % de reducción sobre la base de 2015).

Mejorar la gestión de las aguas residuales será fundamental para el crecimiento verde, especialmente en el ámbito de la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible. La Meta 6.3 de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) aboga explícitamente por la reducción de la contaminación y mejoras en el vertido, gestión y tratamiento de las aguas. Según la UNESCO (2017) las aguas residuales pueden ser una fuente rentable y sostenible de energía, nutrientes y materia orgánica, entre otros subproductos útiles. Los potenciales beneficios de la extracción de dichos recursos van mucho más allá de la salud humana y medioambiental, con posibles repercusiones en la seguridad alimentaria y energética, así como también en la mitigación del cambio climático (WWAP, 2017).

En América Latina y el Caribe el 80% de la población vive en áreas urbanas, esta es una de las regiones más urbanizadas del mundo, y se espera que se urbanice aún más, ya que se prevé que en el año 2050 el 86 % de su población viva en ciudades (UNDESA, 2014). Únicamente Chile trata prácticamente todas sus aguas residuales urbanas, mientras que en grandes ciudades como Buenos Aires, Bogotá, Lima, México y San Pablo existen planes ambiciosos para la ampliación de las obras de tratamientos de aguas residuales, pero en su mayoría han sido aplazados por muchos años debido a restricciones presupuestarias e institucionales.

2.2 AGUAS RESIDUALES DOMÉSTICAS EN MÉXICO

En México el tratamiento de agua residual ha tenido principalmente: déficit de infraestructura, altos costos de instalación, operación y mantenimiento, así como falta de personal capacitado (Castañeda Villanueva & Flores López, 2013). En el año 2014, según datos de CONAGUA (Comisión Nacional del Agua), el total de aguas residuales generadas en México fue de 7.26 mil hm³/año, y las 2287 plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) municipales que se encuentran en operación dentro del país solo trataron 3.34 mil hm³/año, es decir el 46.2 % de agua residual, que fue recolectada en el sistema de alcantarillado; el 45 % es recolectada en alcantarillado, pero no es tratada y el 9 % no es recolectada ni tratada (Ver figura 3).

En México, se utilizan varios parámetros expresados en la normatividad oficial vigente, contenidos principalmente en las normas oficiales mexicanas: NOM-001-SEMARNAT-1996, NOM-002-SEMARNAT-1996, NOM-003-SEMARNAT-1997 y NOM-004-SEMARNAT-2002 para cuantificar el grado de contaminación y poder establecer el sistema de tratamiento de agua residual más adecuado.

Figura 3. Agua residual municipal tratada en México (CONAGUA, 2014).

2.3 TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL DOMÉSTICA

2.3.1 SISTEMA DE TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL

Una planta de tratamiento de agua residual (PTAR) es un sistema que consiste de una serie de procedimientos físicos, químicos y biológicos (figura 4), que tratan de devolver al medio natural el agua que fue empleada para diferentes usos (Eilbeck & Mattock, 1987; Ramahlo, 1991).

1. Pretratamiento: tiene por objetivo separar los sólidos en suspensión o flotantes. Es la primera etapa de la descontaminación y utiliza procesos físicos, en esta fase se remueven los sólidos presentes en las aguas residuales (basura), a través de rejillas, rejillas o desarenadores (partículas pesadas como arenas, grava y semillas) (Kelly, 1998).

Los mecanismos de pretratamiento son:

- *Desbaste o retención.* A través de rejillas finas o gruesas se separan los materiales más voluminosos. Posteriormente mediante una cinta transportadora se depositan en contenedores para su transporte a vertederos municipales o incineradoras.
- *Desarenado.* En esta parte del sistema el agua residual circula en cámaras a velocidades controladas y relativamente bajas para provocar el depósito o precipitación de arenas en

el fondo para su posterior extracción y eliminación. Para evitar malos olores se procede a inyectar aire durante este proceso

- **Desengrasado.** Se procede a la eliminación de grasas, aceites, y otros materiales flotantes. Su mecanismo es similar que el anterior.

Figura 4. Esquema de los procesos en serie que conforman el sistema de una planta de tratamiento de agua residual.

2. **Tratamiento Primario:** tiene por objetivo separar sólidos y materiales no disueltos (ej.: grasas, coloides), además de la neutralización, a través de procesos fisicoquímicos y también se busca estabilizar el flujo (Kelly, 1998; Ramahlo, 1991).

Incluye normalmente la neutralización de pH, regulación de caudal y estabilización térmica (Ramahlo, 1991). La variedad de sistemas disponibles comercialmente es muy amplia. Los sólidos se eliminan usando mecanismos de sedimentación o floculación (Kelly, 1998).

3. **Tratamiento Secundario:** El objetivo de esta etapa es el de eliminar la materia orgánica solubilizada (como una fuente de carbono para microorganismos) por medio de procesos biológicos aerobios y/o anaerobios (Davis & Cornwell, 1991; Kelly, 1998; Eilbeck & Mattock, 1987).

Estos procesos son utilizados en los sistemas de tratamiento biológico de efluentes contaminados con material orgánico bioutilizable. Las diferencias entre los diferentes procesos se manifiestan en el tipo de microorganismos utilizados, la configuración de los biorreactores, su modo de operación y el tipo de actividad biológica presente (Davis & Cornwell, 1991).

En estos sistemas, los contaminantes orgánicos son degradados por organismos que los transforman en compuestos más simples, de fácil eliminación (ej.: CO₂, CH₄) o los incorporan a procesos de síntesis de material celular y, por lo tanto, son concentrados en la biomasa. Esta última puede entonces ser eliminada con más facilidad por procesos de separación

sólido-líquido (Eilbeck & Mattock, 1987). Los microorganismos juegan un papel fundamental en esta etapa del sistema de tratamiento de residuos líquidos. En términos generales, los microorganismos heterótrofos necesitan carbono (C), nitrógeno (N), fósforo (P) y trazas de metales para llevar a cabo las reacciones metabólicas y reproducirse. Dichos microorganismos se clasifican en aeróbicos (requieren del O₂ del aire para sobrevivir) y anaeróbicos (no requieren de O₂ para sobrevivir) (Kelly, 1998).

Opciones de Tratamiento Anaerobio o Anaeróbico:

Reactor Anaerobio de Flujo Ascendente (RAFA o UASB, por sus siglas en inglés, Upflow Anaerobic Sludge Blanket). El flujo ascendente del agua mantiene en suspensión a la masa bacteriana que forma gránulos o flóculos de fácil sedimentación, permitiendo un buen contacto entre las partículas de materia orgánica y las bacterias, facilitando su digestión. Se pueden manejar cargas orgánicas superiores a 4 kg/m³·d y con agua con 600 mg/L hasta 50,000 mg/L de DBO₅ (Seghezzo et al.; 1998).

Reactor de lecho de lodos granular expandido (EGSB, por sus siglas en inglés, Expanded Granular Sludge Bed). En él se lleva a cabo un tratamiento a altas velocidades ascensionales; está equipado con un sedimentador para recuperar la biomasa que haya salido del reactor con el efluente. Puede manejar cargas orgánicas mayores a 10 kg/m³·d y agua con 10,000 a 50,000 mg/L de DBO₅ (Kelly, 1998).

Filtro Anaerobio Percolado. Equipo en el que la biomasa se encuentra fija en un soporte para resistir las fuerzas ascensionales altas. Indicado para agua residual donde la materia orgánica en suspensión sea mínima y la mayor parte de la DBO₅ sea por materia disuelta (Massouda et al., 2009).

Reactor Anaerobio de Contacto. Es un reactor de baja tasa para la digestión orgánica, que requiere de alto tiempo de retención hidráulica (tiempo en que el agua residual permanece en depuración en una etapa definida). Indicado para la digestión de lodos provenientes de plantas aerobias o lodos primarios, así como para residuos disueltos (Massouda et al., 2009).

Opciones de Tratamiento Aerobio o Aeróbico:

Sistemas Lagunares. Son sistemas muy lentos de tratamiento de agua residual que imitan los procesos naturales: se construyen lagunas donde el agua residual pasa un largo tiempo durante el cual se irá depurando (retención hidráulica). En estos sistemas los

microorganismos presentes pueden ser aerobios, anaerobios y/o facultativos (que pueden sobrevivir con una limitada cantidad de O₂). La planta lagunal opera a bajo costo, requiere de grandes extensiones de terreno y tiene la desventaja de generar olores desagradables y de atraer insectos. Es recomendada en aguas con baja contaminación como las sanitarias municipales (Steinmann et al., 2003).

Humedales. Utilizan vegetación (plantas superiores, principalmente acuáticas) para el tratamiento del agua residual. Están basados en la acumulación de bacterias en el sustrato que mantienen las plantas y las raíces. Necesitan áreas muy grandes, tienen la ventaja de ser muy sencillas de operar (Steinmann et al., 2003).

Sistemas de lodos activados. Son los sistemas aerobios más utilizados. El agua pasa por un reactor en el que se está suministrando oxígeno mediante aireación, permitiendo la producción de una gran cantidad de bacterias que degradan la materia orgánica del agua. Estos sistemas llegan a niveles muy altos de depuración, requieren de altas cantidades de energía para suministrar el aire que necesitan las bacterias y generan una alta cantidad de lodos. Sirven para todo tipo de agua residual que contenga contaminantes orgánicos (Nia et al., 2009).

Reactores de lotes secuenciales (SBR, por sus siglas en inglés, Sequential batch reactors): Es una variante del proceso de lodos activados que ocupa varios tanques dispuestos en paralelo y conectados en serie, en los que se lleva a cabo el proceso. Todas las etapas del proceso, como aireación y sedimentación, se realizan en el mismo tanque. Este sistema permite un buen control del proceso, así como incorporar etapas anóxicas para lograr la nitrificación y desnitrificación en caso de que haga falta (Nia et al., 2009).

4. Tratamiento Terciario: es esta etapa se reducen o eliminan nutrientes como compuestos disueltos o iones de S, N y P, así como metales pesados por medio de procesos físicos, químicos y/o biológicos (Ramahlo, 1991).

En esta etapa se ocupan métodos avanzados, complementarios o alternativos para extraer materia orgánica suplementaria no eliminada anteriormente o para reducir nutrientes con N, P en forma de sus sales inorgánicas disueltas (NH₄⁺, NO₃⁻, NO₂⁻ y PO₄⁻³), por procesos de filtración, decantación o biológicos, estos últimos serán más ampliados en la sección 2.3 (Ramahlo, 1991).

5. Tratamiento Final: El objetivo principal de esta etapa es la desinfección y eliminación de patógenos a través de varios procesos, químicos o físicos (Davis & Cornwell, 1991).

El proceso de desinfección es un tratamiento final destinado a evitar problemas de salud debido a la existencia de bacterias y virus patógenos en el agua. Su aplicación está en función del grado de eficacia de los tratamientos anteriores, principalmente de los procesos biológicos de remediación de agua.

Algunos procesos para el tratamiento final son:

Utilización de sustancias para la desinfección del agua. Como el cloro (Cl₂), dióxido de cloro (ClO₂), hipoclorito (OCl⁻), ozono (O₃), halógenos, por ejemplo, bromo (Br₂) o yodo (I), cloruro de bromo (BrCl), metales como el cobre (Cu²⁺) o la plata (Ag⁺), permanganato potásico (KMnO₄), fenoles, alcoholes, jabones y detergentes, sales de amonio, peróxido de hidrógeno y distintos ácidos y bases en cantidades controladas y previamente bien calculadas.

Utilización de medios físicos para la desinfección del agua. Tales como la constante exposición a la luz ultravioleta (UV), radiación electrónica, rayos gamma, sonido, y calor.

2.3.2 PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL (PTAR) DE LA UAM-I

En la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-I), en 1989 fue construido un reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente (UASB) de 50 m³ (figura 5), para el tratamiento de una fracción de las aguas residuales generadas en la Unidad (Cervantes-Zepeda et al., 2011). El reactor se ubica en la Planta Piloto 9, este reactor es de tipo RAFA o UASB, tiene una capacidad de 30 litros (como mínimo de agua residual, sin contar la biomasa) y está tratando agua a una concentración aproximada de 700 mg de Demanda Química de Oxígeno (DQO) por litro (medida de la materia orgánica contaminante presente en las aguas residuales). Se le introducen 180 L de agua por día y está operando a 5 h de tiempo de retención (tiempos cortos en comparación con otros sistemas) con lo que se han obtenido eficiencias de remoción de materia orgánica del 40 % (ver tabla 1) (Salinas Gutiérrez, 2007).

Posteriormente se instalaron dos humedales artificiales de flujo combinado que sirven como postratamiento al agua residual proveniente del reactor UASB. En ellos se encuentran cultivos, distribuidos al azar, de tres especies de plantas, *Juncus effusus* L. (carrizo), *Cyperus papyrus* L. (papiro) y *Sparaxis bulbifera* L. (Iridaceae), las cuales pueden tener un valor agregado adicional como materia prima o como vegetación de ornato.

Figura 5. Planta de tratamiento de la UAM Iztapalapa: (1) cárcamo con rejilla, (2) desarenador, (3) reactor anaerobio de flujo ascendente o UASB, (4) humedales artificiales, (5) ozonizador, (6) cárcamo con agua residual tratada.

El agua residual de la UAM-I proviene básicamente de la cafetería, sanitarios y laboratorios. Dentro de la unidad hay cerca de 17,000 usuarios que generan aproximadamente 200 mil L/d. Una vez tratada el agua, si cumple las especificaciones de la NOM-003-ECOL-1997, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reusen en servicios al público, se utiliza para riego de áreas verdes del área deportiva de la UAM-I.

TABLA 1. Características del reactor UASB de la UAM Iztapalapa (2011).

PARÁMETRO	UNIDAD	REACTOR UASB	
Tiempo de retención hidráulica	h	5	
Productividad de CH ₄	L/LR·d*	0.016	
[DQO] total	mg ^{**} /L	320	
[DQO] soluble	mg ^{**} /L	70	
		INFLUENTE	EFLUENTE
[Sólidos suspendidos totales]	mg/L	60 ± 8.6	45 ± 8.7
[SO ₄ ⁻²]	mg/L	120	90
[NH ₄ ⁺]	mg/L	60	70
[PO ₄ ⁺³]	mg/L	18	20

*litro de metano por litro de reactor por día
 **miligramos de oxígeno (O₂)

2.4 CONTAMINANTES PRESENTES EN EL AGUA RESIDUAL DISPONIBLES PARA BIORREMEDIACIÓN

Las sustancias contaminantes presentes en el agua residual doméstica pueden estar en forma disuelta, de partículas decantables o en un estado físico intermedio determinado coloidal o en suspensión. En cualquier caso, la mayor parte de los compuestos presentes en un agua residual doméstica están constituidos por materia orgánica e inorgánica, nutrientes y microorganismos; una considerable parte de estos componentes se encuentra en forma particulada y, comúnmente, se valora mediante la concentración de materia en suspensión (Christensson, 2011).

En general, el agua residual doméstica contiene un 99.9 % de agua; la materia sólida está constituida en un 70 % por sustancias orgánicas como proteínas, grasas y carbohidratos; mientras que el 30 % restante es materia mineral insoluble (sustancias inorgánicas) como la arena, la arcilla y las gravas.

Las sustancias orgánicas de un agua residual doméstica están constituidas mayoritariamente por materia fecal, siendo la contribución diaria de DBO₅ (Droste, 1997). Además, también contienen hidratos de carbono (celulosa, almidón y azúcares), grasas y jabones (sales metálicas de los ácidos grasos), detergentes sintéticos, proteínas y sus productos de descomposición (urea, glicina y cisteína) así como hidróxido de amonio y sales amoniacales procedentes de la descomposición de complejos orgánicos nitrogenados (Rivas, 1978).

La cantidad de materia volátil ofrece una estimación del contenido de materia orgánica (MO) de un agua residual. Sin embargo, para obtener un valor de MO más preciso es necesario evaluarlo mediante la determinación de la cantidad del oxígeno requerido para oxidar completamente la materia orgánica a CO₂, H₂O y NH₃ (Ecuación 1) (Droste, 1997). Los microorganismos heterótrofos utilizan la materia orgánica presente en el agua residual como fuente de carbono para la síntesis celular.

Los compuestos inorgánicos que son capaces de representar una amenaza seria de contaminación son pocos y, además, es factible realizar ensayos sencillos para detectar aquéllos que resultan más difíciles de eliminar. El nitrógeno y el fósforo son los compuestos inorgánicos más importantes para el control de la calidad de las aguas residuales. La mayor parte del nitrógeno y del fósforo total de un agua residual doméstica se encuentra en su fracción soluble (nitratos, amonio, polifosfatos y

ortofosfatos); el nitrógeno de los efluentes de las PTAR proviene principalmente de las conversiones metabólicas de los compuestos derivados de los excrementos (urea y proteínas), mientras que el 50 % o más del fósforo procede de los detergentes sintéticos (Horan, 1993). El nitrógeno y el fósforo son los factores considerados típicamente como claves para el control de los problemas de eutrofización; en ciertas circunstancias, la eliminación del nitrógeno y del fósforo se puede considerar como limitante del crecimiento de algas (EPA, 1998).

2.4.1 CONTAMINANTES NITROGENADOS

El agua residual doméstica contiene nitrógeno orgánico, en forma de proteínas, ácidos nucleicos y urea, o bien en forma de nitrógeno amoniacal. Alrededor del 60 % del nitrógeno presente en un agua residual bruta está en forma orgánica y el resto en forma amoniacal. La tabla 2 indica diferentes compuestos de nitrógeno según su estado de oxidación.

La presencia de nitrógeno en el agua residual puede ser indeseable por varias razones: 1) el amoníaco libre es tóxico para los peces y muchos otros organismos acuáticos y 2) el nitrógeno amoniacal ejerce una demanda de oxígeno muy elevada (4.57 mg O₂/ mg N-NH₄⁺ oxidado) pudiendo agotar el oxígeno disuelto de la masa de agua (9 mg O₂/L a 20 °C). La toxicidad del amoníaco en solución es directamente atribuible a la especie NH₃, cuya concentración aumenta con el pH y la temperatura del agua (Horan, 1993).

TABLA 2. Formas del nitrógeno inorgánico, en agua residual doméstica, según su estado de oxidación (EPA, 1998).

Compuestos de nitrógeno	Fórmula	Estado de oxidación
Amoníaco	NH ₃	-3
Amonio	NH ₄ ⁺	-3
Nitrógeno gas	N ₂	0
Nitrito	NO ₂ ⁻	+3
Nitrato	NO ₃ ⁻	+5

La transformación de estos compuestos puede ocurrir por diferentes mecanismos: fijación, amonificación, aminación, nitrificación y desnitrificación (EPA, 1998). La fijación de nitrógeno (ecuación 1.1) consiste en la incorporación de nitrógeno gaseoso en un compuesto químico (NH₄⁺) que puede ser utilizado por plantas y animales.

El primer producto de la reacción de fijación es NH₃ (amoníaco), pero éste es rápidamente protonado, formándose NH₄⁺, lo cual es favorecido por el pK (9.25) de la reacción, de tal manera que el amonio es la especie predominante a los pH fisiológicos y el que toma parte en las reacciones de asimilación (Sprent & Sprent, 1990). En soluciones acuosas la relación NH₃/NH₄⁺ también depende del pH (figura 6).

Figura 6. Efecto del pH sobre la proporción entre amonio y amoníaco (Denmead et al., 1960).

La amonificación es el proceso de transformación del nitrógeno orgánico a formas amoniacales y ocurre normalmente durante la descomposición de tejidos animales y vegetales y de la materia fecal animal. El amoníaco en agua existe principalmente como el ion amonio (NH₄⁺) y como hidróxido de amonio (NH₄OH) (Ecuación 1.2). Este último es altamente tóxico para muchos organismos, especialmente para los peces.

Las proporciones de NH₄⁺ a NH₄OH en ambientes acuáticos son determinadas por el efecto que ejercen el pH y la temperatura sobre su razón de disociación. El efecto del pH sobre la disociación del amoníaco (NH₃) en agua está descrito en la tabla 3.

TABLA 3. Efecto del pH en la disociación del NH₃ en agua.

pH	[NH ₄ ⁺]	[NH ₄ OH]
6	3000	1
7	300	1
9	30	1
9.5	1	1

Aunque el NH₄⁺ constituye una buena fuente de nitrógeno para las plantas, muchas algas y macrófitas localizadas en ambientes eutróficos crecen mucho mejor a expensas de nitrato, aun cuando se requiere que el nitrato sea reducido posteriormente a amoníaco; esto se debe en gran medida a la toxicidad del NH₄OH producido a pH altos, como son los valores de pH que se observan durante periodos de alta actividad fotosintética en ambientes eutróficos.

La aminación es un proceso bioquímico que usa el amonio o el nitrato para formar proteínas vegetales y otros compuestos que contienen nitrógeno; los iones de nitrato penetran en las células de las plantas y microorganismos, donde son nuevamente reducidos a iones amonio y transformados en componentes que contienen carbono para producir aminoácidos y otros componentes orgánicos ricos en nitrógeno (ecuación 1.3).

La nitrificación es la oxidación biológica del nitrógeno amoniacal. Este proceso se realiza en dos etapas, en la primera el ion amonio se oxida a nitritos (ecuación 1.4) y luego éstos son oxidados a nitratos (ecuación 1.5). Las reacciones de transformación las realizan principalmente microorganismos autótrofos, que utilizan el carbono inorgánico como fuente de carbono celular; generalmente los dos géneros de bacterias autótrofas aerobias llamadas nitrificantes son nitrosomonas y nitrobacter.

Teniendo en cuenta los procesos de obtención de energía y de síntesis celular, la ecuación global de nitrificación se puede escribir como sigue (Randall et al., 1992):

Generalmente la producción de bacterias nitrificantes es muy pequeña en comparación con la de las bacterias heterótrofas (Ecuación 1).

El proceso de nitrificación es afectado por el pH. Se han reportado diferentes valores de pH óptimo para el proceso de nitrificación; no obstante, se observa una tendencia marcada en la cual, según disminuye el pH, la razón de nitrificación también disminuye (Shammas, 1986). Generalmente el pH óptimo para este proceso se encuentra entre 8 y 9. Los límites de tolerancia mínimo y máximo están entre 5.5 y 6.7 y entre 9.6 y 10.4, respectivamente (figura 7).

Figura 7. Efecto del pH sobre el proceso de nitrificación (Shamas, 1986).

La razón de nitrificación es afectada además por la temperatura (figura 8). La actividad máxima de nitrificación se registra a lo largo de un intervalo amplio de temperaturas, que por lo general se extiende de 15 a 35 °C. Cuando la temperatura desciende de los 15 °C, la razón de nitrificación cae abruptamente, reduciéndose a un 50 % cuando la temperatura baja a 12 °C.

Figura 8. Efecto de la temperatura sobre la actividad nitrificante (Shamas, 1986).

La desnitrificación es un proceso de reducción biológica del nitrato a nitrógeno gas. Durante el proceso de reducción, el nitrato se transforma inicialmente en nitrito y éste en óxido nítrico, óxido nitroso y finalmente en nitrógeno gas que se libera a la atmósfera (ecuaciones 1.7 y 1.8). Los organismos responsables de esta reacción son principalmente heterótrofos aerobios facultativos, que pueden adaptarse a las condiciones del medio en que se encuentran. En condiciones anóxicas estas bacterias son capaces de utilizar los nitratos y los nitritos como aceptores de electrones en lugar del oxígeno disuelto (EPA, 1993).

Los nitritos y los nitratos actúan como aceptores de electrones, mientras que el sustrato es el carbono contenido en la materia orgánica. La ecuación 1.8 muestra la reacción global de oxidación y de síntesis del proceso, utilizando una fuente orgánica genérica (simbolizada por C).

Finalmente, el nitrógeno es aceptado en las vías metabólicas de las microalgas en forma de amonio, mientras que la asimilación de nitrato requiere de la transformación de nitrato a nitrito y luego a amonio mediante cuatro pasos de reducción que requieren energía, resultando más favorable para las microalgas usar el amonio cuando éste está disponible.

Un aspecto ampliamente debatido en la actualidad es la regulación del complejo NADH-nitrato reductasa (enzima producida por *Chlorella*). Syrett & Morris (1963) han demostrado que la asimilación de nitrato por *Chlorella vulgaris* es inhibida por la presencia de amonio y que esta inhibición se revierte tan pronto como el amonio se asimila. No pudieron sacar alguna conclusión específica acerca del mecanismo de este proceso, pero sí observaron que el amonio inhibía la primera etapa de la asimilación del nitrato, es decir, la reducción del nitrato a nitrito. En cambio, en plantas superiores, Schrader y Haheman (1967) encontraron que el amonio no era inhibidor efectivo de la actividad o síntesis de la enzima nitrato reductasa. Aunque se ha defendido repetidamente que el nitrato es el inductor nutricional del nitrato reductasa de algas.

2.4.2 CONTAMINANTES FOSFORADOS

La incorporación de fósforo en aguas residuales domésticas ha aumentado de forma notable en los últimos tiempos como consecuencia de su uso en abonos agrícolas y en detergentes y otros productos de uso doméstico (fertilizantes, pesticidas y repelentes). El fósforo es esencial para la vida, siendo imprescindible para la síntesis de los ácidos nucleicos y de los fosfolípidos; una baja concentración de fósforo en el medio limitará el crecimiento biológico e impedirá la eliminación de la materia orgánica (Grady & Lim, 1980).

El fósforo presente en las aguas residuales domésticas proviene principalmente de la materia fecal humana (50-65 %), de los vertidos de residuos alimenticios y de los compuestos de fosfato inorgánico contenidos en los detergentes y los productos de limpieza (30-50 %). Su concentración típica es del orden de 10-30 mg P/L. El fósforo se puede encontrar en tres formas distintas: fósforo orgánico (especies particuladas), ortofosfatos y polifosfatos (especies disueltas).

Con objeto de no tener en cuenta la dilución más o menos elevada de las aguas residuales, es conveniente relacionar la concentración de fósforo con la de la DBO₅. Un examen de diversos estudios manifiesta que la relación P/DBO₅ varía del 3.2 % al 6.6 %, en el caso de aguas residuales domésticas (Shire & Kustka, 2015; Mueller et al., 1996). La absorción celular del fósforo por los microorganismos se da en solución acuosa generalmente como iones ortofosfatos: HPO_4^{2-} o H_2PO_4^- .¹ Para el caso del sistema de PO_4^{3-} , el conjunto de equilibrios de disociación ácida está descrito por las ecuaciones 2 a 2.2:

La forma en la cual el fósforo es absorbido por los microorganismos es afectada por el pH (figura 9), es decir, en un pH más alto predomina la forma H_2PO_4^- en un pH más bajo no se encuentra en el medio acuoso. Cuando las fracciones molares de las especies predominantes se igualan, las concentraciones de las especies de cada par, $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$, $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ y $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$, son iguales. Se observa también que todas las especies de PO_4^{3-} predominan en un cierto intervalo de pH.

Figura 9. Efecto del pH sobre la fracción molar de fósforo total (Saha, 1996).

El fósforo en forma de ortofosfatos (PO_4^{3-}) es un factor limitante del crecimiento de muchos de los microorganismos presentes en los tratamientos secundarios de las PTAR, especialmente en sistemas de fangos activados, los microorganismos lo incorporan en su tejido celular en forma de compuestos orgánicos fosfatados. La biomasa contiene entre 1.5 y 2.0 % de fósforo (referido a materia seca). Sin embargo, existen ciertos microorganismos capaces de asimilar fósforo en proporciones superiores a las correspondientes a los requisitos nutritivos normales bajo condiciones aerobias, almacenándolo en forma de gránulos de polifosfatos denominados volutina, es decir, gránulos de polifosfatos de aspecto cristalino presentes en el protoplasto (organelo celular) de las

Cyanobacterias (Shire & Kustka, 2015; Mueller et al, 1996). Las primeras observaciones del fenómeno se registraron en el año 1955, pero no fue hasta finales de 1965 cuando se confirmó que el fenómeno es de tipo biológico, puesto que alrededor del 80 % de la eliminación de fósforo se produjo sin adición de sustancias químicas. Este fenómeno fue denominado inicialmente como Luxury Uptake (absorción lujosa) por Levin y Shapiro en 1965 (Shire & Kustka, 2015). Es posible optimizar tanto la Luxury Uptake como la concentración de biomasa, esto quedó demostrado para microalgas (*Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp.) por Powel et al. (2011) observaron que (1) el fósforo acumulado se consume durante la etapa exponencial del crecimiento de la biomasa, (2) que los efectos de la temperatura, de la intensidad luminosa y de la capacidad de control de estas variables son importantes para mejorar la eliminación biológica del fósforo, de tal forma que: (3) el fósforo se acumuló en la biomasa a temperatura más cálida (25 ° C), (4) que aunque la Luxury Uptake no se ha identificado como un mecanismo significativo de eliminación de fósforo, los polifosfatos se lograron acumular en la biomasa en mayor medida a 3000 lux, (5) sin embargo, para conseguir una eliminación eficaz del fósforo biológico se necesita de una alta concentración de microalgas.

2.4.3 TIPOS DE BIORREMEDIACIÓN

Cuando se aprovecha el metabolismo de los microorganismos para eliminar contaminantes, se denomina biorremediación a este proceso (Bouwer & Zehnder, 1993). La biorremediación puede producirse por sí sola (atenuación natural o biorremediación intrínseca) o puede estimularse mediante la adición de fertilizantes para aumentar la biodisponibilidad dentro del medio (bioestimulación); los microorganismos utilizados para realizar la función de la biorremediación son conocidos como biorremediadores (Mueller et al., 1996). Se puede clasificar como *in situ* (cuando se aplica en el sitio contaminado) o *ex situ* (cuando se realiza transportando el medio contaminado, agua o suelo, fuera del sitio de origen).

Para que la biorremediación sea efectiva, los microorganismos deben atacar enzimáticamente los contaminantes y convertirlos en productos inocuos (Vidali, 2001). Como la biorremediación sólo puede ser efectiva cuando las condiciones ambientales permiten el crecimiento y la actividad microbiana, su aplicación a menudo implica la manipulación de parámetros ambientales para permitir que el crecimiento microbiano y la degradación progresen a un ritmo más rápido, se llevan a cabo en recipientes aislado del medio externo (reactores). Así, los procesos biológicos que ocurren

en la mayoría de los reactores, en condiciones determinadas y controladas, tienen lugar de manera natural en ríos, lagos y otros sistemas acuáticos (Eilbeck & Mattock, 1987; Ramahlo, 1991).

Algunos ejemplos de técnicas utilizadas son: el bioprocesamiento y la bioadsorción (Bouwer & Zehnder, 1993). En el primer caso, el objetivo se basa en el empleo de cepas de microorganismos muy especializados para tratar agentes concretos, como bien podrían ser compuestos fosforados, nitrogenados y sulfurados por medio de bacterias aerobias, bacterias anaerobias y microalgas (Vidali, 2001). Por otra parte, la bioadsorción puede llegar a reemplazar métodos fisicoquímicos como la precipitación, adsorción o el intercambio iónico en el proceso de captar iones de metales pesados, donde las plantas acuáticas (fitorremediación) y las microalgas (ficorremediación), por ejemplo, constituyen una importante fuente para la bioadsorción de metales pesados en forma iónica (Mueller et al., 1996).

2.5 FICORREMEDIACIÓN

La ficorremediación es el proceso de emplear microalgas para la mejora de la calidad del agua. Las microalgas pueden fijar el dióxido de carbono mediante la fotosíntesis y eliminar el exceso de nutrientes de manera efectiva a un mínimo costo. Además, el oxígeno producido fotosintéticamente puede disminuir la demanda biológica de oxígeno (DBO) en el agua residual.

Las microalgas son importantes en procesos de remediación para una amplia gama de desechos tóxicos, ya que, utilizan los residuos como fuentes de nutrición y degradan enzimáticamente los contaminantes como el nitrógeno y el fósforo. Se sabe que los xenobióticos y metales pesados pueden ser desintoxicados, transformados o volatilizados por el metabolismo de las microalgas (Singh et al., 2011).

Las microalgas son organismos unicelulares, eucariontes, autótrofos y coloniales; capaces de realizar fotosíntesis incluso en condiciones de efecto invernadero extremas (Salazar González, 2005). Existen aproximadamente entre 8 y 12 géneros, que se encuentran en las aguas residuales (Salazar González, 2009), tales como:

- *Euglena* sp.
- *Scenedesmus* sp.
- *Ankistrodesmus* sp.
- *Chlamydomonas* sp.
- *Chlorella* sp.
- *Closterium* sp.
- *Anabaena* sp.
- *Spirulina* sp.
- *Phormidium* sp.
- *Isochrysis* sp.
- *Dunaliella* sp.
- Algunas diatomeas.

En las aguas residuales las microalgas:

- a) Eliminan nutrientes inorgánicos (N y P): Desde los años 90's se sabe que las microalgas son eficientes en la remoción de nitrógeno y fósforo en aguas residuales, debido a que son nutrientes esenciales en la formación de biomasa (Tam & Wong, 1989; Gantar et al., 1991; Caziñares et al., 1994; Lau et al., 1995; González et al., 1997). En un estudio de Su et al. (2012) se comparó la capacidad de remoción de cuatro especies diferentes de microalgas a las mismas condiciones, encontraron que entre las dos mejores están: *Chlamydomonas reinhardtii* que removió 4.9 mg de NT/L·d y 0.30 mg de PT/L·d (figura 10); seguida de *Chlorella vulgaris* con 3.3 mg de NT/L·d y 0.20 mg de PT/L·d; demostraron así que el tipo de especie influye en gran medida (Dinesh et al., 2015; Choi & Lee, 2012).

Figura 10. Remoción de nitrógeno total (NT) y fósforo total (PT), en miligramos por litro de agua residual doméstica por día, obtenidos de Choi & Lee, 2012 (1); Dinesh et al., 2015 (2); Su et al., 2012 (3); Su et al., 2012' (4).

- b) Eliminan metales pesados: Las microalgas han sido utilizadas con fines analíticos para recuperar cuantitativamente los iones metálicos a partir de muestras de agua natural y determinar el nivel de contaminación por metales pesados (Wilde & Benemann, 1993; Metha & Gaur, 2005). Las microalgas pueden capturar iones de metales pesados (Cd, Zn, Cu, Ag, Pb, Hg, Ni y Cr) por los mismos mecanismos de adsorción y de absorción que una biomasa bacteriana, así como por la formación de fitoquelatinas que sintetizan en respuesta al estrés por metales pesados tóxicos (Cetinkaya et al., 1999; Gekeler, et al., 1988; Davis et al., 2003; Romera et al., 2007).
- c) Reducen la cantidad de materia orgánica: las microalgas son eficientes en la disminución de DBO Y DQO presente en el agua residual (Li et al., 2011; Abdel-Raouf et al., 2012) proveyendo además de oxígeno a las bacterias aeróbicas que ayudan a la biotransformación (Abdel-Raouf et al., 2012). Los valores de reducción de la DBO y DQO son variables (y dependen de las condiciones de cultivo): 84 % de DBO con un cultivo mixto de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. (Hammouda et al., 1995), 81 % de DQO con *Chlorella* sp. y 91.7 % de DQO con *Scenedesmus* sp. (Hammouda et al., 1995), 92 % de DQO con *Chlorella* sp. y *Nitzschia* sp. (Hernández Pérez & Labe, 2014). Por último, Li et al. (2011) registraron valores de reducción de DQO de 90.3 y 90.8 % en sus experimentos con *Chlorella* sp., concluyendo que las microalgas utilizaban rápidamente diferentes compuestos orgánicos como fuente de carbono, además del CO₂.
- d) Capturan CO₂ del medio gaseoso con el que el medio líquido esté en contacto: Las algas pueden sintetizar oxígeno a partir de dióxido de carbono mediante la fotosíntesis y eliminar el exceso de nutrientes de manera efectiva a un costo mínimo; además, el oxígeno producido fotosintéticamente puede mitigar la demanda biológica de oxígeno (DBO) en el agua residual (Amin, 2009; Dominic et al., 2009). Se necesita más investigación para análisis de la capacidad de captura de CO₂ de las microalgas para obtener el máximo rendimiento de gas (Sialve et al., 2009; Rosch et al., 2009).
- e) Tienen una acción bactericida: los factores ambientales que son favorables para el crecimiento de las microalgas son desfavorables para la supervivencia de coliformes por lo que limitan la supervivencia de estos patógenos (Abdel-Raouf et al., 2012; Hernández-Pérez & Labé, 2014). En algunos casos, como con la especie *Scenedesmus* sp., se debe

principalmente al pH; los valores de pH altos que mantienen los cultivos densos de microalgas reducen el número de coliformes y enterobacterias (Voltolina et al., 1998; Hernández-Pérez & Labé, 2014).

2.5.1 CURVA DE CRECIMIENTO TÍPICA DE LAS MICROALGAS

Las microalgas se reproducen principalmente por división celular, que es binaria en la mayoría de los casos, por lo cual presentan un crecimiento relativamente rápido cuando se inoculan en un medio de cultivo no limitante y se mantienen en condiciones adecuadas. En general, las condiciones del medio cambian con la edad del cultivo, lo que afecta también la velocidad de crecimiento poblacional. Existen diferentes fases de crecimiento poblacional de las microalgas en sistemas cerrados (figura 11): 1) fase de adaptación, 2) fase de aceleración, 3) fase exponencial, 4) fase de desaceleración, 5) fase estacionaria, 6) fase de muerte, que sirven para describir la forma en la cual cambia la densidad celular o de biomasa (Arredondo-Vega & Voltolina, 2007).

Figura 11. Curva de crecimiento típica de una cepa de microalga, densidad celular (concentración de células o biomasa) con respecto al tiempo.

1. *Fase lag* o de adaptación: el comportamiento inicial depende de las condiciones de las células del inóculo, de las cuales depende también el éxito del nuevo cultivo. Cuando las células del inóculo no se encuentran en condiciones metabólicas adecuadas se presenta una fase de retardo del crecimiento, por lo cual el cultivo no será exitoso. Los cambios de las

condiciones de cultivo como temperatura, iluminación y pH también pueden causar un retardo del crecimiento en la fase inicial de un cultivo.

2. *Fase de aceleración*: diferentes componentes estructurales se incrementan secuencialmente, iniciando con el RNA (por sus iniciales en inglés, ácido ribonucleico), seguido de las proteínas y del peso individual. La densidad celular es generalmente la última que muestra este incremento, la temperatura es crucial en esta fase (Borowitzka, 2016).
3. *Fase exponencial*: durante este periodo la velocidad de crecimiento de número de células adquiere su valor máximo y, en vista de la falta de factores limitantes, permanece aproximadamente constante. Por este motivo, la densidad celular aumenta rápidamente, aunque en general no se alcanzan valores muy elevados.
4. *Fase de desaceleración*: en esta fase se empieza a notar el efecto de una menor disponibilidad de uno de los factores que regulan el crecimiento, por lo cual las condiciones de cultivo son sub-óptimas. En consecuencia, la tasa de división celular disminuye, aunque en vista del alto número de células, la densidad celular alcanza su máximo valor. En este periodo la composición bioquímica de la biomasa cambia de manera opuesta a la mencionada para la fase de aceleración.
5. *Fase estacionaria*: las condiciones de cultivo son limitantes y la natalidad es igual a la mortalidad, por lo cual la densidad celular y los componentes de la biomasa permanecen sin cambios relevantes. Este comportamiento se debe a la baja concentración de algún nutriente esencial o al alto valor del pH, con consiguiente poca disponibilidad de sustrato fotosintético, o a una excesiva concentración de oxígeno, aunque con frecuencia el motivo más importante es la pobre penetración de la luz causada por la alta densidad celular (efecto de autosombreado). Otro factor que puede limitar el crecimiento es la excreción de productos catabólicos al medio de cultivo.
6. *Fase de muerte*: la tasa de mortalidad es superior a la de natalidad, por lo cual la densidad celular disminuye. Además, se registra una disminución de la biomasa unitaria como resultado de un incremento en la proporción entre respiración y fotosíntesis y a la ausencia de nutrientes, que conlleva a la muerte o lisis celular.

De esta forma el crecimiento de las microalgas depende de las condiciones de cultivo (Barghbani et al., 2012; Grobbelaar, 1991).

2.5.2 CONDICIONES DE CULTIVO

Las microalgas necesitan ciertas condiciones que hacen posible su subsistencia, crecimiento, desarrollo y reproducción. El cultivo intensivo controlado de microalgas requiere entornos de esterilidad, de lo contrario existe el peligro de que proliferen otros organismos no deseados, como ciliados, flagelados, hongos y bacterias. Entre las condiciones y recursos que hacen factibles los cultivos microalgales están: la energía solar tanto en forma de luz como de calor, el dióxido de carbono, macro y micronutrientes, además de un pH definido.

2.5.2.1 LUZ

La luz es el parámetro más importante para las microalgas (Barghbani et al., 2012; Grobbelaar, 1991). En el cultivo de microalgas, la luz promueve la producción de clorofila y otros metabolitos en la fotosíntesis (Barghbani et al., 2012); las microalgas utilizan sólo la luz en el intervalo de longitud de onda entre 300 y 700 nm, el cual comprende la región del espectro conocida como radiación fotosintéticamente activa de 400 a 700 nm (Johnson & Schmidt-Dannert, 2008).

Cuando algunas microalgas son expuestas a cierto nivel elevado de radiación, los componentes celulares internos sufren daño, debido al exceso de energía; este nivel de irradiancia se conoce como punto de saturación lumínica, por encima de él la velocidad de fotosíntesis se reduce. Este fenómeno se conoce como fotoinhibición (Drapcho et al., 2008). El intervalo de tolerancia de iluminación varía según la especie (ver tabla 4).

Autores como Barghbani et al. (2012) han observado que el color de la luz con el que son iluminadas las microalgas tiene un efecto significativo en la producción de microalgas siendo la luz amarilla seguida de la roja y azul para *Chlorella vulgaris*. Por otro lado, Ruiz Dávila et al. (2015) encontraron que con luz azul *Chlorella vulgaris* tiene un mayor crecimiento (50 %) que con la luz blanca y roja (crecimiento celular de 1.2 cel/mL·d) y una mayor concentración de lípidos totales 325 mg/L para la luz azul, 320 mg/L para la luz roja y 97 mg/L con luz blanca. Actualmente los resultados de las investigaciones difieren mucho al respecto.

TABLA 4. Mínima y máxima iluminación, frecuencia de luz y fotoperiodo de distintas especies de microalgas.

Especie de microalga	Intensidad de luz (lux)		Frecuencia de la luz (Hz)	Fotoperiodo luz: oscuridad (h)	Referencia
	Mínima	Máxima			
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	10	188	0.1-10	04:20 - 01:23	Yoshimoto et al., 2005
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	100	240	0.01	03:21	Janssen et al., 1999
<i>Chlorella</i> sp.	0	750	0.3-0.0074	12:12	Grobbelaar, 1991
<i>Chlorella kessleri</i>	280	280	1-37 x 10 ³	12:12 - 01:23	Park and Lee, 2000
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	80	168	2.5-25 x 10 ³	02:22	Matthijs et al., 1996
<i>Chlorella sorokiniana</i>	240	630	0.025	18:06	Janssen et al., 1999
<i>Chlorella vulgaris</i>	0	2650	ND	16:08	Ji et al., 2013
<i>Chlorella protothecoides</i>	ND	3200	ND	12:12	UTEX, 2016
<i>Haematococcus pluvialis</i>	2	12	25-200	12:12	Katsuda et al., 2006
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	22	700	0.5-1	02:22	Laws et al., 1983
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	230	2800	1-1.55	12:12	Molina Grima et al., 2000
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>		68	0.01-10	12:12	Walsh and Legendre, 1988
<i>Scenedesmus</i> sp.	0	750	0.8-0.0038	12:12	Grobbelaar, 1991

2.5.2.2 TEMPERATURA

La temperatura afecta las etapas del ciclo celular de las microalgas, un incremento de hasta 10 °C degrada proteínas e inhibe la replicación del ADN (Morimura, 1959). Los cambios de temperatura, de manera similar a la intensidad de luz, afectan a la tasa de crecimiento; el ciclo celular se acorta con el aumento de temperatura. Sin embargo, la temperatura afecta a todos los procesos en la célula, no sólo el crecimiento, como es el caso de la intensidad de la luz (Borowitzka, 2016). La producción de biomasa aumenta de manera directamente proporcional hasta que se alcanza la temperatura óptima de cada especie (ver tabla 5), en general está entre 28 y 35 °C (Park et al., 2011); las microalgas que crecen por debajo de la temperatura óptima son más sensibles a la fotoinhibición, que aquellas que se mantienen en su valor óptimo (Suh & Lee, 2003). Por debajo de los 20 °C las etapas del ciclo celular se vuelven muy lentas (Borowitzka, 2016).

TABLA 5. Temperatura óptima y cantidad de biomasa obtenida (g/L·d) a esa temperatura, de distintas especies de microalgas.

Especie de microalga	Ciclo celular (h)	Diámetro de la célula (µm)	Temperatura óptima (°C)	Productividad de biomasa (g / L · d)	Referencia
<i>Chlorella</i> sp.	7.7*	5*	30	0.06	Cho et al., 2013.
<i>Chlorella vulgaris</i>			20	0.04-0.195	Cabanelas et al., 2013.
<i>Chlorella vulgaris</i>			25	0.8	García Cubero, 2014.
<i>Chlorella vulgaris</i>			27	0.04	Ji et al., 2013.
<i>Chlorella protothecoides</i>			28	0.104	O'Grady & Morgan, 2010
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>			25-27	0.018	Wang et al., 2012.
<i>Chlorella sorokiniana</i>			30	0.055-0.083	Lizzul et al., 2014.
<i>Chlamydomonas mexicana</i>	12	10	27	0.028	Abou-Shanab et al., 2013.
<i>Desmodemus</i> sp.	ND	12	25	0.138-0.227	Samori et al., 2013.
<i>Kirchneriella</i> sp.	ND	7	20	0.042	Frampton et al., 2013.
<i>Scenedesmus obliquus</i>	4	8	30	0.1	Mata et al., 2012.
*Para <i>Chlorella</i> sp.					

2.5.2.3 OXÍGENO DISUELTO (OD)

La intensa fotosíntesis en los sistemas de cultivo puede aumentar los niveles de oxígeno disuelto; una elevada saturación, mayor a 200 % al final del cultivo puede afectar la productividad de biomasa microalgal (Hernández-Pérez & Labé, 2014; Su et al., 2012). Por ejemplo, *Chlorella vulgaris* tuvo una productividad de biomasa de 6.28 ± 0.8 g/L·d con 18 mg/L de OD (ver tabla 6) mientras que para *Chlamydomonas reinhardtii* fue menor (6.06 ± 1.2 g/L·d) con menor OD al final del cultivo (Su et al., 2012).

TABLA 6. Cantidad de oxígeno disuelto inicial y final en un determinado tiempo de cultivo y productividad de biomasa para cuatro diferentes especies.

Especie de microalga	Oxígeno Disuelto (mg/L)		Tiempo de cultivo (días)	Productividad de biomasa (g/L·d)	Referencia
	Inicio del cultivo	Final del cultivo			
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	6	16	6	6.06 ± 1.2	Su et al., 2012
<i>Chlorella vulgaris</i>	6	18	4	6.28 ± 0.8	
<i>Scenedesmus rubescens</i>	6	18	4	6.56 ± 0.8	
<i>Phormidium</i> sp.	6	16	6	2.41 ± 0.7	

2.5.2.4 DIÓXIDO DE CARBONO (CO₂)

El 50 % de la biomasa microalgal en peso seco es carbono (C); el dióxido de carbono es un factor importante para la fotosíntesis, las células de las microalgas absorben el CO₂ del aire, que es de 365 ppm (Baird, 2013), para su crecimiento (fijación de CO₂) y convertir la energía de la luz solar en energía química usando la siguiente reacción:

En el crecimiento de las microalgas, la biomasa máxima producida depende de la concentración de dióxido de carbono específica, de tal manera que un aumento de la concentración de CO₂ en algunas especies de microalgas incrementa la cantidad de biomasa (Singh & Singh, 2014). Se ha observado que la concentración de CO₂ más alta es fijada por *Spirulina platensis*, *Botryococcus braunii*, y *Chlorella vulgaris* en orden decreciente (ver tabla 7) (Bittencourt Sydney et al., 2010). Según otros autores *Chlorella vulgaris* presenta una mayor fijación de CO₂ en comparación con otras especies, figura 12 (García Cubero, 2014; Ho et al., 2011).

TABLA 7. Especies de microalgas, su velocidad o fijación diaria de CO₂ y el crecimiento o productividad de biomasa (% o g/L·d).

Especie	Concentración de CO ₂	Tasa de aireación	Velocidad de fijación de CO ₂	Fijación diaria de CO ₂	Crecimiento de biomasa	Productividad de biomasa	Referencias
	(% v/v)	(vvm)	(g/L·día)	(%)	(%)	(g/L·día)	
<i>Botryococcus braunii</i>	5	~1.8	0.496		87.96	3	Bittencourt Sydney et al., 2010
<i>Spirulina platensis</i>			0.318		80.4	2.25	
<i>Dunaliella tertiolecta</i>			0.272		70.42	2	
<i>Chlorella vulgaris</i>			0.251		86.68	2.2	
<i>Chlorella vulgaris</i>	1	1	1.2			6.6	García Cubero, 2014
<i>Chlorella</i> sp.			0.6			2.6	
<i>Scenedesmus vacuolatus</i>			0.8			8.3	
<i>Spirulina</i> PCC 6313			0.7			2.9	
<i>Chlorella kessleri</i>	0.38	0.3		97		1	Greque de Morais & Vieira Costa, 2007
<i>Chlorella vulgaris</i>				34.3		1.5	
<i>Scenedesmus obliqua</i>				54.7		1.6	
<i>Spirulina</i> sp.				74		3.8

Figura 12. Capacidad de captura de CO₂ de diferentes especies de microalgas (Ho et al., 2011).

La presencia del dióxido de carbono en una solución acuosa o medio de cultivo tiene un efecto en el pH (figura 13), se puede observar que a un pH < 6, CO₂ en fase gas y el ácido carbónico (H₂CO₃) en la fase acuosa son las especies dominantes. A valores de pH entre 7 y 9, predomina el ion bicarbonato (HCO₃⁻), mientras que el carbonato (CO₃²⁻) comienza a aumentar su concentración significativamente a valores de pH > 9. Esto es importante ya que las microalgas son capaces de asimilar el carbono por tres vías inorgánicas diferentes (Klinthong et al., 2015): (1) asimilación directa de dióxido de carbono a través de la membrana plasmática; (2) el uso de bicarbonato induciendo la enzima anhidrasa carbónica, que convierte HCO₃⁻ en CO₂ (de forma extracelular, en el medio); y (3) el transporte directo de bicarbonato a través de la membrana plasmática.

Sin embargo, al aumentar la concentración de CO₂ en un medio, aunque sea mayor la productividad de biomasa, el medio tiende a disminuir el pH, lo que reduce de igual forma la actividad de la enzima anhidrasa carbónica extracelular (pH < 6), y este efecto a su vez inhibe el crecimiento celular (Singh et al., 2015).

No todas las microalgas tienen la capacidad de utilizar las tres rutas de asimilación inorgánica de C, la tolerancia a la concentración de CO₂ suele ser distinta según la cepa. Según Singh et al. (2015) *Chlorella vulgaris* obtuvo una productividad de biomasa de 0.25 g/L·d, *Scenedesmus obliquus* 0.29 g/L·d, ambas con un suministro de 10% de CO₂ cuando la tolerancia de los géneros: *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. es de hasta del 40 % y 80 % respectivamente (Salih, 2011).

Figura 13. Efecto del CO₂ en el pH de una solución acuosa a 25°C (Allende, 1976).

2.5.2.5 POTENCIAL DE HIDRÓGENO (pH)

Cada especie de microalga necesita un medio con un determinado pH que permita un crecimiento óptimo (ver tabla 8). Ya que influye en todas las reacciones enzimáticas que se realizan a nivel intra y extra celular (Borowitzka, 2016). El pH del medio de cultivo depende de diferentes variables, en un sistema controlado, principalmente por:

- a) La productividad microalgal
- b) La eficiencia del sistema de distribución de CO₂ en el medio de cultivo
- c) La alcalinidad que es influenciada por la composición iónica del medio de cultivo

Por encima o debajo del pH óptimo desciende la productividad de biomasa (Marchello et al., 2015; Park et al, 2011).

TABLA 8. Especies de microalgas, su pH óptimo y biomasa producida (g/L·d); diferencia de pH respecto al tiempo para *Chlorella* sp.

Especie	pH óptimo		Productividad de biomasa (g/L·d)	Referencia
<i>Chlorella</i> sp.	7		0.6	Cho et al., 2013
<i>Chlorella</i> sp.	7.2		0.04-0.07	Cho et al., 2011
<i>Chlorella vulgaris</i>	7.2		0.05	Sidney et al., 2011
<i>Botryococcus braunii</i>	7.2		0.03	
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	8		0.018	Wang et al., 2012
Especie	pH		Biomasa (g/L·día)	Referencia
	Inicio	final		
<i>Chlorella vulgaris</i>	9.5	7.0	0.60	Marchello et al., 2015
<i>Chlorella protothecoides</i>	7	12	0.75	Gris et al., 2014.

2.5.2.6 NUTRIENTES

Las microalgas pueden ser autótrofas, de manera que crecen sintetizando sus materiales a partir de sustancias inorgánicas sencillas mediante fotosíntesis, o heterótrofas, caso en que su fuente de carbono es orgánica (si bien otros elementos distintos del C pueden ser captados en forma inorgánica, como se mencionó en la sección 2.4.2.4). En cualquier caso, para la síntesis de biomasa requieren captar una serie de elementos químicos, que se pueden clasificar según las cantidades en que son requeridos como macronutrientes (C, H, O, N, P, S, K, Mg) y micronutrientes (Co, Cu, Zn, Mo, Fe, Mn). Estos elementos se suministran en forma de sales como parte del medio de cultivo.

Existen dos tipos generales de medios de cultivo (Stein, 1973; Hernández-Pérez & Labé, 2014): los medios químicamente definidos (ver tabla 9), de los que se conoce su composición química, son de gran utilidad en los cultivos y experimentos de fisiología celular, ya que en este tipo de medios se conoce con certeza todos sus constituyentes, así como la concentración en que están presentes. Otros son los medios enriquecidos como el agua residual y los abonos, son muy baratos, pero tienen la desventaja de no ser específicos, pues soportan el desarrollo de diferentes tipos de microalgas, además su alto contenido de materia orgánica facilita el desarrollo de poblaciones bacterianas (Stein, 1973). El inconveniente de los medios definidos es su alto costo en cultivos a gran escala. Por

lo general para el cultivo de *Chlorella* sp. (Clorofita) se utilizan medio definidos por ser los más completo y eficientes, aunque también se han empleado bioabonos de borrego y vaca (Stein, 1973).

TABLA 9. Algunos medios de cultivo definidos que se utilizan para microalgas.

MEDIOS	MICROALGAS
Beijerinck	C
Bold Basal	C, CR, CY, R
Bozniak Community	C, CR, CY, R
Chu No. 10	C, CR, CY, BA
Rodhe 8	C, CR, CY, BA
Volvox	C
Warris	C
Woods Hoole MBL	C, CR, CY, BA
Omarov	C
Bogdanov	C
BG11	C, CY
Bristol 3N	C

C: clorofita, CR: crisofita, CY: cianofita, R: rodofita, BA: Bacilariofita

Las microalgas tienen una tasa de crecimiento rápido y responden a cada conjunto de condiciones de crecimiento modificando el rendimiento de un componente específico (Hernández-Pérez & Labé, 2014). Particularmente, *Chlorella vulgaris* es ideal para la producción de biomasa, ya que es resistente a las condiciones adversas y a la competencia con otros microorganismos (Brennan et al., 2010). Los contenidos de lípidos y almidón aumentan y la productividad de la biomasa cesa o disminuye durante condiciones de crecimiento desfavorables como la limitación de nitrógeno y fósforo, alta concentración de CO₂, exposición excesiva a la luz (Converti et al., 2009; Ly et al., 2010; Pribyl et al., 2012; Widjaja et al., 2009), exceso de hierro en el medio (Liu et al., 2008) o el aumento de la temperatura (Richmond et al., 1993; Borowitzka, 2016). Por otro lado, el contenido de proteínas aumenta durante condiciones de crecimiento normales y controladas (mayor contenido de nitrógeno); por lo tanto, se han probado muchas estrategias para promover una mayor productividad de la biomasa, el contenido de lípidos, proteínas, hidratos de carbono y pigmentos (Safi et al., 2014).

En busca de aumentar la sustentabilidad del cultivo de microalgas, se han desarrollado estudios sobre el efecto de la composición de medios basados en fertilizantes comerciales en la productividad de biomasa o en la cinética de crecimiento (Zaleha et al., 2014; Brito et al., 2015; Silva-Benavides, 2016), ya que los fertilizantes comerciales resultan menos costosos que las materias primas de medios convencionales para conservación.

En este contexto, se ha observado un crecimiento celular de hasta $\sim 6.35 \times 10^3$ cél/mL con el fertilizante comercial Poliverdol® (NPK: 8-8-6) y $\sim 4.14 \times 10^3$ cél/mL con Nitrofoska® (NPK: 12-12-7) ambos experimentos en 6 días de cultivo (mixto de *Chlorella vulgaris* y *Hyaloraphidium contortum*), el resultado obtenido con Poliverdol® es similar al obtenido en el medio de cultivo convencional Guillard (NP: 10-1): $\sim 6.4 \times 10^3$ cél/mL (Brito et al., 2015). Zaleha et al. (2014) evaluaron la producción *Chlorella vulgaris* con medios de cultivo basados en fertilizantes comerciales de bajo costo en reactores con capacidad de 1 L; utilizaron Urea como fuente de N, fertilizante P+® como fuente de fósforo y fertilizante Potash® como fuente de K en distintas proporciones y encontraron que la mejor fue: NPK 12-6-4 con una densidad celular de 4×10^6 cél/mL a los 5 días de cultivo. Es importante encontrar el efecto que tienen los medios basados en fertilizantes, en el contenido de metabolitos de las cepas para mejorar no solo la producción de biomasa sino también los productos de valor agregado.

2.5.3 FICORREMEDIACIÓN Y PRODUCTOS DE VALOR AGREGADO

Las microalgas y cianobacterias son capaces de acumular metabolitos como los ácidos grasos esenciales y, pigmentos entre otros (tabla 10), que tienen aplicación en diferentes campos de investigación y biotecnología (Pienkos & Darzins, 2009; Hannon et al., 2010; Singh et al., 2011). Es importante resaltar que el contenido de estas sustancias depende de la cepa, las condiciones de cultivo, edad o etapa de crecimiento, así como de la producción final y productividad de biomasa.

2.5.3.1 POTENCIAL DE VALOR AGREGADO

La biomasa microalgal resultante de la ficorremediación se puede mantener en sistemas para procesar los residuos verdes, también conocidos como residuos orgánicos biodegradables, y ambos productos de desecho tienen potencial para la producción de biocombustibles (Demirbas, 2009, Gibbons & Hughes, 2009). Un producto de valor agregado más factible e inmediato es el biohidrógeno, que puede ser generado por la biomasa de microalgas (que es también una herramienta de captura de CO₂, como se mencionó en la sección 2.4.2.4) (Melis & Happe, 2001). Otros productos inmediatamente viables que pueden ser generados por biomasa microalgal son útiles para fines agrícolas y en la acuicultura, se utilizan actualmente como materia prima, como fertilizante (biochar) o alimento de peces; (Pulz & Gross, 2004). La creación de biochar o biocarbón tiene potencial como fertilizante, ya que la cantidad de CO₂ que emite a largo plazo, es de 12-84 % menor a la que emiten los fertilizantes químicos (Gaunt & Lehmann, 2007).

TABLA 10. Contenido de compuestos de valor agregado en *Chlorella vulgaris* en g/100 g de peso seco (Safi et al., 2014).

Aminoácidos	*Contenido	Pigmentos	Contenido	Minerales	Contenido	Vitaminas	Contenido
Ácido aspártico	9.3	β-caroteno	0.012	MICROELEMENTOS		B1 (tiamina)	0.0024
Treonina	5.3	Astaxantina	0.55	Na	1.35	B2 (rivoflavina)	0.006
Serina	5.8	Cantaxantina	0.362	K	2.15	B3 (niacina)	0.0238
Ácido glutámico	13.7	Luteína	0.0038	Ca	0.59	B5 (ácido pantoténico)	0.0013
Glicina	6.3	Clorofila a	0.0096	Mg	0.44	B6 (piridoxina)	0.0017
Alanina	9.4	Clorofila b	0.0057	P	1.74	B7 (biotina)	0.1916
Cisteína	N. D.	Fheofitina a	0.0056	MACROELEMENTOS		B9 (ácido fólico)	0.0269
Valina	7	Fheofitina b	N. D.	Cr	N. D.	B12 (cobalamina)	0.1259
Metionina	1.3	Violaxantina	3.7x10 ⁵	Cu	0.19	C (ácido ascórbico)	0.1
Isoleucina	3.2			Zn	0.55	E (tocoferol)	2.787
Leucina	9.5	Azúcares	Contenido	Mn	0.4	A (retinol)	0.0132
Tirosina	2.8	Ramnosa	54	Se	N. D.		
Fenilalanina	5.5	Arabinosa	9	I	0.13		
Histidina	2	Xilosa	19	Fe	0.68		
Lisina	6.4	Manosa	7				
Arginina	6.9	Galactosa	26				
Triptófano	N. D.	Glucosa	4				
Ornitina	N. D.						
Prolina	5						
N. D.: No determinado *g/100g de proteína							

2.5.3.2 MICROALGAS COMO FUENTE DE BIOCOMBUSTIBLES DE CUARTA GENERACIÓN

En busca de fuentes de energía más limpias y sustentables ante la desaparición de los combustibles fósiles y los problemas de contaminación generados por su uso, se han desarrollado sucesivas generaciones de biocombustibles procedentes de biomasa (Arias et al., 2013; Johansen, 2012).

La *primera generación* exitosa de biocombustibles líquidos fue la producción de etanol basado en los granos de maíz, caña de azúcar y remolacha (bioetanol), requería un gran número de semillas; a la vez, se necesitaba una cantidad importante de biocombustible cada año (Abou-Shanab et al., 2013). Hasta el 2013 se identificaron y dieron a conocer problemas graves, no sólo ambientales (Arias et al., 2013). Había alimentos y tierras destinadas a la producción de biocombustibles, lo que generaba competencia entre la producción de comida y la de biocombustibles dando lugar a un aumento del precio de alimentos. Por ello fue necesario mejorar los procesos y materias primas.

Así surgió la *segunda generación* de biocombustibles. En este caso, la materia prima no peligra por su escasez, no desvía alimentos de la cadena alimentaria animal o humana (ni siquiera es un alimento) y tiene un menor impacto ambiental; aún se están desarrollando y entre ellos se encuentran el bioetanol a partir de celulosa, hidrobiodiésel, biometanol, diesel de madera, etc. (Amin, 2009). Se puede incluir a las microalgas en este grupo, aunque se ha englobado dentro de una tercera (e incluso cuarta) generación de biocombustibles por su gran capacidad de crecimiento y su potencial energético (Chen & Walker, 2011; Rodolfi et al., 2009).

La *tercera generación* de biocombustibles se basa en el uso de métodos de producción similares a los de segunda generación, pero empleando como materia prima biomasa específicamente adaptada o diseñada mediante biología molecular (Saha et al., 1996). La celulosa tiene una ventaja enorme. Es la molécula más abundante, formando parte de la biomasa terrestre. Sin embargo, presenta un problema: la extrema dificultad de la digestión o degradación de las paredes celulares vegetales para la producción de biocombustibles, lo que a escala laboratorio es costoso a diferencia de la biomasa microalgal (Saha et al., 1996).

En los biocombustibles de *cuarta generación* hasta el día de hoy, sólo se encuentran las microalgas como materia prima. Las ventajas son la captación y almacenamiento de carbono, tanto a nivel de la materia prima como de la tecnología de proceso (Arias et al., 2013); la materia prima no sólo se adapta para mejorar la eficiencia de proceso, sino que se diseña para captar más CO₂, a medida que

el cultivo crece. Con ellas se puede producir un aceite que tras un proceso de refinado puede utilizarse como biodiesel (Cho et al., 2013; Singh et al., 2011).

Según el Departamento de Energía de EE. UU., el rendimiento de los biocombustibles de cuarta generación es de 10 a 100 veces superior al de los biocombustibles de segunda generación (Rodolfi et al., 2009). Se puede producir la biomasa al aire libre, aunque debido al problema derivado de posibles contaminaciones (crecimiento de otras especies de microorganismos), control de pH, temperatura, etc., es difícil de mantener, y ha caído en desuso. Si la producción de biomasa se hace en sistemas cerrados con atmósfera controlada o en fotobiorreactores el proceso se acelera (Kunjapur et al., 2010).

En el escenario descrito se eliminan los principales inconvenientes de los biocombustibles de primera generación, ya que se evita el uso de tierras de cultivo y de los propios alimentos y, además, el impacto ambiental es considerablemente menor (Sialve et al., 2009). Las microalgas tienen la particularidad de crecer muy rápido y ser capaces de hacerlo en aguas marinas, dulces, residuales (Park et al., 2011) y salobres (Kunjapur et al., 2010). Las microalgas reportadas con los contenidos más altos de lípidos son *Botryococcus* (25-80 % en base seca), *Cylindrotheca* (16-37 %) y *Chlorella* (14-32 %), aunque algunas especies pueden aumentar su contenido si se optimizan las condiciones de cultivo (figura 14). En los procesos de producción de biocombustibles, se suele aprovechar el dióxido de carbono proveniente de algunas empresas, por lo que las plantas industriales actuales intentan establecerse cerca de donde existan fuentes o depósitos de CO₂ de origen subterráneo, ya que tiene más pureza (Rodolfi et al., 2009; Singh & Singh, 2014).

Los métodos de cultivo establecen los productos que se hacen disponibles a partir de la biomasa. El biodiesel es, con mucho, el producto de mayor valor añadido; sin embargo, todavía no se ha logrado la producción de cantidades suficientes de biomasa (o biomasa de mayor rendimiento) a un costo económicamente viable.

Figura 14. Contenido de lípidos de algunas especies de microalgas (Arias et al., 2013).

JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

El aumento de la contaminación de los recursos hídricos, debido a un mal manejo y su sobreexplotación, está generando riesgos graves a la disponibilidad y a la calidad de los recursos hídricos. Por ello, se requiere de tecnologías como herramienta que ofrezcan una respuesta adecuada al “problema” que plantean las aguas residuales generadas por la población y sus necesidades. La presencia de nitrógeno y fósforo en aguas residuales ocasiona el problema de eutrofización. Ante este escenario, las microalgas, por su metabolismo fotoautotrófico, poseen un valioso potencial en biotecnología ambiental, todavía sin explotar a plenitud, que permitiría llevar a cabo de forma económica y medioambientalmente sostenible el tratamiento de aguas residuales (eliminando nutrientes basados en nitrógeno y fósforo), acoplado al de mitigación de CO₂ de corrientes gaseosas, al utilizar esta sustancia como fuente de carbono para el cultivo de las microalgas.

Particularmente el género *Chlorella* sp., es resistente a altas concentraciones de CO₂ (Greque de Moraes & Vieira Costa, 2007; García Cubero, 2014; Singh et al., 2015) y ha sido eficiente en su mitigación (Bittencourt Sidney et al., 2010; Ho et al., 2011); a su vez es una de las cepas más utilizadas en la remoción de contaminantes nitrogenados y fosforados del agua residual (Bonchai et al., 2012; Chloi & Lee, 2012; Su et al., 2012; Gao et al., 2014; Velichkova et al., 2014; Wang et al., 2015; ; Gao et al., 2016 Mendez et al., 2016). Todo esto lo hacen un excelente candidato para acoplar ambos tratamientos; aunque depende de la especie, de las condiciones de cultivo y del tipo de agua residual. Por otra parte, el efluente del reactor UASB de la PTAR de la UAM-I, contiene N y P, en forma de amonio y fosfato, respectivamente (Salinas Gutiérrez, 2007; Cervantes-Zepeda et al., 2011), ambos iones son asimilables por la microalgas. Por lo que dicho efluente y el género *Chlorella* sp. fueron seleccionado como sistema modelo para el presente estudio.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué efecto tiene la concentración de CO₂ en las cinéticas de crecimiento microalgal y en la remoción de nitrógeno y fósforo del agua residual de la PTAR de la UAM-I?

HIPÓTESIS

5. HIPÓTESIS

A mayor concentración de CO₂, el pH básico del agua residual tenderá a disminuir, favoreciendo el crecimiento de las microalgas, por lo que se espera un máximo de crecimiento celular siendo así mayor la cantidad de biomasa producida; por tanto, el porcentaje de remoción de N y P del agua residual también será mayor.

OBJETIVOS

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la concentración de CO₂ sobre el crecimiento de una microalga del género *Chlorella* sp. y sobre su porcentaje de remoción de nitrógeno total y fósforo total del efluente de la PTAR de la UAM Iztapalapa.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Mantener y propagar, a condiciones controladas, distintas cepas del genero *Chlorella* sp.: *Chlorella vulgaris* (UTEX 259 y UTEX 2714) y *Chlorella protothecoides* (UTEX 256)
2. Evaluar la producción de biomasa en un medio no convencional y económico:
 - a) Evaluar fertilizantes comerciales como medio de cultivo para la cepa
 - b) Determinar la cinética de crecimiento en fertilizantes comerciales
 - c) Cuantificar los lípidos extraídos de la biomasa
3. Evaluar el efecto de la concentración de CO₂ en la eliminación de nitrógeno y fósforo del agua residual a escala matraz.
 - a) Cuantificar la concentración de N y P del efluente de la PTAR de la UAM Iztapalapa
 - b) Determinar la cinética de crecimiento en distintas concentraciones de CO₂ en aire.
 - c) Evaluar la remoción de nitrógeno y fósforo del agua residual en distintas concentraciones de CO₂

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

7.1 DIAGRAMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

7.1.1 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA

Se realizó una continua investigación bibliográfica de artículos originales y de revisión en distintos buscadores: ScienceDirect, Scielo, Directory of Open Access Journals, Google Academic, WorldWide Science, etc. Se recopiló y analizó información sobre las características de las especies seleccionadas (*Chlorella vulgaris* y *Chlorella protothecoides*), los medios y las condiciones de cultivo de ambas especies, así como su aplicación en el tratamiento de agua residual doméstica para la remoción nutrientes, su capacidad en la mitigación de CO₂ y sus opciones de valor agregado post-ficorremediación.

7.1.2 CEPAS SELECCIONADAS: CARACTERÍSTICAS DE LAS ESPECIES Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las cepas del género *Chlorella* sp. (taxonomía en anexo 11.1), utilizadas en el presente estudio, provienen de la Colección de Cultivos de Algas de la Universidad de Texas, campus Austin (Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin):

- *Chlorella vulgaris* UTEX 2714
- *Chlorella vulgaris* UTEX 259
- *Chlorella protothecoides* UTEX 256

Género:

- *Chlorella* sp. (Margalef, 1983)

Diámetro: 3-5 µm

Peso seco: 6-15 pg/cél

Volumen: 25-60 µm³/cél

Ks de P: 4-5 µm P/L

Especies:

- *Chlorella vulgaris*

Temperatura óptima: 25 °C (García Cubero, 2014)

pH óptimo: ~7.0 (6.0-9.0, Marchello et al. 2015)

Máxima intensidad de luz: 2650 lux (JI et al., 2013)

µ_{max} = 0.45 h⁻¹ (en Medio BG11, Taziki et al., 2015)

Composición de la biomasa: CH_{1.66}O_{0.33}N_{0.8}P_{0.01} (Liang et al., 2009)

M_{bio}: ~20.39 g·mol_x⁻¹

Contenido de lípidos: 5-58 % (Liang et al., 2009)

- *Chlorella protothecoides*

Temperatura óptima: 28 °C (O'Grady & Morgan, 2010)

pH óptimo: ~7.5 (6.5-10.0, Gris et al., 2014)

Máxima intensidad de luz: 3200 lux (UTEX, 2016)

$\mu_{\max} = 0.154 \text{ h}^{-1}$ (para células heterotróficas, Margalef, 1983)

Composición de la biomasa: CH₂O_{0.67}N_{0.14}P_{0.008} (para *Chlorella* sp. en general, Gomez Luna, 2007)

M_{bio}: ~26.96 g·mol_x⁻¹

Contenido de lípidos: 14.6-57.8 % (Liang et al., 2009)

7.1.3 MANTENIMIENTO Y PROPAGACIÓN DE LAS CEPAS DE *Chlorella* sp.

Se realizó el mantenimiento de muestras de tres cepas del género *Chlorella* sp. (ver anexo 11.2). Todas las muestras de cepas de microalgas se conservaron en tubos de 20 mL, bien etiquetados (figura 15), en una gradilla dentro de un sistema formado por un recipiente con capacidad de 20 L, con aproximadamente 6 L de agua destilada (con 3 gotas de hipoclorito comercial Cloralex® para evitar contaminación). El agua se mantenía a temperatura controlada, 26 °C (con calentador sumergible con termostato ECOTHERMAL® de 25W). La iluminación de intensidad promedio 570 lux con tiras de luces LED RGB ROSH® de 5 m, con controlador en ciclos de luz/oscuridad de 12:12 h.

Figura 15. Información contenida en la etiqueta de cada recipiente de las muestras biológicas.

El medio de cultivo para conservación fue el Bold3N modificado (Anexo 11.8). Cada 15-20 días aproximadamente, se adicionaba un 50 % de volumen de medio de cultivo Bold 3N modificado ajustado a pH 7. Una vez que el volumen superaba 2/3 partes del envase, ya sea tubo o matraz, se trasvasaba a un recipiente de mayor volumen (se escalaba, figura 16b) o bien, se duplicaba (figura

16a); el trasvase se realizaba en condiciones asépticas, en campana de flujo laminar y junto a mechero Bunsen encendido.

Figura 16. Esquemas de duplicado y escalado de las muestras biológicas: a) Duplicado de muestra biológica o cepa (50 % biomasa + 50 % medio de cultivo en cada tubo), b) Escalado de muestra biológica (100 % biomasa + 100 % medio de cultivo en la botella final).

Las microalgas se agitaban manualmente dos veces por día para mantenerlas en suspensión. Los tubos con tapón de plástico se aireaban en campana de flujo laminar y cerca de mechero Bunsen encendido, aflojando el tapón por unos minutos y cerrando inmediatamente para evitar contaminación. Para los matraces con capacidad de 125 y 250 mL, se prepararon tapones de algodón con gasa, a medida de cada boca del recipiente, para permitir la entrada de aire de forma indirecta. Posteriormente, para botellas con capacidad de 1 L fue necesario el diseño y montaje de un sistema de aireación.

7.1.3.1 DISEÑO DEL SISTEMA DE AIREACIÓN PARA CULTIVO EN BOTELLA DE 1 L

Se montó un sistema para suministrar aire de manera continua a las botellas de 1L, con cultivos de las cepas con mayor cantidad de biomasa; el gas se suministró con bomba de aire (Elite® 802), se filtró (jeringa filtro estéril de 50 mm de diámetro con membrana de PTFE con poro de 0.2 µm) y se humidificó con agua destilada a través de un matraz Kitasato (figura 17).

Se realizaron pruebas abióticas para regular el flujo de gas suministrado y tener un burbujeo y agitación adecuados (aproximadamente 0.66 L/min); las mediciones de velocidad de flujo se realizaron con un burbujómetro. Posteriormente, se esterilizó por vapor el sistema (por secciones) en autoclave eléctrica Aesa® CV300 a 0.09 MPa, 110 °C por 20 min y se armó en campana de flujo laminar y cerca de mechero Bunsen encendido.

Los cultivos de las tres cepas se mantuvieron hasta obtener suficiente biomasa para escalar a botellas con capacidad de 1 L en el sistema con aireación. Posteriormente la cepa de las que se tuvo cantidad suficiente (cultivo en botellas de 1 L) fue seleccionada para realizar los posteriores experimentos.

Figura 17. Diagrama del sistema de aireación para el mantenimiento de microalgas, con un solo puerto.

7.2 CULTIVO DE *Chlorella* sp. EN MEDIO BASADO CON FERTILIZANTES COMERCIALES

Se seleccionaron y adquirieron, cinco fertilizantes comerciales, en cuyas especificaciones se indicaba que eran solubles en agua, para sustituir el medio de cultivo Bold 3N modificado:

1. Scotts[®]
2. Miracle-Gro[®]
3. Vita[®]
4. Fixa Fol[®]
5. Folim[®]

7.2.1 EVALUACIÓN DE FERTILIZANTES COMERCIALES COMO MEDIO DE CULTIVO PARA LA CEPA

Para cada uno se realizaron pruebas de solubilidad en agua destilada, tras ajustar el pH, lo más cercano a 7 con NaOH [1 M] (J.T.Baker[®], pureza 95 %). El pH se midió con un pH-metro Hanna Instrument[®] HI99141. Se seleccionaron aquéllos que conservaron solubilidad completa, para

realizar las pruebas de cultivo con la cepa de la que se logró tener mayor cantidad de biomasa (*Chlorella vulgaris* UTEX 2714).

Se realizó entonces un escalamiento de los cultivos en los medios con fertilizantes comerciales de tubos de ensaye (con 10 mL de medio de cultivo y 10 mL de inóculo) hasta matraces con capacidad de 125 mL (con 190 mL de medio de cultivo). Los sistemas de cultivo se prepararon en matraces Erlenmeyer de 125 mL con tapón de algodón con un puerto de muestreo con jeringa (figura 18), con 95 mL de medio de cultivo que contenían 50 % vol. de inóculo. Se agitaron manualmente 2 veces al día. Las condiciones iniciales de temperatura y pH fueron 26 °C y 7, respectivamente.

Figura 18. Diagrama del sistema de cultivo para el experimento de microalgas con fertilizantes comerciales como medio de cultivo, con un solo puerto de muestreo.

Se determinaron las cinéticas de crecimiento (sección 8.2) de la cepa *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 en los medios de cultivo con fertilizantes comerciales y en medio Bold 3N modificado (UTEX, 2016) en un periodo de 13 días. Los cultivos se realizaron por triplicado.

7.2.2 DETERMINACIÓN DE LAS CINÉTICAS DE CRECIMIENTO

Para determinar las cinéticas de crecimiento se utilizó el método de recuento celular mediante cámara de Neubauer (BLAUBRAND® de dos cuadrículas de recuento con fondo de 0.1 mm), en microscopio óptico compuesto Olympus® CX21 bajo un objetivo de 40X de aumento y la técnica de espectrofotometría visible a 680 y 750 nm, con un fotómetro Handheld Photometer® modelo ET2020.

Se realizó una curva patrón o estándar de densidad celular por cada medio de cultivo: se prepararon suspensiones de 5 mL de volumen total con alícuotas de cultivo en su respectivo medio con las siguientes relaciones volumétricas: 0/5 (blanco), 1/5, 2/5, 3/5, 4/5 y 5/5 (muestra más concentrada). Se midió la absorbancia de cada suspensión por quintuplicado y se calculó la absorbancia promedio. Se determinó también la densidad celular de cada suspensión. Se graficaron los valores de densidad celular (cél/mL) vs absorbancia (u. a.) de cada medio de cultivo, en Excel (Microsoft® versión 2016) y se realizaron ajustes lineales (ver anexo 11.10).

Con base en la ecuación de la curva patrón, se determinaron por interpolación los valores de densidad celular de las muestras que se tomaron diariamente de cada cultivo en matraz (a cada muestra se le midió la absorbancia).

7.2.3 EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS DE *Chlorella* sp. MANTENIDA EN MEDIOS DE CULTIVO BASADO EN FERTILIZANTES COMERCIALES

La biomasa cultivada en medios basados en fertilizantes comerciales se recuperó por filtración (membrana Durapore® PVDF con poro de 0.22 µm, diámetro de 47 mm), se secaron los filtros con biomasa (80 °C, 2 h) en una mufla y, por diferencia de pesos, se determinó la cantidad de biomasa seca. Todas las muestras fueron cercanas a 0.5 g de biomasa. Cada papel filtro con biomasa fue envuelto en un segundo papel filtro y depositado dentro de un extractor Soxhlet, Figura 19a. Se emplearon 50 mL de hexano (J.T. Baker®, pureza de 95 % de n-hexano) como solvente, los cuales se colocaron con 3 perlas de ebullición en un matraz balón (con capacidad de 50 mL), previo registro del peso del matraz con las perlas de ebullición (*peso 1*). Una vez montado el sistema Soxhlet, se calentó en una parrilla de agitación con calentamiento (LAB COMPANION® Modelo LC-BDH573036U) a punto de ebullición del solvente (69 °C); el solvente evaporado se recuperaba en el condensador (en el enfriador, en que se usaba agua fría) y caía sobre la muestra dentro del papel filtro, donde entraba en contacto con la biomasa. Una vez que la muestra en la sección del Soxhlet se llenaba de solvente, éste se descargaba en el balón a través de un sifón; dicho proceso constituía un ciclo. La extracción se suspendió después de 20 ciclos de aproximadamente 2 min cada uno, para intentar maximizar la extracción de lípidos. Posteriormente se recuperó el hexano con destilación (figura 19b); una vez evaporado todo el hexano, se pesó el matraz balón con las tres perlas de ebullición y los lípidos extraídos, éste se registró como *peso 2*; la diferencia entre el *peso 2* y *peso 1* consiste en la cantidad de lípidos extraídos.

Figura 19. Sistemas para extracción de lípidos: a) extractor Soxhlet, b) destilación del solvente.

7.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL EFLUENTE DEL REACTOR UASB DE LA PTAR DE LA UAM IZTAPALAPA COMO MEDIO DE CULTIVO PARA *Chlorella* sp.

7.3.1 MUESTREO DE AGUA RESIDUAL

Se tomó una muestra simple de 2 L de agua residual en dos botellas limpias (con capacidad de 1 L cada una), con tapa y bien etiquetadas (según indicaciones de NMX-AA-003-1980) por cada punto de muestreo en la PTAR de la UAM-I: 1 L del influente (entrada al reactor UASB) y 1 L del efluente (salida al reactor UASB); se midió temperatura y pH *in situ*, y se refrigeraron a 12 °C para su preservación.

7.3.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL AGUA RESIDUAL

El agua residual se filtró al vacío con un sistema Millipore® Sterifil® con papel filtro Whatman® 40 (poro de 8 µm). Al filtrado se le determinó DQO y concentración de oxígeno disuelto, así como concentraciones de los distintos nutrientes de interés: amonio, nitrato, nitrito, fosfato.

- Se midieron las concentraciones de amonio (NH₄⁺) y de oxígeno disuelto (OD) con un sensor selectivo de iones LabQuest Vernier con dos diferentes electrodos de membrana: uno

selectivo de ion amonio, con un intervalo de 1-18,000 mg/L (ppm), calibrado previamente y otro que determina los cambios en los niveles de oxígeno disuelto, con un intervalo de 0 a 15 mg/L (ppm), el cual no requiere calibración.

- Las concentraciones de nitrato (NO₃⁻), fosfato (PO₄⁺³) y DQO fueron determinadas por técnicas colorimétricas del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater de la American Public Health Association (APHA):
 - Para determinar la demanda química de oxígeno (DQO) se siguió la metodología descrita en la sección 5220 D. “Método colorimétrico de reflujo cerrado” (ver anexo 11.2). Una muestra de ion dicromato (Cr₂O₇²⁻) es digerida, es decir, se oxida el material de DQO en la muestra. Esto da como resultado un cambio en el estado de oxidación del cromo, de hexavalente (VI) a trivalente (III). Ambas especies de cromo son coloreadas y absorben en la región visible del espectro. El Cr₂O₇²⁻ absorbe en la región de los 400 nm, donde la absorción del ion crómico (Cr³⁺) es mucho menor. El Cr³⁺ absorbe fuertemente en la región de los 600 nm, donde el Cr₂O₇²⁻ tiene casi cero de absorción de luz. Los compuestos orgánicos volátiles se oxidan de forma más completa en el sistema cerrado debido al contacto más largo con el oxidante.
 - Para medir la concentración de nitrato (NO₃⁻) se siguió la metodología descrita en la sección 4500-NO₃-B. “Método de detección espectrofotométrica ultravioleta” (ver anexo 11.4). La medición se realiza en una absorción UV a 220 nm que permite la determinación rápida de NO₃⁻. Debido a que la materia orgánica disuelta también puede absorber a 220 nm y NO₃⁻ no absorbe a 275 nm, una segunda medición a 275 nm corrige el valor de NO₃⁻. La muestra se filtró para eliminar posibles interferencias de partículas en suspensión. Además, se llevó a cabo una acidificación con HCl [1 N] para evitar la interferencia de concentraciones de hidróxido o carbonato de hasta 1000 mg CaCO₃/L.
 - Para determinar la concentración de fosfato (PO₄⁺³) se siguió la metodología descrita en la sección 4500-P E. “Método ácido ascórbico” (ver anexo 11.6). El molibdato de amonio y tartrato de antimonio y potasio reaccionan en medio ácido con ortofosfato para formar un ácido fosfomolibdico que se reduce a azul de molibdeno intensamente coloreado por ácido ascórbico heteropoliácido. La absorbancia de esta especie química se mide a 880 nm.

- La concentración de nitrito (NO₂⁻) se determinó con el procedimiento basado en la reacción de Griess, de acuerdo con la NMX-AA-099-SCFI-2006 “Determinación de nitrógeno de nitritos en aguas naturales y residuales” (ver anexo 11.5). El principio del método consiste en que los nitritos presentes reaccionan en medio ácido (pH = 1.9 a 2.5), para formar ácido nitroso que reacciona con la sulfanilamida por una reacción de diazoación para formar una sal de diazonio, la cual por unión con el diclorhidrato de N-(1-Naftil) etilendiamina forma un colorante azoico de color púrpura rojizo (rosáceo) que se mide espectrofotométricamente a 543 nm.

Se realizaron las curvas patrón para cada nutriente (ver anexo 11.7), y se determinó la cantidad de cada nutriente de la muestra problema (agua residual filtrada).

7.4 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO Y REMOCIÓN DE NITRÓGENO Y FÓSFORO DE AGUA RESIDUAL CON *Chlorella* sp. A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CO₂

Los cultivos se prepararon en matraces Erlenmeyer de 250 mL con tapón de goma con tres puertos: uno de aireación, el segundo de muestreo (con jeringa) y el tercero como respiradero tapado sólo con algodón (figura 20).

Se realizó una prueba abiótica para regular el flujo de gas suministrado (aire por compresor y CO₂ por tanque y distribuidor) a 0.96 L/min (ver tabla 11) para tener un burbujeo y agitación adecuados. La medición de la velocidad de flujo se realizó con burbujómetro.

TABLA 11. Flujos de CO₂, aire y total suministrados a los cultivos.

Contenido de CO ₂ en aire	Flujo de aire	Flujo de CO ₂	Flujo total
(% v/v)	(L/min)		
0	0.9600	0.0000	0.9600
2	0.9408	0.0192	0.9600
10	0.8640	0.0960	0.9600

El agua residual se filtró al vacío con un sistema Millipore® Sterifil® con papel filtro Whatman® 40 (poro de 8 µm). Una vez preparado el sistema (algunas secciones unidas y conteniendo agua residual), se esterilizó en autoclave por secciones a 0.09 MPa, 110 °C por 20 min; para después armarse en campana de flujo laminar y cerca de mechero Bunsen encendido.

Figura 20. Diagrama del sistema de cultivo con tres puertos para el experimento de microalgas con agua residual como medio de cultivo y suministro de aire con CO₂.

El cultivo de 200 mL estuvo compuesto por 100 mL de agua residual (filtrada y estéril) y 50 % de inóculo. Los cultivos se agitaron manualmente cada vez que se tomaba muestra, con cuidado para evitar desconectar el sistema de alguna de sus partes. Las condiciones iniciales de temperatura y pH fueron 26 °C y 9, respectivamente.

Para determinar la cinética de crecimiento, el monitoreo y muestreo (5 mL) se realizaron cada 24 h los primeros 8 días y después las muestras tomadas fueron de 10 mL cada 48 h por 5 días más. Se registró temperatura del sistema y presión del tanque de CO₂. Cada muestra se filtró al vacío con un sistema Millipore® Sterifil® con filtros de membrana Durapore® PVDF (poro de 0.22 µm, diámetro de 47 mm) previamente secados a 80 °C por una hora y pesados; el filtro con biomasa se secó a 80 °C por 2 h y al filtrado se le midió pH con pH-metro Hanna Instruments® HI99141 y absorbancias (a 680 nm y 750 nm) con fotómetro portátil Handheld Photometer® modelo ET2020.

Para la determinación de la concentración de los nutrientes a remover por *Chlorella vulgaris* UTEX 2714, se realizaron diluciones 1:10 para las primeras 8 muestras y 1:5 para las últimas 5. Las concentraciones de los nutrientes se evaluaron en un Fotómetro Multiparamétrico Hanna Instruments® HI 83203 (tabla 12) con reactivos comerciales.

TABLA 12. Técnicas utilizadas para la medición de nutrientes en el fotómetro multiparamétrico HI 83203.

Nutriente*	Técnica**	Intervalo de medición de concentración (mg/L)	Longitud de onda para medir absorbancia (nm)	Tiempo de reacción (min: s)
Amonio	Método Nessler	0-10	420	3:30
Amoniaco				
Nitrato	Por reducción de cadmio	0-30	525	4:30
Nitrito	Método de sulfato ferroso	0-150	575	10:00
Fosfato	Método de ácido amino	0-30	525	5:00
OD	Método Winkler	0-10	287	2:00
*Para 10 mL de muestra **Todas son adaptaciones de las técnicas originales				

7.5 GABINETE

Terminadas las tareas de medición y recopilación de los datos, se realizó el trabajo de gabinete para proceder al procesamiento de los mismos, por medio de tres tareas principales:

- Clasificación de los datos mediante la codificación, tabulación y graficación de los mismos en hojas de cálculo Excel, MEDUSA 1.0 y Origin Pro 8.
- Análisis, elaboración de gráficas y tablas comparativas e interpretación de los datos.
- Redacción del informe con los resultados de la investigación en documento Word.

CÁLCULOS:

$$\text{Productividad de densidad celular (cél/mL} \cdot \text{día)} = \frac{C_f - C_i}{t_f - t_i}$$

C_f: Concentración de la densidad celular final (cél/L)

C_i: Concentración de la densidad celular inicial (cél/L)

Δt: Diferencia entre el tiempo en la concentración final e inicial (días)

$$\mu \text{ (d}^{-1}\text{)} = \frac{\ln C_{fe} - \ln C_{ie}}{\Delta t_e}$$

μ: Tasa específica de crecimiento

Ln C_{fe}: Logaritmo natural de la concentración al final de la fase exponencial

Ln C_{ie}: Logaritmo natural de la concentración al inicio de la fase exponencial

Δt_e: Diferencia entre el tiempo en la concentración final e inicial de la fase exponencial (días)

$$\text{Lípidos (\%)} = \frac{P_a \times 100}{P_b}$$

P_a: Peso del aceite

P_b: Peso de la biomasa

$$\text{Remoción de nutrientes (\%)} = 100 - \left(\frac{C_f \times 100}{C_i} \right)$$

C_f: Concentración final del nutriente (mg/L)

C_i: Concentración inicial del nutriente (mg/L)

$$\text{NT (mg/L)} = \text{N-NO}_3^- + \text{N-NO}_2^- + \text{N-NH}_4^+ + \text{N-NH}_3$$

$$\text{PT (mg/L)} = \text{P-PO}_4^{3-}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 MANTENIMIENTO Y PROPAGACIÓN DE LAS CEPAS DE *Chlorella* sp.

Las condiciones de iluminación (luz blanca 570 lux) y temperatura (controlador de temperatura ajustado a 26 °C) implementadas al sistema de cultivo, fueron generales. Se observó un favorecimiento en el crecimiento de las cepas de la especie *Chlorella vulgaris*, particularmente para la cepa *Chlorella vulgaris* UTEX 2714, en comparación con el crecimiento de biomasa de *Chlorella protothecoides*. En la tabla 13 se puede observar que en aproximadamente 4 meses se logró escalar las cepas *Chlorella vulgaris* a matraz de 250 mL, la cepa *Chlorella vulgaris* UTEX 259 no logró aumentar la cantidad de biomasa lo suficiente como para escalar a botella en el mismo periodo. *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 se pudo escalar a dos botellas de 1 L a partir del mes de abril, razón por lo cual fue la cepa seleccionada para los posteriores experimentos.

TABLA 13. Escalamiento de las 3 cepas mantenidas en laboratorio, a lo largo de 15 meses.

FECHA		CEPAS DE MICROALGAS ¹											
		<i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 259				<i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714				<i>Chlorella protothecoides</i> UTEX 256			
Mes	Año	T	M1	M2	B	T	M1	M2	B	T	M1	M2	B
OCT	2015	2				2				5			
NOV	2015	4				4				4			
DIC	2015	6				6	2			4			
ENE	2016	5	1			4	2		2	3	1		
FEB	2016	4	2			6	3	2	2	4	1		
MAR	2016	4		2		8	1	2	2	3	2		
ABR	2016	4		2		6	2		2	3	2		
MAY	2016	6		2		8	2		2	3		2	
JUN	2016	6		2		6	1	1 ²	2	5		2	
JUL	2016	6		2		6		2 ²	2	6		1	
AGO	2016	6		1		6		2 ²	2	6		1	
SEP	2016	6		1		4		3 ²	3	5		1	
OCT	2016	6		1		4		3 ²	3	5		1	
NOV	2016	6		1		4		2 ²	4	4		1	
DIC	2016	6		1		4		1 ²	4	4		1	

T: tubos de 20 mL, M1: matraz de 125 mL, M2: matraz de 250 mL, B: botella de 1L
¹Todas las cepas fueron cultivadas en medio Bold 3N modificado
²Parte de las cepas se adaptaron a agua residual doméstica de la UAM-I

8.2 EVALUACIÓN DE FERTILIZANTES COMERCIALES COMO MEDIO DE CULTIVO

De los cinco fertilizantes de los que se evaluó la solubilidad en agua (tabla 14), sólo dos de ellos: Vita® y Folim® fueron altamente solubles después de ajustar el pH de las soluciones acuosas a 7. El resto de los fertilizantes formaron precipitado. Los fertilizantes que no formaron precipitado fueron aprobados para evaluarlos como medio de cultivo para *Chlorella vulgaris* UTEX 2714.

TABLA 14. Solubilidad de los fertilizantes después del ajuste a pH 7.

Fertilizante	Relación NPK	Estado de agregación	Formación de precipitado	APP**
Scotts®	*10-10-10	Sólido	Sí	X
Miracle-Gro®	*15-30-15	Sólido	Sí	X
Vita®	11-10-12	Líquido	No	✓
FixaFol®	20-20-20	Sólido	Sí	X
Folim®	*20-31-10	Sólido	No	✓
*Nitrógeno de amoníaco (N-NH ₃) y nitrógeno de urea (N-CH ₄ N ₂ O) **Aprobado para prueba como medio de cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714				

8.3 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 EN MEDIO DE CULTIVO BASADO EN FERTILIZANTES COMERCIALES

El crecimiento de *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 en los medios con los dos fertilizantes solubilizados completamente en agua fue significativamente distinto, como se puede observar en la figura 21.

Se distinguieron dos fases de crecimiento: la de adaptación con una duración aproximada de 7 días y la exponencial posteriormente. La cepa en el medio con Folim® tuvo una cinética de crecimiento con una tendencia similar a la del medio convencional, Bold 3N modificado; sin embargo, mostró un mayor crecimiento celular, a los 11 días de cultivo: alcanzó una densidad celular de $(8.10 \pm 1.28) \times 10^6$ cél/mL, mayor en ~ 25.00 % que la observada para la cepa en el medio Bold 3N modificado $((6.46 \pm 1.74) \times 10^6$ cél/mL a los 12 días de cultivo).

Chlorella vulgaris UTEX 2714 en el medio con el fertilizante Vita® presentó una densidad celular máxima a los 12 días de cultivo $((3.82 \pm 0.70) \times 10^6$ cél/mL). Dicho valor de densidad celular fue ~ 41.00 % menor con respecto al medio Bold 3N modificado. Es importante mencionar que a partir del día 6, la cepa perdió la coloración verde que caracteriza al género *Chlorella* (en los 3 matraces, tornando a un color blanco y luego marrón), día en el que también se observó un decaimiento en

el pH de 6.20 a 5.00 ± 0.50 (ver figura 22). Aun cuando la densidad celular aparentemente aumentó en los días siguientes, su capacidad fotosintética, dependiente de la clorofila, y contenido bioquímico fueron alterados a diferencia de las cepas en los otros dos medios, cuyos cultivos conservaron su coloración hasta el final del experimento. Es probable que parte de la biomasa haya muerto.

Figura 21. Cinéticas de crecimiento de *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 en medios con los fertilizantes Folim®, Vita® y Bold 3N modificado, a una temperatura de 25 ± 2 °C.

En la tabla 15 se pueden observar las productividades de densidad celular para *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 (en la fase exponencial), la mayor es de $(15.00 \pm 1.50) \times 10^5$ cél/mL·día con fertilizante Folim® como medio de cultivo. Con Bold 3N modificado fue de $(9.16 \pm 5.42) \times 10^5$ cél/mL·día, la productividad más baja fue de $(6.66 \pm 2.83) \times 10^5$ cél/mL·día con fertilizante comercial Vita® como medio de cultivo. Antonio et al. (2002) logró una productividad de densidad celular en la fase exponencial de 29×10^5 cél/mL·día con una especie del género *Chlorella* sp., en cultivos de 300 mL con un medio sintético (relación de NP de 9:1); es decir, el doble a la alcanzada con el fertilizante Folim®. Su relación de NP fue mayor a la del fertilizante Folim® (1:1.5, tabla 14), lo que favoreció su crecimiento.

Figura 22. Curva de pH de *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 en medios con los fertilizantes Folim®, Vita® y Bold 3N modificado, a una temperatura de 25 ± 2 °C.

La constante o velocidad específica de crecimiento (μ) también se muestra en la tabla 15, se puede observar que la mayor es de $0.234 \pm 0.052 \text{ d}^{-1}$ con el fertilizante Folim®, después le sigue Vita® y el medio convencional Bold 3N modificado, 0.167 ± 0.059 y $0.103 \pm 0.032 \text{ d}^{-1}$, respectivamente. Converti et al. (2009) cultivaron *Chlorella vulgaris* CCAP 211 en matraz Erlenmeyer de 2 L con medio Basal Bold y calcularon una μ de $0.14 \pm 0.00 \text{ d}^{-1}$, que es un valor similar a la velocidad específica de crecimiento calculada de *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 con fertilizante comercial Vita® en el presente estudio.

TABLA 15. Productividad de densidad celular de crecimiento en la fase exponencial y tasa específica de crecimiento.

Especie	Medio de cultivo	Fase exponencial (día)		Productividad de densidad celular (10 ⁵ cél/mL·día)	μ^* (d ⁻¹)
		Inicio	Final		
<i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714 (Presente estudio, 2016)	Bold 3N modificado	4	10	9.16 ± 5.42	0.103 ± 0.032
	Folim®	8	11	15.00 ± 5.00	0.234 ± 0.052
	Vita®	9	12	6.66 ± 2.83	0.167 ± 0.059
<i>Chlorella</i> sp. (Vera et al., 2002)	Medio sintético (relación 9:1 de NP)	2	10	29	ND
<i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211 (Converti et al, 2009)	Medio Basal Bold	N.D.	N.D.	N.D.	0.14 ± 0.00
*Calculada del Ln de la cinética completa de crecimiento.					

Al comparar las cinéticas de crecimiento de la cepa en los medios con fertilizante comercial, es evidente que el mayor crecimiento se presentó en el medio con mayor proporción de P (ver tabla 14). El fósforo es fundamental en muchos procesos celulares, tales como la formación de ácidos nucleicos y transferencia de energía (Grobbelaar, 2004). Aunque el contenido en fósforo de las microalgas es menor al 1 %, su deficiencia en el medio de cultivo es una de las mayores limitaciones al crecimiento. El fertilizante Folim® es el único que contenía nitrógeno de urea, según Sayed et al. (2011) aunque el nitrato es conocido como la fuente preferida de nitrógeno para muchas especies de algas, la urea parece ser la fuente de nitrógeno más eficaz para proporcionar a algunas *Chlorella vulgaris* una cantidad suficiente de carbono junto a la misma cantidad de nitrógeno ya que en su estudio alcanzó 0.9 g/L de biomasa con urea como fuente de nitrógeno y 0.5 g/L con nitrato como fuente de nitrógeno, ambos a las mismas condiciones. Por otra parte, el fertilizante Folim® contiene 0.2 % de otros elementos traza como: B, Cu, Fe, Mo, Mn y Zn a diferencia del fertilizante Vita® (ver anexo 11.9).

8.4 CONTENIDO LIPÍDICO DE *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 MANTENIDA EN MEDIOS DE CULTIVO BASADOS EN FERTILIZANTES COMERCIALES

En cuanto al porcentaje de lípidos extraídos respecto a la biomasa seca se esperaba un valor entre 5 y 58 %, de acuerdo con resultados reportados para la especie *Chlorella vulgaris* (Wu et al., 2012; Loera-Quezada & Olguín, 2010). Cabe mencionar que los cultivos en los tres medios fueron mantenidos por 5 semanas más, replicando cada 15 días para obtener suficiente biomasa para el proceso de extracción de ácidos grasos. En este proceso la cepa en medio Vita® recuperó su coloración verde después de la primera réplica, favoreciendo a las células viables.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes: la mayor cantidad de lípidos extraídos se encontró en la biomasa cultivada en el fertilizante Folim®, seguido por el cultivo en Vita® y finalmente, el cultivo con el menor porcentaje asociado de lípidos extraídos fue el del medio Bold 3N modificado (ver figura 23). Los resultados obtenidos fueron al menos 13.00 % más altos que el valor máximo del intervalo antes mencionado. Este valor fue muy similar al estudio de Yeh & Chang (2012), en el cual *Chlorella vulgaris* ESP-31 creció en condiciones fototróficas (CO₂), foto-heterotróficas y mixotróficas en medio rico en nitrógeno (es decir, medio basal y medio Bristol modificado), alcanzando una concentración de biomasa de 2.88 g /L (ver tabla 16). En medio Bristol mixotrófico (glucosa y CO₂) alcanzó un 57.61 % de lípidos. Por otra parte, Liang et al. (2009) cultivaron *Chlorella vulgaris* UTEX 259 en medio heterotrófico con glucosa (1 %) en un fotobiorreactor con capacidad de 1 L durante 6 días y lograron una concentración de biomasa de 0.25 ± 0.01 g/L con un porcentaje de lípidos extraídos de 38.00 ± 2.00 %, lo que constituye 2 % menos que la obtenida en el presente estudio con el medio Bold 3N modificado. De los medios con fertilizantes comerciales, el que tenía mayor contenido de P también dio como resultado en el cultivo, un mayor porcentaje de lípidos extraídos.

Figura 23. Concentración de biomasa y porcentaje de lípidos extraídos de *Chlorella vulgaris* UTEX 2714.

TABLA 16. Concentración de biomasa y porcentaje de lípidos extraídos de *Chlorella vulgaris* UTEX 2714.

Especie	Medio de cultivo	Concentración de biomasa	Porcentaje de lípidos extraídos
		(g/L)	(%)
<i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714 (En este estudio)	Bold 3N modificado	0.086 ± 0.001	40.00 ± 0.11
	Folim®	0.094 ± 0.001	56.79 ± 1.94
	Vita®	0.082 ± 0.001	51.64 ± 1.42
<i>Chlorella vulgaris</i> ESP 31 (Yeh & Chang, 2012)	Medio Bristol mixotrófico (glucosa y CO ₂)	2.88 ± 0.80	57.61
<i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 259 (Liang et al., 2009)	Medio heterótrofo con glucosa	0.25 ± 0.01	38.00 ± 2.00

8.5 CARACTERIZACIÓN DEL AGUA RESIDUAL DOMÉSTICA DE LA PTAR DE LA UAM-I

En la tabla 16 se presenta la temperatura y el pH del influente y efluente del reactor UASB. Estos valores se encuentran cerca de los valores de temperatura y pH óptimos para *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 los cuales son 25 °C y 7, lo que permite utilizar el efluente del reactor UASB de la UAM-I como medio de cultivo para la cepa.

TABLA 17. Temperatura y pH registrados para el influente y efluente del reactor UASB de la UAM-I.

	INFLUENTE	EFLUENTE
Temperatura (°C)	22 ± 1	24 ± 1
pH	7.76 ± 0.01	7.67 ± 0.01

También se encontró nutrientes nitrogenados y fosforados en la salida del reactor UASB (ver tabla 17). La muestra del efluente presentó una mayor cantidad de nitrógeno total (510.93 ± 14.87 mg/L), que de fósforo total (81.53 ± 0.40 mg/L). El nitrógeno es el nutriente más importante para las microalgas después del carbono (Grobbelaar 2004, Abdel-Raouf et al. 2012), y según Hernández-Pérez & Labé (2014) el nitrógeno es un factor limitante del crecimiento y está relacionado con su productividad.

TABLA 18. Caracterización fisicoquímica de las muestras de influente y efluente del reactor UASB de la UAM-I.

PARÁMETRO	INFLUENTE (g/L)	EFLUENTE (g/L)
[DQO]	1812.67 ± 6.43	1104.33 ± 8.25
[OD]	0.04 ± 0.32	1.70 ± 0.69
[NH ₄ ⁺]	62.0 ± 0.75	40.30 ± 0.53
[NO ₃ ⁻]	16.72 ± 0.86	34.70 ± 1.52
[NO ₂ ⁻]	2601.67 ± 13.38	1551.67 ± 12.83
[NT]	843.38 ± 14.99	510.93 ± 14.87
[PO ₄ ⁻³]	158.5 ± 0.40	250.00 ± 0.40
[PT]	51.69 ± 0.40	81.53 ± 0.40

8.6 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 EN AGUA RESIDUAL DOMÉSTICA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CO₂

En la figura 24 se presentan las cinéticas de crecimiento de *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 cultivada en agua residual, con suministro de aire atmosférico (indicado como 0 % de CO₂), 2 y 10 % de CO₂ en aire. Sólo las fases de adaptación y crecimiento exponencial fueron observadas a 0 y 2 %; a 10 % se alcanzó la fase estacionaria.

La densidad celular del cultivo con 0 % de CO₂ alcanzada fue de $(1.09 \pm 0.28) \times 10^7$ cél/mL a los 17 días de cultivo; respecto al inóculo inicial $(5.41 \pm 0.45) \times 10^6$ cél/mL tuvo un crecimiento del 101 %. Cuando el cultivo es aireado con 2 % de CO₂ se obtuvo una densidad celular de $(1.19 \pm 0.82) \times 10^7$ cél/mL a los 20 días de cultivo, lo que significa un crecimiento del 120 %. Cuando el cultivo es provisto con aire con 10 % de CO₂, la densidad celular fue de $(5.42 \pm 0.49) \times 10^6$ cél/mL, es decir un crecimiento de 0.18 %, respecto al inóculo inicial.

Figura 24. Cinéticas de crecimiento en densidad celular de *Chlorella vulgaris* UTEX 2714, cultivada a diferentes concentraciones de CO₂ a 25.5 ± 1.0 °C.

En todos los matraces se observó el desarrollo de una biopelícula en las paredes; ésta se retiró y se cuantificó junto con la biomasa suspendida al término de la determinación de las cinéticas de crecimiento (a 38 días de cultivo). En cuanto a la cantidad de biopelícula y biomasa suspendida obtenida, en la figura 25 se puede observar que *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 cultivada en agua residual por 38 días, a una concentración de 0 % de CO₂ alcanzó los 0.23 ± 0.001 g; con 2 % de CO₂ se lograron (0.340 ± 0.001) g/L, es decir el 47.80 % más del alcanzado al cultivarse sin CO₂; finalmente, cuando el cultivo es suministrado con 10 % de CO₂ se formó una biomasa de: (0.050 ± 0.001) g/L, aproximadamente un incremento del 21.70 % respecto al caso de aire sin CO₂.

Figura 25. Cantidad biopelícula obtenida durante el crecimiento de *Chlorella vulgaris* UTEX 2714, cultivada a diferentes concentraciones de CO₂.

Los resultados anteriores, de cinéticas de crecimiento y de masa de biopelícula indican un máximo de crecimiento en el cultivo de *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 en el intervalo de [0,10] % de CO₂, dado que el mayor crecimiento se observó para el cultivo con suministro de 2 % CO₂, debido a la biopelícula (figura 26).

Figura 26. Esquema de la biopelícula de *Chlorella vulgaris* UTEX 2714, formada a los 36 días de cultivo a diferentes concentraciones de CO₂.

El pH inicial fue de 9 (perteneciente al agua residual), nótese la acidificación con el suministro a 2 % y 10 % de CO₂ alcanzando pH de 8.7 y 8.0 (figura 27), respectivamente, valores que se mantuvieron más o menos constantes durante el crecimiento de las microalgas en el periodo de los experimentos.

Figura 27. Curvas de pH de *Chlorella vulgaris* UTEX 2714, cultivada a diferentes concentraciones de CO₂ a 25.5 ± 1.0 °C.

Las productividades de densidad celular fueron muy similares a 0 y 2 % de CO₂, $(8.57 \pm 5.71) \times 10^5$ cél/mL·día y $(8.75 \pm 1.87) \times 10^5$ cél/mL·día, respectivamente (ver tabla 19), aunque no se tomó en cuenta la densidad celular que se formó como biopelícula a los 36 días de cultivo (ver figura 24). En un estudio previo con la misma especie *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 no axénica, se observó una productividad de $(5.25 \pm 1.87) \times 10^5$ cél/mL·día mostrando la misma curva atípica que en distintas concentraciones de CO₂, ver anexo 11.11. Finalmente, para 10 % de CO₂ fue de apenas de $(2.86 \pm 1.43) \times 10^5$ cél/mL·día. Jeong et al. (2013) cultivó *Chlorella vulgaris* en medio N-8 en matraz Erlenmeyer de 250 mL con un flujo de aireación de aproximadamente 16 L/min con 0 y 10 % de CO₂ y bicarbonato de sodio, su productividad sin CO₂ fue de 8.57×10^5 cél/mL·día, de manera similar al presente estudio con 0 % de CO₂; con 10 % de CO₂ obtuvieron 22.8×10^5 cél/mL·día, una productividad 10 veces mayor a la alcanzada en este estudio, con la misma concentración de CO₂. Al parecer *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 no logró adaptarse a 10 % de CO₂ a diferencia de la sepa utilizada por Jeong et al.

TABLA 19. Productividades de densidad celular de *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 en la fase exponencial.

Especie	Medio de cultivo	Flujo de aire (L/min)	Contenido de CO ₂ (%)	Fase exponencial (día)		Productividad de densidad celular (10 ⁵ cél/mL·día)	μ^4 (d ⁻¹)
				Inicio	Final		
<i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714 (No axénica)	Agua residual ¹ (julio, 2016)	0.90 ²	0	8	12	5.09 ± 1.73	0.100 ± 0.019
<i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714 (Presente estudio, 2016)	Agua residual ¹ (octubre, 2016)	0.96 ³	0	10	17	8.57 ± 5.71	0.032 ± 0.007
			2	10	20	8.75 ± 1.87	0.029 ± 0.006
			10	10	17	2.86 ± 1.43	0.009 ± 0.007
<i>Chlorella vulgaris</i> (Jeong et al., 2003)	Medio N-8	~16	0	0.5	5.5	8.57	N.D.
			10	2.5	6.5	22.8	N.D.
<i>Chlorella vulgaris</i> (Gao et al., 2014)	Agua residual tratada (porcina)	0.25	0	N.D.	N.D.	N.D.	0.108

¹Efluente del reactor UASB de la PTAR de la UAM-I
²Aireación con bomba de aire
³Aireación con compresor de aire
⁴Calculada del Ln de la cinética completa de crecimiento

En cuanto a la velocidad específica de crecimiento (μ), también comparada en la tabla 19, se obtuvieron valores similares entre 0 y 2 % de CO₂, la más baja fue con 10 %. En un estudio previo con *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 no axénica, con una densidad inicial de $(1.85 \pm 0.27) \times 10^6$ cél/mL·día con el mismo tipo de agua residual, aireada con bomba de aire y un flujo de aire similar al presente estudio, se calculó una μ de 0.100 ± 0.019 d⁻¹; hasta 33 veces mayor que con 0 y 2 % de CO₂, cabe mencionar que pese a la mayor densidad inicial con la cepa axénica $((5.41 \pm 0.45) \times 10^6$ cél/mL·día) no se alcanzó una mayor velocidad específica de crecimiento debido, tal vez al agua residual de la PTAR de la UAM Iztapalapa que suele cambiar su composición de nutrientes a lo largo del año, ya que no fue la misma para ambos experimentos, desafortunadamente no se evaluaron nutrientes del agua residual con la cepa no axénica. Sin embargo, el estudio de Gao et al. (2014) con *Chlorella vulgaris* tiene una μ de 0.108 d⁻¹, similar a la alcanzada con la cepa no axénica, el medio de cultivo que utilizaron fue agua residual porcina (con NP de 19:1) con un flujo de 0.25 L/min sin CO₂ la relación de NP del agua residual porcina es mayor a la del presente estudio (1:1.6). Lo que

confirma la idea de que el agua residual de la PTAR de la UAM Iztapalapa del julio del 2016, debió tener una relación de NP similar a la de Gao et al.

8.7 REMOCIÓN DE NITRÓGENO Y FÓSFORO CON *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 EN AGUA RESIDUAL DOMÉSTICA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CO₂

La remoción de nitrato fue del 100 ± 0.05 %, para los cultivos de *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 con suministro de 0, 2 y 10 % de CO₂, se logró remover los 20 ± 0.01 mg/L de nitrato desde el primer día de cultivo (figura 28). El agua residual no contenía nitrito o su concentración estuvo todo el tiempo por debajo de límites de detección (figura 29).

En cuanto al amonio, figura 30, la concentración de esta especie química en el cultivo al inicio fue de 11.40 ± 0.01 mg/L; con un flujo de aire sin dióxido de carbono (0 % CO₂) se removieron ~ 4.60 mg/L, el 59.65 ± 11.22 % desde el día 1 de cultivo, hasta alcanzar el 96.49 ± 1.06 % de remoción (~ 11.0 mg/L) a los 20 días de cultivo, para tener 0.40 ± 0.99 mg/L como concentración final. Con 2 % de CO₂ se removieron ~ 3.45 g/L (el 30.26 %) desde el primer día de cultivo y 11.4 mg/L, el 100 ± 0.09 % para el día 20, en que la concentración final fue 0 ± 0.01 mg/L. Finalmente, con 10 % de CO₂ se removió el 30.70 ± 19.20 % desde el día 1 de cultivo; el día 20, su concentración final fue de 0 ± 0.01 mg/L. Considerando las barras de error, no hay diferencias significativas respecto a la remoción de amonio entre 0 y 2 % de CO₂, sin embargo a partir del día 17 se alcanzó un 100 % de remoción de amonio con 2 y 10% de CO₂ que a 0 % CO₂.

Figura 28. Cinéticas de remoción de nitrato con *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 a diferentes concentraciones de CO₂.

Figura 29. Cinéticas de remoción de nitrito con *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 a diferentes concentraciones de CO₂.

Figura 30. Cinéticas de remoción de amonio con *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 a diferentes concentraciones de CO₂.

Respecto a la remoción de amoníaco, la concentración de éste en función del tiempo se muestra en la figura 31. La concentración inicial de amoníaco fue de 10.8 ± 0.01 mg/L; con el cultivo con el flujo de aire sin CO₂ se removió el 40.74 ± 22.49 % desde el primer día de cultivo, hasta alcanzar el 97.45 ± 1.72 % a los 20 días de cultivo, correspondiente a 0.27 ± 0.11 mg/L de concentración final. Con 2 % de CO₂ se removió el 71.29 ± 16.21 % desde el día 6 de cultivo, el día 20, la concentración final fue de 0 ± 0.01 mg/L (100 ± 0.09 % de remoción). Finalmente, con 10 % de CO₂ se removió el 90.27 ± 2.92 % que de igual forma se mantuvo prácticamente constante hasta el día 6, tal que su concentración final fue de 1.05 ± 0.01 mg/L. De esta forma, se pudo observar que la remoción de amonio y amoníaco varía según la concentración de CO₂ que se suministre: hubo una mayor remoción a 2 y 10 % y en último lugar a 0 % CO₂.

Figura 31. Cinéticas de remoción de amoníaco con *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 a diferentes concentraciones de CO₂.

En cuanto a la remoción de ortofosfatos (PO₄³⁻) se presenta la figura 32. La concentración inicial en el agua residual fue de 42 ± 0.01 mg/L. Con un flujo de aire y 0 % de CO₂ se removió el 74.42 ± 1.89 % desde el día 4 de cultivo, hasta alcanzar el 89.53 ± 0.79 % a los 20 días de cultivo, correspondiente a (4.50 ± 0.01) mg/L de concentración final. Con 2 % de CO₂ se removió el 53.49 ± 3.42 % desde el día 2 de cultivo y el 94.77 ± 2.85 %, a los 20 días de cultivo, lo que corresponde a una concentración final de (2.25 ± 1.06) mg/L. Finalmente, con 10 % de CO₂ se obtuvo el 41.86 ± 4.27 % de remoción de ortofosfatos en el primer día de cultivo; al día 20, su concentración fue de (17.0 ± 0.01) mg/L, correspondiente a 60.46 ± 2.91 % de remoción. La mayor remoción de ortofosfatos se alcanzó con 2 % de CO₂.

Figura 32. Cinéticas de remoción de fosfato con *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 a diferentes concentraciones de CO₂.

Aparentemente *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 removió con mayor rapidez los nitratos, respecto a otras fuentes de nitrógeno, sin importar la concentración de CO₂ que se le suministró. La preferencia de esta cepa por el nitrato es debido a su adaptación a la absorción de esta molécula que suele tomar de su medio convencional (Bold 3N modificado, anexo 11.8) en forma de nitrato de sodio (547 mg/L de NO₃-NaNO₃). Por otro lado, el N en forma de amonio y amoniaco fue más fácilmente asimilable por *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 en un cultivo con aireación con 2 % de CO₂ hasta un 100 ± 0.09 %, para ambos nutrientes. Esto también se observó con la eliminación de ortofosfatos, a un flujo de aire con 2 % se redujo 94.77 ± 2.85 %, como máxima remoción del nutriente. La cepa *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 suele asimilar hasta 59.79 mg/L de PO₄³⁻ en su medio convencional Bold 3N modificado ver anexo 11.7 (UTEX, 2017) a pH 7. Las remociones más altas se realizaron a 0 y 2 % CO₂ en que los valores de pH de los cultivos se mantuvieron más cercanos a 9 (ver figura 27), mientras que a 10 % el pH se mantuvo próximo a 8. Según el diagrama de predominio mostrado en la figura 33, el PO₄³⁻ se encontraba en mayor concentración a pH 9 que pH cercano a 8, por lo que se encontraba en mayor disponibilidad como fuente de fósforo para las microalgas.

$$[\text{NH}_3]_{\text{TOT}} = 0.13 \text{ mM}$$

$$[\text{NO}_3^-]_{\text{TOT}} = 64.50 \text{ } \mu\text{M}$$

$$[\text{PO}_4^{3-}]_{\text{TOT}} = 90.56 \text{ } \mu\text{M}$$

Figura 33. Logaritmo de la concentración de cada forma de los nutrientes presentes en el agua residual de la UAM-I en función del pH. Elaboración propia, con programa MEDUSA 1.0.

La concentración de nitrógeno total inicial fue de 22.27 ± 2.52 mg/L (figura 34), con un flujo de aire sin CO₂ la concentración final a los 20 días de cultivo de *Chlorella vulgaris* UTEX 2714, fue de 1.72 ± 0.01 mg/L, de manera que hubo un 92.28 ± 7.88 % de remoción; con 2 % de CO₂ en el flujo de aire, la concentración final fue de 0 ± 0.01 mg/L, o bien, 100 ± 1.65 % de remoción de NT. Finalmente, con un flujo de aire con 10 % de CO₂, la concentración final fue de 4.92 ± 0.42 mg/L, o bien se tuvo 89.22 ± 6.10 % de remoción. Se pudo observar que la mayor remoción de NT se logró con un flujo de aire con 0 y 2 % de CO₂, sin diferencia significativa tomando en cuenta sus incertidumbres.

En cuanto al fósforo total, se inició con una concentración de 13.69 ± 0.01 mg/L (figura 35). Cuando a *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 se le suministró un flujo de aire sin CO₂ la concentración final a los 20 días de cultivo fue de 2.50 ± 0.01 mg/L, correspondiente a 81.74 ± 0.08 % de remoción; con un flujo de aire mezclado con 2 % de CO₂, la concentración final fue de 1.50 ± 0.01 mg/L, con lo que hubo 89.04 ± 0.08 % de remoción de PT. Con 10 % de CO₂, la concentración final de fósforo total fue de 3.50 ± 0.01 mg/L, correspondiente a 74.43 ± 0.08 % de remoción. En este caso la mayor remoción de PT se logró con un flujo de aire con 2 % CO₂.

Figura 34. Cinéticas de remoción de la concentración de nitrógeno total (NT) por *Chlorella vulgaris* UTEX 2714, cultivada a diferentes concentraciones de CO₂.

Figura 35. Cinéticas de remoción de la concentración de fósforo total (PT) por *Chlorella vulgaris* UTEX 2714, cultivada a diferentes concentraciones de CO₂.

La cepa *Chlorella vulgaris* UTEX 2714, tiene una alta capacidad de remoción de NT y PT, con aireación sin CO₂: 92.28 ± 7.88 % y 81.74 ± 0.08 %, respectivamente a los 20 días de cultivo. Gao et al. (2014) eliminaron N y P de agua residual municipal con 0.1 g/L de biomasa microalgal de *Chlorella vulgaris* (cercana a la concentración utilizada para el presente estudio, ver tabla 20) con aireación sin CO₂, las concentraciones iniciales fueron de 19.12 ± 0.52 mg/L de nitrógeno y 1.24 ± 0.12 mg/L de fósforo; la remoción a los 15 días de cultivo, fue de 42.1 y 91.94 %, respectivamente. Aunque la remoción de N fue mayor en el presente estudio, la de fósforo fue menor, esto se debe a las distintas concentraciones iniciales: 22.27 ± 2.52 mg/L de N y 13.69 ± 0.01 mg de P.

Su et al. (2012) adaptaron por un mes una cepa de *Chlorella vulgaris* en agua residual municipal (en el presente estudio fue de 4 meses ver cuadro 13, pág. 64), posteriormente obtuvieron una alta remoción (superior al 90 %) de N y P con 0.8 g/L de biomasa, a los 6 y 3 días de cultivo. Ellos concluyeron que la previa adaptación de las microalgas en el agua residual fue el principal mecanismo de remoción del N y P (tabla 20). Por otro lado, Bonchai et al. (2012) cultivaron *Chlorella vulgaris* (0.14 g/L) en agua residual de un efluente final de una planta de tratamiento de agua residual urbana, que contenía 29 mg/L de NT y 0.15 mg/L de PT; la remoción, a los 7 días de cultivo, fue del 70 y 80 %, respectivamente. Aunque el sistema tuvo aireación el flujo no contenía CO₂. Observaron que se redujo el N y P hasta 60 % en 2 días y concluyeron que, para mejorar la eliminación de N y P, se necesita un TRH (tiempo de retención hidráulica) adecuada. Por lo anterior, para una aplicación en planta de tratamiento éste es un parámetro de operación de los fotobiorreactores importante.

Mendez et al. (2016) eliminaron del agua residual urbana 94.48 % de 70.23 mg/L de N inicial y 93.1 % de 4.79 mg/L de P inicial con 0 % CO₂ en 11 días de cultivo, con 0.2 g/L de biomasa (*Chlorella vulgaris*) escala matraz Erlenmeyer de 500 mL. Los altos porcentajes de remoción, en este caso se deben no solo a la concentración inicial de N y P, sino también a la alta concentración de biomasa, aun así, el porcentaje de remoción de N eliminada en la PTAR de la UAM-I fue similar a la de Mendez et al. (tabla 20).

TABLA 20. Porcentaje de remoción de N y P en agua residual con *Chlorella vulgaris* de estudios reportados en la literatura.

ESPECIE	TIPO DE AGUA RESIDUAL	CONCENTRACIÓN DE INÓCULO INICIAL (g/L)	CO ₂ (%)	Tiempo de cultivo (días)	CONTAMINANTE	CONCENTRACIÓN INICIAL (mg/L)	REMOCIÓN (%)	REFERENCIA
<i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714	Doméstica (efluente reactor UASB UAM-I)	0.41 ± 0.53	0	20	N	22.27 ± 2.52	92.28 ± 7.88	Presente estudio, 2016
					P	13.69 ± 0.01	81.74 ± 0.08	
			2		N	22.27 ± 2.52	100 ± 1.65	
					P	13.69 ± 0.01	89.04 ± 0.08	
			10		N	22.27 ± 2.52	89.22 ±6.10	
					P	13.69 ± 0.01	74.43 ± 0.08	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Municipal	0.1	0	15	N	19.12 ± 0.52	42.1	Gao et al., 2014
					P	1.24 ± 0.12	91.94	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Municipal	0.8	0	6	N	26.4 ± 0.7	90.1	Su et al., 2012
				3	P	1:74 ± 0:12	96.9	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Urbana	0.14	0	7	N	29	70	Bonchai et al., 2012
					P	0.15	80	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Urbana	0.2	0	11	N	70.23	94.48	Mendez et al., 2016
					P	4.79	93.1	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Municipal	1	0.05	8	N	53.33	81.04	Choi & Lee, 2012
					P	11.3	96.9	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Acuicultivo	1	2	4	N	11.12	63.23	Velichkova et al., 2014
					P	3.6	41.66	
<i>Chlorella vulgaris</i> JSC-6	Porcina (1/5)	1.96	2.5	13	N	270	39.6	Wang et al., 2015
<i>Chlorella vulgaris</i>	Acuicultivo	0.025	ND	16	N	6.81	86.1	Gao et al., 2016
					P	0.42	82.7	

Cuando al cultivo de la cepa *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 se le suministró 2 % de CO₂ en aire se obtuvo: 100 ± 1.65 % y 89.04 ± 0.08 % de remoción de NT y PT a los 20 días de cultivo con una concentración de biomasa de 0.14 g/L. La remoción de N y P fue de hasta 10 % menor, respecto a lo obtenido por Choi et al. (2012) con 1 g/L de biomasa microalgal (*Chlorella vulgaris*) quienes con un flujo de aproximadamente 0.05 % CO₂, eliminaron 81.04 % de N y 96.9 % de P de agua residual municipal con 53.33 mg/L de N y 11.3 mg/L de P (como concentraciones iniciales, ver tabla 20). Consideraron que no se removieron los contaminantes al 100 % dada la baja concentración de biomasa que utilizaron en relación con la concentración de ortofosfatos, por lo que dicha relación mejoraría la eficiencia de remoción. Resulta interesante que las concentraciones iniciales de N y P fueron bastante similares al del presente estudio con el efluente de la UAM-I (concentraciones iniciales: 22.27 ± 2.52 mg/L de N y 13.69 ± 0.01 mg de P), en que además la concentración inicial de biomasa fue alrededor de 2 veces menor.

Velichkova et al. (2014) eliminaron N y P con *Chlorella vulgaris* (1 g/L) a escala matraz Erlenmeyer (500 mL) con 250 mL de agua residual de acuicultivo; fueron mantenidas a temperatura ambiente (25-27 °C) con iluminación artificial (luz fluorescente con un fotoperiodo luz: oscuridad de 12:12 h), utilizaron como fuente de carbono CO₂ (2 % v/v). Las concentraciones de N y P iniciales fueron 11.12 mg/L y 3.6 mg/L, respectivamente; los porcentajes de eliminación fueron a los 4 días de cultivo: 63.23 y 41.66 % de remoción, respectivamente (tabla 20). Estos valores de porcentaje de remoción son menores a los obtenidos en el presente estudio, en el cuál se eliminó 71.62 % de N que también supera el valor obtenido por Wang et al. (2015) quienes eliminaron N de agua residual porcina, con una alta concentración de DQO y nitrógeno amoniacal, que *Chlorella vulgaris* JSC-6 aprovechó para su crecimiento; la diluyeron 1:5 y se le suministró 2.5 % CO₂ al cultivo para realizar el tratamiento; se logró apenas un 39.6 % de remoción de N a los 13 días de cultivo.

Gao et al. (2016) utilizaron 0.025 g/L de biomasa microalgal de *Chlorella vulgaris* en agua residual de acuicultivo, CO₂ fue suministrado continuamente para mantener el pH a 6.8-7.0; los porcentajes de remoción a los 16 días de cultivo fueron de 86.1 % de N y 82.7 de P, las concentraciones iniciales fueron: 6.81 y 0.42 mg /L, respectivamente (tabla 20). El porcentaje de remoción de fósforo fue mayor y la remoción de nitrógeno fue similar (74.43 ± 0.08 % de P 89.22 ± 6.10 de N) comparado con los resultados con 10 % CO₂, obtenido en el presente

estudio, cuyo pH valorado fue de 8.5 ± 0.01 , por lo que posiblemente el porcentaje total de CO₂, pudo ser mayor al 10 %.

CONCLUSIONES

9. CONCLUSIONES

1. El medio Bold 3N modificado y las condiciones de cultivo del laboratorio (medio ajustado a pH 7, 26 °C, 570 lux y ciclos de luz-oscuridad 12:12 h) favorecieron más el crecimiento de *Chlorella vulgaris* UTEX 2714, respecto a *Chlorella vulgaris* UTEX 259 y *Chlorella protothecoides* UTEX 256, por lo que se logró realizar el escalamiento a botella de 1 L.
2. Los fertilizantes comerciales Vita ® y Folim ® resultaron aptos para pruebas como sustituto del medio de cultivo Bold 3N modificado (solubilidad a pH 7) a diferencia de: Scotts ®, Miracle-Gro ® y Fixa Fol ® los cuales formaron precipitado.
3. Con ambos fertilizantes evaluados como medio para *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 se observó un incremento en la densidad celular: Folim ® 2.3×10^7 cel/mL y Vita ® 5.6×10^6 cel/mL.
 - a) El fertilizante Folim ® fue adecuado como medio de cultivo para *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 ya que su crecimiento celular fue similar (986 %) al observado en el medio Bold 3N modificado (1112 %). El crecimiento en el fertilizante Vita ® (259 %) fue mucho menor.
4. El efluente del reactor UASB de la PTAR de la UAM-I tuvo:
 - a) Condiciones idóneas de temperatura y pH como medio de cultivo para *Chlorella* sp.; 24 °C y pH 7.67.
 - b) Nitrógeno en forma de iones, disponibles para su remoción: 40.3 mg/L de NH₄⁺, 34.7 mg/L de NO₃⁻ y 775.8 mg/L de NO₂⁻ y fósforo en una concentración de 254.2 mg/L de PO₄³⁻ asimilable para las microalgas. La relación de N a P fue de (6:1).
5. *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 logró adaptarse al agua residual doméstica desde escala matraz Erlenmeyer 250 mL (inóculo 50 %).
6. El CO₂ influyó en el pH del medio de cultivo, entre mayor porcentaje de CO₂ se le suministre, mayor ácido carbónico se produce y obviamente una mayor acidificación es observable.
7. El CO₂ influyó en el crecimiento de *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 en agua residual doméstica, siendo mayor con 0 y 2 % y desfavorable con 10 % de CO₂.

8. En este estudio se demostró que *Chlorella vulgaris* UTEX 2714, mantenida en medio Bold 3N modificada y adaptada posteriormente a agua residual doméstica de la UAM-I; tiene preferencia y potencial para eliminar el nitrato: 100 ± 0.05 % de remoción, sin importar el flujo de CO₂ suministrado, al primer día de cultivo.

9. En cuanto al nitrógeno en forma de amonio y amoniaco es más asimilable por *Chlorella vulgaris* UTEX 2714.

10. Fue mayor la remoción de ortofosfatos por *Chlorella vulgaris* UTEX 2714, con un flujo de aire de 2 % que con 0 y 10 % de CO₂.

11. La remoción de N total por *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 fue mayor con 0 y 2 % de CO₂.

12. La remoción de P total por *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 fue mayor con 2 % CO₂.

Finalmente se concluye que, de los fertilizantes evaluados, el fertilizante comercial Folim® es un medio de cultivo idóneo para *Chlorella vulgaris* UTEX 2714, que sustituye al convencional proporcionándole los nutrientes necesarios para tener una mayor densidad celular y un mayor contenido de lípidos. En cuanto al efecto del CO₂, *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 es capaz de crecer en agua residual con un flujo de 0 y 2 % de CO₂, a 10 % resulta desfavorable para la microalga. La remoción de nitrógeno total y fósforo total del agua residual de la UAM Iztapalapa, por *Chlorella vulgaris* UTEX 2714, no es inhibida en presencia del CO₂. Por lo anterior, de las dos concentraciones de CO₂ evaluadas en éste estudio, a 2 % resulta ser la mejor para acoplar la eliminación de nutrientes y la mitigación de CO₂.

REFERENCIAS

10. REFERENCIAS

ARTÍCULOS:

Abdel-Raouf, N.; Al-Homaidan, A. A. & Ibraheem, I. B. M. (2012) "Microalgae and wastewater treatment". Saudi Journal of Biological Sciences, 19: 257–275 pp.

Abinandan, A. & Shanthakumar, S. (2015) "Challenges and opportunities in application of microalgae (*Chlorophyta*) for wastewater treatment: A review". Renewable and Sustainable Energy Reviews, 52: 123–132 pp.

Abou-Shanab, R. A. I.; Ji, M.; Kim, H.; Paeng, K. & Jeon, B. (2013) "Microalgal species growing on piggery wastewater as a valuable candidate for nutrient removal and biodiesel production". Journal of Environmental Management, 115: 257–264 pp.

Abreu, A. P.; Fernandes, B.; Vicente, A. A. & Giuliano Dragone, J. T. (2012) "Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbón source". Bioresource Technology, 118: 61–66 pp.

Amin, S. (2009) "Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae". Energy conversion and management, 50 (7): 1834-1840 pp.

Angelakis, A. N.; Marecos Do Monte, M. H. F.; Bontoux, L. & Asano T. (1999) "The status of wastewater reuse practice in the Mediterranean basin: need for guidelines". Water Research, 33 (10): 2201–2217 pp.

Barghbani, R.; Rezaei, K. & Javanshir, A. (2012) "Investigating the effects of several parameters on the growth of *Chlorella vulgaris* using Taguchi's experimental approach". International Journal of Biotechnology for Wellness Industries, 1: 128-133 pp.

Bittencourt Sydney, E.; Sturm, W.; Carvalho, J. C.; Thomaz-Soccol, V.; Larroche, C.; Pandey, A. & Soccol, C. R. (2010) "Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae". Bioresource Technology, 101: 5892–5896 pp.

- Bonchai**, R.; Tae Seo, G.; Rang Park, D. & Yeol Seong, C. (2012) "Microalgae photobioreactor for nitrogen and phosphorus removal from wastewater of sewage treatment plant". International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics, 2 (6): 407-410 pp.
- Bouwer**, E. J. & Zehnder, A. J. B. (1993) "Bioremediation of organic compounds putting microbial metabolism to work". Trends in Biotechnology, 11: 287-318 pp.
- Brennan**, L. & Owende, P. (2010) "Biofuels from microalgae – a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products". Renewable & Sustainable Energy Reviews, 14: 557–577 pp.
- Cabanelas**, I. T. D.; Ruiz, J.; Arbib, Z.; Chinalia, F. A.; Garrido-Perez, C.; Rogalla, F.; Nascimento, I. A. & Perales, J. A. (2013) "Comparing the use of different domestic wastewaters for coupling microalgal production and nutrient removal". Bioresource Technology, 131: 429–436 pp.
- Castañeda Villanueva**, A. A. & Flores López, H. E. (2013) "Tratamiento de aguas residuales domésticas mediante plantas macrófitas típicas en Los Altos de Jalisco, México". Revista de Tecnología y Sociedad, Innovación y difusión de la tecnología, 3 (5): 2007-3607 pp.
- Caziñares**, R. O.; Rivas, L.; Montes, C.; Domínguez, A. R.; Travieso, L. & Benitez, F. (1994) "Aerated swine-wastewater treatment with K-Carrageenan-Immobilized *Spirulina máxima*". Bioresource Technology, 47: 89-91 pp.
- Celis Hidalgo**, J.; Jutnod Montano, J. & Sandoval Estrada M. (2005) "Recientes aplicaciones de la depuración de aguas residuales con plantas acuáticas". Theoria, 14 (1): 17-25 pp.
- Cetinkaya Donmez**, G.; Azku, Z.; Ozturk, A. & Kutzal, T. (1999) "A comparative study on heavy metal biosorption characteristics of some algae". Process Biochemistry, 34: 885–892 pp.
- Chen**, Y. H. & Walker, T. H. (2011) "Biomass and lipid production of heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides* by using biodiesel-derived crude glycerol". Biotechnology Letters, 33: 1973–1983 pp.
- Cho**, S.; Lee, N.; Park, S.; Yu, J.; Luong, T. T.; Oh, Y. & Lee, T. (2013) "Microalgae cultivation for bioenergy production using wastewaters from a municipal WWTP as nutritional sources". Bioresource Technology, 13: 515–520 pp.

- Choi, H.-J. & Lee, S.-M.** (2012) "Effects of microalgae on the removal of nutrients from wastewater: various concentrations of *Chlorella vulgaris*". *Environmental Engineering Research*, 17 (S1): S3-S8 pp.
- Converti, A.; Casazza, A. A.; Ortiz, E. Y.; Perego, P. & Del Borghi, M.** (2009) "Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production". *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48: 1146–1151 pp.
- Davis, T. A.; Volesky, B. & Mucci, A.** (2003) "A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae". *Water Research*, 37: 4311–4330 pp.
- Del Campo, J. A.; García, M. & Guerrero, M. G.** (2007). "Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74 (6): 1163-1174 pp.
- Denmead, O. T. & Shaw, R. H.** (1960) "The effects of soil moisture stress at different stages of growth on the development and yield of corn". *Agronomy Journal*, 52: 272-274 pp.
- Dinesh Kumar, S.; Santhanam, P.; Jayalakshmi, T.; Nandakumar, R.; Ananth, S.; ShenbagaDevi, A. & Balaji Prasath, B.** (2015) "Excessive nutrients and heavy metals removal from diverse wastewaters using marine microalga *Chlorella marina* (Butcher)". *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 44 (1): 97-103 pp.
- Dominic, V. J.; Soumya M. & Nisha M. C.** (2009) "Phycoremediation efficiency of three microalgae *Chlorella vulgaris*, *Synechocystis salina* and *Gloeocapsa gelatinosa*". *Academic Review*, 16 (1 & 2 SB): 138-146 pp.
- Edwards, P.** (1981) "The harvest of microalgae from the effluent of a sewage feed high rate stabilization pond by *Tilapia nilotica*. Part. 2 Studies of the fish ponds". *Aquaculture*, 23 (1-4): 107-147 pp.
- Eriksen, N. T.** (2008). "The technology of microalgal culturing". *Biotechnology Letters*, 30 (9): 1525-1536 pp.

- Farooq, W.;** Lee, Y. C.; Ryu, B.G.; Kim, B. H.; Kim, H. S.; Choi, Y. E. & Yang, J. W. (2013) "Two-stage cultivation of two *Chlorella* sp. strains by simultaneous treatment of brewery wastewater and maximizing lipid productivity". *Bioresource Technology*, 132: 230–238 pp.
- Fadeyi, O.;** Dzantor, K. & Adeleke, E. (2016) "Assessment of biomass productivities of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* in defined media and municipal wastewater at varying concentration of nitrogen". *Journal of Water Resource and Protection*, 8: 217-225 pp.
- Fon Sing, S.;** Isdepsky, A.; Borowitzka, M. A. & Reza Moheimani, N. (2011) "Production of biofuels from microalgae". *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 18: 47-72 pp.
- Frampton, D. M. F.;** Gurney, R. H.; Dunstan, G. A.; Clementson, L. A.; Toifl, M. C.; Pollard, C. B.; Burn, S.; Jameson, L. D. & Blackburn, S. I. (2013) "Evaluation of growth, nutrient utilization and production of bioproducts by a wastewater-isolated microalga". *Bioresource Technology*, 130: 261–268 pp.
- Gantar, M.;** Obreht Z. & Dalmacija, B. (1991) "Nutrient removal and algal succession during the growth of *Spirulina platensis* and *Scenedesmus quadricauda* on swine wastewater". *Bioresource Technology*, 36: 167-171 pp.
- Gao, F.;** Yang, Z.; Li, C.; Wang, Y.; Jin, W. & Deng, Y. (2014) "Concentrated microalgae cultivation in treated sewage y membrane photobioreactor operated in batch flow mode". *Bioresource Technology*, 167: 441-446 pp.
- Gekeler, W.;** Grill, E.; Winnacker, E. & Zenk M. H. (1988) "Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes". *Archives of Microbiology*, 150 (2): 197-202 pp.
- Gomez Luna, L. M.** (2007) "Microalgas aspectos ecológicos y biotecnológicos" *Revista Cubana de Química*, 19(2): 1-20 pp.
- González, L. E.;** Caziñares, R. O. & Baena S. (1997) "Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorfus*". *Bioresource Technology*, 60:259-262 pp.
- Gris, B.;** Sforza E.; Vecchiato, L. & Beturco, A. (2014) "Development of a process for an efficient exploitation de CO₂ captured from flue gases as liquid carbonales for *Chlorella protothecoides* cultivation". *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 53: 16678-16688 pp.

Grobelaar, J. U. (1991) "The influence of light/dark cycles in mixed algal cultures on their productivity". *Bioresource Technology*, 38: 189-194 pp.

Hernández-Pérez, A. & Labé, J. (2014) "Microalgas, cultivo y beneficios". *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49 (2): 157-173 pp.

Hirata, S.; Hayashitani, M.; Taya, M. & Tone, S. (1996) "Carbon dioxide fixation in batch culture of *Chlorella* sp. using a photobioreactor with a sunlight-collection device". *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 81 (5): 470–472 pp.

Ho, S.-H.; Chen, C.-Y.; Lee, D.-J. & Chang, J.-S. (2011). "Perspectives on microalgal CO₂ –emission mitigation systems". — A review. *Biotechnology Advances*, 29 (2): 189-198 pp.

Jannsen, M.; Kuijpers, T.; Veldhoen, B.; Ternbach, M.; Tramper, J.; Mur, L. & Wijffels, R. (1999) "Specific growth rate of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella sorokiniana* under medium duration light/dark cycles". *Journal of Biotechnology*, 70: 323-333 pp.

Jeong, M. L.; Gillis, J. M. & Hwang, J.-Y. (2003) "Carbon dioxide mitigation by microalgal photosynthesis" *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 24 (12): 1763-1766 pp.

Ji, M.; Abou-Shanab, R. A. I.; Kim, S.; Salama, E.; Lee, S.; Kabra, A. N.; Lee, Y.; Hong, S. & Jeon, B. (2013) "Cultivation of microalgae species in tertiary municipal wastewater supplemented with CO₂ for nutrient removal and biomass production". *Ecological Engineering*, 58: 142–148 pp.

Johnson, E. T. & Schmidt-Dannert, C. (2008) "Light-energy conversion in engineered microorganisms". *Trends in Biotechnology*, 26 (12): 682-689 pp.

Katsuda, T.; Shimahara, K.; Shiraishi, H.; Yamagami, K.; Ranjbar, R. & Katoh, S. (2006) "Effect of flashing light from blue light emitting diodes on cell growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis*". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102 (5): 442-446 pp.

Kunjapur, A. M. & Eldridge, R. B. (2010). "Photobioreactor design for commercial biofuel production from microalgae". *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 49(8): 3516–3526 pp.

Lau, P. S.; Tam, N. F. Y. & Wong, Y. S. (1995) "Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater". *Environmental pollution*, 89:59-66 pp.

- Laws**, E. A.; Terry, K. L.; Wickman, J. & Chalup, M.S. (1983) "A simple algal production system designed to utilize the flashing light effect". *Biotechnology and Bioengineering*, 25: 2319-2335 pp.
- Li**, C.; Yang, H.; Xia, X.; Li, Y.; Chen, L.; Zhang, M.; Zhang, L. & Wang, W. (2013) "High efficient treatment of citric acid effluent by *Chlorella vulgaris* and potential biomass utilization". *Bioresource Technology*, 127: 248–55 pp.
- Li**, Y.; Zhou, W.; Hu, B.; Min, M.; Chen, P. & Ruan, R. (2011) "Integration of algae cultivation as biodiesel production feedstock with municipal wastewater treatment: strains screening and significance evaluation of environmental factors". *Bioresource Technology*, 102: 10861–10867 pp.
- Liang**, Y.; Sarkany, N. & Cui, Y. (2009) "Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions". *Biotechnology Letters*, 31 (7): 1043-1049 pp.
- Liu**, Z. Y.; Wang, G. C. & Zhou, B. C. (2008) "Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*". *Bioresource Technology*, 99: 4717–4722 pp.
- Lizzul**, A. M.; Hellier, P.; Purton, S.; Baganz, F.; Ladommatos, N. & Campos, L. (2014) "Combined remediation and lipid production using *Chlorella sorokiniana* grown on wastewater and exhaust gases". *Bioresource Technology*, 151: 12–18 pp.
- Lv**, J. M.; Cheng, L. H.; Xu, X. H.; Zhang, L. & Chen, H. L. (2010) "Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions". *Bioresource Technology*, 101:6797–6804 pp.
- Marchello**, A. E.; Lombardi, A. T.; Dellamano-Oliveira, M. J. & Souza, S. D. O. (2015) "Microalgae population dynamics in photobioreactors with secondary sewage effluent as culture medium". *Brazilian Journal of Microbiology*, 46 (1): 75–84 pp.
- Mata**, T. M.; Melo, A. C.; Simoes, M. & Caetano, N.S. (2012) "Parametric study of a brewery effluent treatment by microalgae *Scenedesmus obliquus*". *Bioresource Technology*, 107:151–158 pp.
- Matthijs**, H. C. P.; Balke, H.; Van Hes, U. M.; Kroon, B. M. A.; Mur, L. R. & Binot, R. (1996) "Application of light-emitting diodes in bioreactors: flashing light effects and energy economy in algal culture *Chlorella pyrenoidosa*". *Biotechnology and Bioengineering*, 50: 98-107 pp.

- Mendez, L.;** Sialve, B.; Tomás-Pejó, E.; Ballesteros, M.; Steyer, J. P. & González-Fernández, C. (2016) "Comparison of *Chlorella vulgaris* and *cianobacteria* biomass: cultivation in urban wastewater and methane production". *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39: 703-712 pp.
- Mezzomo, N.;** Saggiorato, A. G.; Siebert, R.; Tatsch, P. O.; Lago, M. C.; Hemkemeier, M.; Costa, J. A. V.; Bertolin, T. E. & Colla, L. M. (2010) "Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospiraplatensis*) from biological treatment of swine wastewater". *Ciência e Tecnologia de Alimentos Campinas*, 30 (1): 173-178 pp.
- Molina Grima, E.;** Acien Fernandez, F. G.; Garcia Camacho, F.; Camacho Rubio, F. & Chisti, Y. (2000) "Scale-up of tubular photobioreactors". *Journal of Applied Physiology*, 12: 355-368 pp.
- Morris, I. & Syrett, P. J.** (1965) "The effect of nitrogen starvation on the activity of nitrate reductase and other enzymes in *Chlorella*". *Journal of General and Applied Microbiology*, 38: 21–28 pp.
- O’Grady, J. & Morgan J.** (2010) "Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol". *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34 (1): 121-125 pp.
- Park, J.;** Craggs, R. & Shilton, A. (2011) "Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production". *Bioresource Technology*, 102:35-42 pp.
- Park, K. H. & Lee, C. G.** (2000) "Optimization of algal photobioreactors using flashing lights". *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 5: 186-190 pp.
- Pribyl, P.;** Cepak, V. & Zachleder, V. (2012) "Production of lipids in 10 strains of *Chlorella* and *Parachlorella*, and enhanced lipid productivity in *Chlorella vulgaris*". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94: 549–561 pp.
- Přibyl, P.;** Cepák, V. & Zachleder, V. (2013) "Production of lipids and formation and mobilization of lipid bodies in *Chlorella vulgaris*". *Journal of Applied Phycology*, 25: 545–553 pp.
- Powell, N.;** Shilton, A.; Pratt, S. & Chisti, Y. (2011) "Luxury uptake of phosphorus by microalgae in full-scale waste stabilisation ponds". *Water Science & Technology*, 63 (4): 704-709 pp.
- Randall, C. W.;** Patarkine, V. M. & McClintock S. A. (1992) "Nitrification kinetics in single sludge biological nutrients removal activated sludge system". *Water Science & Technology*, 25 (6): 195-214 pp.

- Renuka**, N.; Sood, A.; Prasanna, R. & Ahluwalia, A. S. (2015) "Phycoremediation of wastewaters: a synergistic approach using microalgae for bioremediation and biomass generation". International Journal of Environmental Science and Technology, 12: 1443–1460 pp.
- Richmond**, A.; Boussiba, S.; Vonshak, A. & Kopel, R. (1993) "A new tubular reactor for mass production of microalgae outdoors". Journal of Applied Phycology, 5: 327–332 pp.
- Rodolfi**, L.; Zittelli, G. C.; Bassi, N.; Padovani, G.; Biondi, N.; Bonini, G. & Tredici, M. R. (2009) "Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor". Biotechnology and Bioengineering, 102: 101–112 pp.
- Romera**, E.; González, F.; Ballester, A.; Blázquez, M. L. & Muñoz J. A. (2007) "Comparative study of biosorption of heavy metals using different types of algae". Bioresource Technology, 98: 3344–3353 pp.
- Safi**, C.; Zebib, B.; Merah, O.; Pontalier, P. & Vaca-Garcia, C. (2014) "Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review". Renewable and Sustainable Energy Reviews, 35: 265–278 pp.
- Saha**, A.; Saha, N.; Liang-Lian, J.; Zhao, J.; Gregáň, F.; Sajadi, S.; Song, B. & Sigel, H. (1996) "Stability of metal ion complexes formed with methyl phosphate and hydrogen phosphate". Journal of Biological Inorganic Chemistry, 1: 231-238 pp.
- Salazar González**, M. (2006) "Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales". ContactoS 59, 64-70 pp.
- Salazar González**, M. (2009) "Sistemas integrales de tratamiento de aguas residuales, mediante el uso combinado de digestión aerobia y microalgas". ContactoS 73, 16-22 pp.
- Samori**, G.; Samor, C.; Guerrini, F. & Pistocchi, R. (2013) "Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a batch culture system in view of urban wastewater treatment: part I". Water Research, 47: 791–801 pp.
- Schrader**, L. E. & Hageman, R. H. (1967) "Regulation of nitrate reductase activity in corn (*Zea mays* L.) seedlings by endogenous metabolites" Plant Physiology, 42: 1750-1756 pp.

- Shammas, N.** (1986) "Interactions of temperature, pH and biomass on the nitrification process". Journal Water Pollution Control Federation, 58 (52): 52-59 pp.
- Shire, D. M. & Kustka, A. B.** (2015) "Luxury uptake, iron storage and ferritin abundance in *Prochlorococcus marinus* (Synechococcales) strain MED4". Phycologia, 54 (4): 398-406 pp.
- Sialve, B.; Bernet, N. & Bernard O.** (2009) "Anaerobic digestión of micralgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable". Biotechnology Advances, 27 (4):409-416 pp.
- Singh, A.; Singh Nigam, P. & Murphy, J. D.** (2011). "Mechanism and challenges in commercialisation of algal biofuels". Bioresource Technology, 102 (1): 26-34 pp.
- Singh, S. P. & Singh, P.** (2014) "Effect of CO₂ concentration on algal growth: A review". Renewable and Sustainable Energy Reviews, Volume 38: 172–179 pp.
- Su, Y.; Mennerich, A. & Urban, B.** (2012) "Comparison of nutrient removal capacity and biomass settleability of four high-potential microalgal species". Bioresource Technology, 124: 157–162 pp.
- Su, Y.; Mennerich, A. & Urban, B.** (2012') "Coupled nutrient removal and biomass production with mixed algal culture: Impact of biotic and abiotic factors". Bioresource Technology, 118: 469–476 pp.
- Suh, I. S. & Lee, C. G.** (2003) "Photobioreactor engineering: design and performance". Biotechnology and Bioprocess Engineering, 8 (6): 313-321 pp.
- Taziki, M.; Ahmadzadeh, H. & Murry, M. A.** (2015) "Growth of *Chlorella vulgaris* in high concentrations of nitrate and nitrite for wastewater treatment". Current Biotechnology, 4 (4): 441-447 pp.
- Tom, N. F. Y. & Wong, Y. S.** (1989) "Wastewater nutrient removal by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus* sp.". Enviromental pollution, 58: 19-34 pp.
- Tripathi, B. D. & Shukla, S. C.** (1991) "Biological treatment of wastewater by selected aquatic plants". Enviromental Pollution, 69 (1): 69-78 pp.
- Ugwu, C., Aoyagi, H. & Uchiyama, H.** (2008). "Photobioreactors for mass cultivation of algae". Bioresource Technology, 99 (10): 4021-4028 pp.

Velichkova, K.; Sirakov, I. & Stoyanova, S. (2014) "Biomass production and wastewater treatment from aquaculture with *Chlorella vulgaris* under different carbon sources". Scientific Bulletin Biotechnology : Series F, 18 (ISSN 2285-1364): 83-90 pp.

Vera, A.; Yépez, M.; Martinez, M. & León de Pinto, G. (2002) "Crecimiento mixotrófico de *Chlorella* sp. cultivada en medios enriquecidos con el exudado gumoso de Acacia tortuosa" CENIC Ciencias Biológicas, 33 (1): 19-22 pp.

Vidali, M. (2001) "Bioremediation: An overview". Pure Applied Chemistry, 73: 1163-1172 pp.

Voltoлина, D. B.; Cordero, M.; Niveves, M. & Soto, L. P. (1998) "Growth of *Scenedesmus* sp. in artificial wastewater". Bioresource Technology, 68: 265-268 pp.

Walsh, P. & Legendre, L. (1988) "Photosynthetic responses of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* to high frequency light fluctuations simulating those induced by sea surface waves". Journal of Plankton Research, 10 (5): 1077-1082 pp.

Wang, H.; Xiong, H.; Hui, Z. & Zeng, X. (2012) "Mixotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* with diluted primary piggery wastewater to produce lipids". Bioresource Technology, 104: 215–220 pp.

Wang, Y.; Guo, W.; Yen, W.; Ho, S.; Lo, Y.; Cheng, C.; Ren, N. & Chang, J. (2015) "Cultivation of *Chlorella vulgaris* JSC-6 with swine wastewater for simultaneous nutrient/COD removal and carbohydrate production". Bioresource Technology, 198: 619–625 pp.

Widjaja, A.; Chien, C.-C. & Ju, Y.-H. (2009) "Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*". Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 40: 13–20 pp.

Yoshimoto, N.; Sato, T.; Kondo, Y. (2005) "Dynamic discrete model of flashing light effect in photosynthesis of microalgae". Journal of Applied Physiology, 17: 207-214 pp.

LIBROS Y PUBLICACIONES:

Allende, A. V. (1976) "Apuntes sobre química del agua". Editorial Instituto Superior Politécnico José Antonio Echeverría Habana, Cuba; 105-140 pp.

- Arredondo-Vega**, B. O. & Voltolina, D. (2007) "Capítulo 2: Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento". En: Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Network Research Gate, México; 21-29 pp.
- Baird**, C. (2013) "Capítulo 4. El efecto invernadero y el calentamiento global". En: Química Ambiental. Editorial Reverté, España; 178-225 pp.
- Barsanti**, L. & Gualtieri, P. (2006). "Algae anatomy". En: Biochemistry and Biotechnology. Editorial Taylor & Francis Group, New York; 320 pp.
- Bloom**, Benjamin S. (Ed.) (1956) "Taxonomy of educational objectives: The classification of educational goals: Handbook I, cognitive domain" Editorial Longmans, Green & Co, New York; 207 pp.
- Borowitzka**, M. A.; Beraldall, J. & Raven, J. A. (2016) "The physiology of microalgae" Editorial Springer International Publishing, Suiza; 673 pp.
- CONAGUA**, Comisión Nacional del Agua. (2011) "Estadísticas del agua en México" Editorial SEMARNAT, México. 184 pp.
- Davis**, M. & Cornwell, D. (1991) "Introduction to environmental engineering". 2da. Edición Editorial McGraw Hill International, Singapore; 7-39 pp.
- Drapcho**, C. M.; Nhuan, N. P. & Walker, T. H. (2008) "Biofuels engineering process technology (Vol. II)". Editorial McGraw Hill International, New York; 371 pp.
- Droste**, R. L. (1997) "Theory and practice of water and wastewater treatment". Editorial John Wiley and Sons Ltd, New York; 622-629 pp.
- Eilbeck**, W. J. & Mattock, G. (1987) "Chemical processes in waste water treatment". Editorial Ellis Horwood, New York; 38-89 pp.
- EPA** (1998) "Test methods for *Escherichia coli* in drinking water". En: Research and Development, Editorial United States Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio; 1104 pp.
- Grady**, L. & Lim, H. (1980) "Biological wastewater treatment: theory and applications (Vol. 12)". Editorial Marcel Dekker, Inc., New York; 963 pp.

- Guerrero, M.** (1991) "El Agua" Fondo de Cultura Económica, México; 168 pp.
- Habib, M. A.; Parvin, M; Huntington, T. C. & Hasan, M. R.** (2008). "A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish". Editorial Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy; 34 pp.
- Horan, N. J.** (1993) "Biological wastewater treatment systems: theory and operation". Editorial John Wiley and Sons Ltd, England; 310 pp.
- Johansen, M. N.** (2012) "Microalgae: biotechnology, microbiology and energy" Editorial Nova Science Publishers Inc., New York; 491 pp.
- Kelly, G.** (1998) "Enviromental engineering". Editorial McGraw Hill Internatinal, Singapore; 20-28 pp.
- MALGAS** (2013) "Aplicaciones de las microalgas: estado de la técnica". Editorial AST Ingeniería SL, Asturias; 72 pp.
- Massoud, M. A.; Tarhini, A. y Nasr, J. A.** (2009) "Decentralized approaches to wastewater treatment and management: Applicability in developing countries". Journal of Environmental Management, 90(1): 652-659 pp.
- Mueller, J. G.; Cerniglia, C. E. & Pritchard, P. H.** (1996) "Bioremediation of environments contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons". En: Bioremediation: Principles and Applications, Cambridge University Press, Cambridge, 125– 194 pp.
- Rivas, M.** (1978) "Tratamiento de Aguas residuales". Editorial Vega, Caracas; 147 pp.
- Romahlo, R. S.** (1991) "Tratamiento de aguas residuales". Editorial Reverté S. A., Barcelona; 691-707 pp.
- Santos, A. M.; Gonzalez-Arrechavala, Y. & Martín-Sastre, C.** (2014) "Usos aplicaciones y potenciales de las microalgas" Edición Enero-Febrero. Editorial Revista Anales de Mecánica y Electricidad, Madrid; 28 pp.
- Sprent, J.I. & Sprent, P.** (1990) "Nitrogen fixing organisms: pure and applied aspects". Editorial Chapman & Hall, London; 272 pp.

UNDESA, United Nations Economic & Social Affairs (2014) "Concise Report on the World Population Situation in 2014" United Nations, New York. 31 pp.

WWAP (Programa Mundial de Evaluación de los Recursos Hídricos de las Naciones Unidas). 2017. Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos 2017. Aguas residuales: El recurso desaprovechado. París, UNESCO. 184 pp.

Zaleha, K; Akbar, J; Lim Keng, C; Nur Farahiyah, Z. & Nur Hidayah, A. (2014) Chapter 4: "Sustainable technique for selected live feed culture" En: Sustainable Aquaculture Techniques edited by Martha Patricia Hernandez- Vergara and Carlos Ivan Perez-Rostro, ISBN 978-953-51-1224-2: 105-133 pp.

PÁGINAS DE INTERNET:

Salinas Gutiérrez, M. "Inaugura UAM reactores para tratamiento de aguas residuales de la Ciudad de México y Costa Maya" (Publicado el 18 de junio de 2007) [Última visita el: 3 de mayo de 2016]: <http://www.comunicacionsocial.uam.mx/boletines/anteriores07/indice/junio18-07-1.html>

UNICEF/OMS, Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia/Organización Mundial de la Salud. (2000) "Evaluación Mundial del Abastecimiento de Agua y el Saneamiento en 2000" [Última visita el: 14 de marzo de 2017]: [ww.who.int/water_sanitation_health/monitoring/jmp2000.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/monitoring/jmp2000.pdf)

UTEX, Culture Collection of Algae at University of Texas at Austin (2016) "Bold 3N Medium" (Publicado 2015) [Última visita el: 14 de marzo de 2017]: <https://utex.org/products/bold-3n-medium>

TESIS

Christenson, L. (2011) "Algal biofilm production and harvesting system for wastewater treatment with biofuels by products". All graduate theses and dissertations. Major Professor: Ronald Sims, Utah State University; 994 pp.

García Cubero, R. (2014) "Producción de biomasa de microalgas rica en carbohidratos acoplada a la eliminación fotosintética de CO₂". Tesis de doctorado. Directora: Dra. Mercedes García González. Universidad de Sevilla Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, 196 pp.

CONGRESOS:

Gaunt, J. & Lehmann, J., (2007) "Presentation at Power-Gen Renewable Energy and Fuels" from Plant to Power Plant (Las Vegas).

John, J. (2000) "A self-sustainable remediation system for acidic mine voids". En: 4th International conference of diffuse pollution. Bangkok, Thailand; 506–511 pp.

Rosch, C.; Skarka, J. & Patyk, A. (2009) "Microalgae- opportunities and challenges of an innovative energy source". 17th European Biomass Conference and exhibition. Hamburg, Germany; 1-7 pp.

Ruiz Dávila, C. E., Rodríguez de la Garza, J. A., Garza García, Y. & Ríos Gonzales, L. J. (2015) "Estudio sobre la acumulación lipídica en la biomasa de la cepa microalgal de *Chlorella vulgaris* mediante la exposición a distintas longitudes de onda" (IVC32) En Dr. Aguilar González (Presidencia) XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería SMBB. Congreso llevado a cabo en Guadalajara, Jalisco.

ANEXOS

11. ANEXOS

11.1 TAXONOMÍA DE LAS ESPECIES DE *Chlorella* sp.

Dominio	Eucariota
Reino	Plantae
Subreino	Viridiplantae
Filum	Clorofita
Clase	Trebouxiophyceaceae
Orden	Chlorellales
Familia	Chlorellaceae
Género	<i>Chlorella</i>
Especie	<i>Chlorella vulgaris</i> <i>Chlorella protothecoides</i>

11.2 MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS

Limpieza y asepsia de cristalería

1. Los tubos, matraces, botellas y kitastos se tallaron con escobillón de diferentes medidas y con detergente líquido
2. Se enjuagaron con abundante agua de la llave hasta retirar por completo el detergente
3. Se llenaron con agua y 1 o 2 gotas de hipoclorito (comercial Cloralex®), y se dejaron reposar por 24 horas
4. Posteriormente se enjuagaron con abundante agua de la llave y con agua destilada
5. Se esterilizaron vacíos (en bolsas de plástico especiales para esterilización) en autoclave eléctrica JIBIMED® YX-18LM a 0.14 MPa y 126 °C por 20 min, para asegurar la asepsia

Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo para todas las cepas fue Bold 3N modificado; se prepararon 6 soluciones stock de macronutrientes (200 mL de cada una)

1. Se pesó 5 g de nitrato de sodio (NaNO₃) en una charola de aluminio en balanza analítica
2. Se agregó a un vaso de precipitado con 50 mL de agua destilada y un agitador magnético

3. Se mantuvo en agitación constante hasta su completa disolución
4. Se aforó a 200 mL con agua destilada
5. Se reservó en un frasco, etiquetado y se mantuvo en refrigeración (a -2 °C)
6. Con el mismo procedimiento se prepararon los demás macronutrientes según su respectivo peso (todas aforadas a 200 mL):

Macronutrientes:	Peso* (g):
NaNO ₃	5.0
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.5
K ₂ HPO ₄	1.5
KH ₂ PO ₄	3.5
NaCl	0.5

*Para 200 mL

7. Una vez preparadas las soluciones stock, se preparó el medio de cultivo; para esto se agregó a un matraz aforado (con capacidad de 1 L), por medio de una probeta de 100 mL, los siguientes volúmenes de cada solución stock:

Volumen (mL):	Solución stock:
30	NaNO ₃
10	CaCl ₂ · 2H ₂ O
10	MgSO ₄ · 7H ₂ O
10	K ₂ HPO ₄
10	KH ₂ PO ₄
10	NaCl

8. Se aforó a 1 L con agua destilada
9. Se reservó en una botella, etiquetada y se mantuvo en refrigeración (a -2 °C)

NOTA: Se revisó constantemente el medio de cultivo y cada solución refrigerada; si se observó precipitado o contaminación física, se desechó y se preparó nuevamente.

Esterilización en autoclave JIBIMED® Modelo YX-18LM

1. Se llenó la autoclave con aproximadamente 3 L de agua destilada o hasta que se cubrió la base de la resistencia (calentador eléctrico)
2. Se colocó la cubeta de acero inoxidable y se introdujo el material a esterilizar dentro de la cubeta

NOTA: El material se envolvió en papel aluminio y dentro de bolsas especiales para esterilización, al material de cristal como tubos y botellas se les esterilizó con sus respectivos tapones de rosca y sin

enroscar totalmente, se les cubrió con aluminio solo la parte del tapón y dentro de bolsas especiales para esterilización. A los kitazatos se les diseñó tapones de gaza y algodón

3. Se colocó la tapa, cuidando que la manguera de la válvula automática quedase dentro de su espacio asignado en la cubeta y que la forma de la tapa coincidiera con cada tornillo de seguridad

4. Se aseguró cada tornillo de la tapa, en par y con su opuesto, y se atornilló con una llave (especial para la autoclave)

NOTA: La válvula manual debe estar abierta y la válvula automática SIEMPRE cerrada

5. Se enchufó la autoclave, a partir de este punto la autoclave comienza a calentarse

6. Una vez que la válvula manual liberó vapor, ésta se cerró manualmente con PRECAUCIÓN de no quemarse (para lo que se usó una franela o un guante para alta temperatura); y se cronometró el tiempo

NOTA: Ambas válvulas deben estar cerradas

7. Pasados los 20 minutos, se desenchufó la autoclave

8. La autoclave se enfrió después de aproximadamente 2 horas. Se abrió la válvula manual y se desatornilló la tapa, cada tornillo en par y con su opuesto (con la llave especial)

9. Se sacó el material con PRECAUCIÓN si aún seguía caliente

10. Material que se esterilizó para cada replica o cepa a duplicar:

a. Dos tubos de 20 mL de capacidad, con 10 mL de medio Bold 3N modificado, estos se taparon “ligera” con su tapón de rosca, sobre el cual se colocó un capuchón de papel de aluminio; y se depositaron dentro de una bolsa especial para esterilización

b. Tapones para tubo de repuesto, se envolvieron individualmente en papel de aluminio, dentro de una bolsa especial para esterilización

11. Material que se esterilizó para escalar de tubo a matraz de 125 mL por cepa:

a. Matraz Erlenmeyer (con capacidad de 125 mL) con 20 mL de medio Bold 3N modificado con tapón de algodón y gaza a la medida de la boca del matraz, con capuchón de papel aluminio y en bolsa para esterilización

b. Tapones de algodón extra (al menos 2), también envueltos en forma individual en papel aluminio y en bolsa aparte, especial para esterilización

12. Material que se esterilizó para escalar de matraz de 125 mL o 250 mL, por cada cepa y/o matraz:

- a. Matraz Erlenmeyer (con capacidad de 250 mL) con 100 mL de medio Bold 3N modificado, con tapón de algodón y gasa, con capuchón de papel aluminio y dentro de una bolsa especial para esterilización
- b. Tapones de algodón extra (al menos dos) envueltos en papel aluminio (de forma individual) y dentro de una bolsa especial para esterilización

13. Material que se esterilizó para escalar de matraz de 250 mL a botella de un litro con sistema de aireación:

- a. Botella serológica (con capacidad de 1 L), con 200 mL de medio Bold 3N modificado, con su tapón de rosca (enroscado ligeramente), con un capuchón de papel aluminio y dentro de una bolsa especial para esterilización
- b. Al menos dos tapones de gasa y algodón, al tamaño de la boca de la botella, envueltos por separado con papel de aluminio y en una bolsa especial para esterilizar
- c. Sistema de aireación en 4 fracciones, envueltas en papel de aluminio: 1) manguera de la bomba al matraz Kitasato (junto con el filtro), 2) manguera del matraz Kitasato a la botella del cultivo, 3) tapón de goma con tubo de cristal (para el matraz Kitasato), y 4) matraz Kitasato (de capacidad de 500 mL), con 500 mL de agua destilada, con tapón de algodón a su medida, capuchón de papel de aluminio, cada fracción en bolsa especial para esterilización

NOTA: Las bolsas siempre se cerraron y ataron con doble nudo para evitar que se introdujera vapor en ella y se humedeciera o contaminara el material durante la esterilización.

Propagación de las cepas del género *Chlorella* sp.

- 1. Se mantuvieron dos tubos, por cada cepa (20 mL) a condiciones controladas: 26 °C, 56 lux, ciclos de luz-oscuridad 12:12 horas y agitación manual 2 veces por día
- 2. Se reservó uno para su exclusiva conservación y otro para su propagación y uso
- 3. Para su propagación se replicó (o duplicó) en otro tubo de 20 mL de capacidad, con 10 mL de Bold 3N modificado (esterilizado en autoclave eléctrica JIBIMED® YX-18LM) y 50 % de inóculo en Campana de flujo laminar IF® Modelo CFV60
- 4. Ambos tubos obtenidos se conservaron a condiciones controladas, uno para continua replicación, y el otro para uso y escalamiento

Inoculación en campana de flujo laminar IF® Modelo CFV60

- 1. Se encendió la luz ultravioleta por 10 minutos

2. Se apagó la luz ultravioleta. Usando cubre bocas y con las manos desinfectadas con alcohol, tipo farmacéutico, se limpió la campana por dentro (paredes y superficie) con toalla de papel desechable humedecida con alcohol (etílico desnaturalizado, de 70°)
3. Se encendió el flujo laminar y el mechero bunsen con precaución; cuidando siempre que la flama sea de color azul
4. Al material esterilizado se le retiró la bolsa de plástico, dentro de la campana, lejos del mechero encendido. Todo material que se requirió introducir en la campana se limpió con antelación con toalla de papel desechable humedecida con alcohol
5. Para replicar o duplicar:
 - a. El trasvase siempre se realizó junto (a la altura) de la flama
 - b. Los tapones y boca de los tubos se flamearon antes de cada trasvase
 - c. Para trasvasar, después de flamear se dejó enfriar unos segundos, la mitad del inóculo se vertió a un tubo con medio Bold 3N modificado
 - d. Nuevamente los tapones y la boca de los tubos se flamearon, y se taparon inmediatamente
NOTA: con el mismo procedimiento se trasvaso el segundo tubo con medio Bold 3N modificado al tubo del inóculo restante
6. Para escalar a matraz o botella:
 - a. El trasvase siempre se realizó junto (a la altura) de la flama, la botella o matraz siempre se sujetó de su base y se inclinó cerca de la flama, cuando fue necesario
 - b. Los tapones y boca de matraz y botellas de flamearon antes de cada trasvase, cuidando la distancia, en especial con tapones de gasa y algodón
 - c. Para trasvasar, después de flamear se dejó enfriar unos segundos, el inóculo se agito antes de destapar y flamear; y se vertió por completo al matraz o botella con medio Bold 3N modificado
 - d. Nuevamente los tapones (de algodón) y la boca de matraz y/o botella se flamearon, y se taparon inmediatamente
NOTA: Se tuvo cuidado por evitar que los tapones de plástico y de algodón no tocaran la superficie de la campana y se daba el caso, se utilizaban tapones de remplazo esterilizados
7. El flujo y el mechero se apagaron después de duplicar o escalar. Las paredes y superficie de se limpiaron con alcohol etílico; este paso se realizó incluso antes de inocular una cepa diferente.

11.3 DETERMINACIÓN DE DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO (DQO)

Equipo

Espectrofotómetro UV/VIS (Perkin Elmer®, Lambda 25), para su uso a 220 nm y 275 nm con celdas de sílice emparejadas de trayectoria de 1 cm o más luz.

Reactivos

- Agua libre de materia orgánica: Se usó agua destilada y desionizada de alta pureza al preparar todas las soluciones y diluciones.
- Solución digestora: se pesaron 3.33 g de sulfato de mercurio (HgSO₄) pureza de 98.0 %, Sigma-Aldrich®, 4.22 g de dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) pureza de 99.5 %, J. T. Baker®, secado a 103 °C por 2 horas y se adicionaron en un matraz con 16.7 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) pureza de 97.4 %, J. T. Baker®. Se mezcló con precaución en baño de hielo y en campana de extracción; finalmente se aforó a 100 mL con agua destilada y desionizada.
- Solución de ácido sulfúrico (H₂SO₄): se pesaron 1.1 g de sulfato de plata y se adicionaron a un matraz aforado con 60 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) pureza de 97.4 %, J. T. Baker®. Se mezcló con precaución en baño de hielo y en campana de extracción; finalmente se aforó a 200 mL con H₂SO₄.
- Solución patrón de biftalato de potasio: se pesaron 1.1576 g de biftalato de potasio (C₈H₅KO₄) pureza de 99.95 %, Meyer®, y se aforó a 100 mL con agua destilada y desionizada.

Procedimiento

Para la curva patrón se determinaron cinco puntos por triplicado. Se agregó a cada tubo de ensaye con capacidad de 5 mL, solución patrón de biftalato de potasio, agua destilada, solución digestora y solución de H₂SO₄ en las siguientes cantidades:

Concentración de biftalato de potasio (mg/L)	Volumen de solución Patrón de biftalato de potasio (mL)	Volumen de agua destilada (mL)	Volumen de solución digestora (mL)	Volumen de solución de H ₂ SO ₄ (mL)
0	0	2	1	2
300	0.4	1.6	1	2
600	0.8	1.2	1	2
900	1.2	0.8	1	2
1200	1.6	0.4	1	2
1500	2.0	0	1	2

Para las muestras de agua residual: Se filtraron 10 mL de muestra con filtro para jeringa Millex® 25 mm (poro de 2 µm) y se diluyeron 1:25 de la siguiente forma (por triplicado):

Agua residual	Volumen de muestra filtrada (μL)	Volumen de agua destilada (mL)	Volumen de solución digestora (mL)	Volumen de solución de H ₂ SO ₄ (mL)
Entrada del reactor UASB	80	1.92	1	2
Salida del reactor UASB	80	1.92	1	2

La reacción tiñe a una coloración de ocre a marrón según la cantidad de DQO. De todas las muestras en los tubos de ensaye (22 en total: 16 de la curva patrón y 6 de las muestras de entrada y salida del reactor UASB de la UAM-I) se midió absorbancia a 620 nm.

Cálculo

Para realizar la curva estándar se ingresaron los datos a Excel y se graficó la concentración de C₈H₅KO₄ mg/L) vs absorbancia (u. a.).

11.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRATO

Equipo

Espectrofotómetro UV/VIS (Perkin Elmer®, Lambda 25), para su uso a 220 nm y 275 nm con células de sílice emparejadas de trayectoria de 1 cm o más luz.

Reactivos

- Agua libre de nitratos: Se usó agua destilada y desionizada de alta pureza a preparar todas las soluciones y diluciones.
- Solución patrón de nitrato: disolver 0.04 g de nitrato de sodio (NaNO₃) pureza de 99 %, Sigma Aldrich®, en agua destilada y desionizada. Se aforó a 100 mL con agua destilada y desionizada.
- Solución de ácido clorhídrico (HCl) [1N]: en un matraz aforado de 200 mL de capacidad, con 50 mL de agua destilada y desionizada, en baño de hielo y en campana de extracción; se agregaron 16.88 mL de (HCl) pureza del 36.6 %, Sigma-Aldrich®, y se aforó a 200 mL con agua destilada y desionizada.

Procedimiento

Para la curva se determinaron cinco puntos por triplicado. Se agregó a cada tubo de ensaye con capacidad de 5 mL, solución patrón de nitrato, agua destilada y HCl [1N] en las siguientes cantidades:

Concentración de NO ₃ ⁻ (mg/L)	Volumen de solución Patrón de nitrato (μL)	Volumen de agua destilada (mL)	Volumen de HCl 1N (μL)
0	0	5.000	100
2	25	4.975	100
4	50	4.950	100
6	75	4.925	100
8	100	4.900	100
10	125	4.875	100

Para las muestras de agua residual: Se filtraron 10 mL de muestra con filtro para jeringa Millex® 25 mm (poro de 2 μm) y se diluyeron 1:10 de la siguiente forma (por triplicado):

Agua residual	Volumen de muestra filtrada (μL)	Volumen de agua destilada (mL)	Volumen de HCl 1N (μL)
Entrada del reactor UASB	500	4.5	100
Salida del reactor UASB	500	4.5	100

La reacción no torna de color. A las muestras de todos los tubos de ensaye (22 en total: 16 de la curva patrón y 6 de las muestras de entrada y salida del reactor UASB de la UAM-I) se midió absorbancia a 220 y 275 nm.

Cálculo

Para realizar en Excel la curva se graficó la concentración de NO₃⁻ (mg/L) vs la absorbancia calculada; la cual se obtuvo de la siguiente manera:

$$\text{ABSORBANCIA CALCULADA} = \text{Absorbancia a 220 nm} - \text{Absorbancia a 275 nm}$$

11.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRITO

Equipo

Espectrofotómetro UV/VIS (Perkin Elmer®, Lambda 25), para su uso a 220 nm y 275 nm con células de sílice emparejadas de trayectoria de 1 cm o más luz.

Reactivos

- Agua libre de nitratos: Se usó agua destilada y desionizada de alta pureza al preparar todas las soluciones y diluciones.

- Sulfanilamida (C₆H₈N₂O₂S): Se pesó 1 g de sulfanilamida (C₆H₈N₂O₂S) pureza de 99 %, J. T. Baker® y se disolvió en 10 mL en ácido clorhídrico (HCl) pureza del 36.6 %, Sigma-Aldrich® concentrado en baño de hielo y en campana de extracción; se aforó a 100 mL con agua destilada y desionizada.
- NED o N-Naftil-Etilendiamina (C₁₂H₁₆Cl₂N₂): Se pesó 0.1 g de NED (C₁₂H₁₆Cl₂N₂) pureza de 98 %, Sigma-Aldrich® y se aforó a 100 mL con agua destilada y desionizada.
- Solución patrón de nitrito 1: disolver 0.01 g de nitrito de sodio (NaNO₂) pureza de 99 %, Sigma Aldrich®, en agua destilada y desionizada. Se aforó a 100 mL con agua destilada y desionizada.
- Solución patrón de nitrito 2: se aforó 5 mL de la solución patrón de nitrito 1 a 250 mL con agua destilada y desionizada.

Procedimiento

Para la curva se determinaron seis puntos por triplicado. Se agregó a cada tubo de ensaye con capacidad de 5 mL, solución patrón de nitrito 2, sulfanilamida y NED en las siguientes cantidades:

Concentración de NO ₂ ⁻ (mg/L)	Volumen de solución patrón de nitrito 2 (mL)	Volumen de agua destilada (mL)	Volumen de solución de sulfanilamida (mL)	Volumen de NED (mL)
0	0	5	0.1	0.1
50	0.3125	4.6875	0.1	0.1
100	0.6250	4.3750	0.1	0.1
200	1.2500	3.7500	0.1	0.1
400	2.5000	2.5000	0.1	0.1
600	3.7500	1.1250	0.1	0.1
800	5	0	0.1	0.1

Para las muestras de agua residual: Se filtraron 10 mL de muestra con filtro para jeringa Millex® 25 mm (poro de 2 µm) y se diluyeron 1:50 de la siguiente forma (por triplicado):

Agua residual	Volumen de muestra filtrada (mL)	Volumen de agua destilada (mL)	Volumen de solución de sulfanilamida (mL)	Volumen de NED (mL)
Entrada del reactor UASB	0.1	4.9	0.1	0.1
Salida del reactor UASB	0.1	4.9	0.1	0.1

La reacción tiñe a una coloración rosácea. A las muestras de todos los tubos de ensaye (25 en total: 19 de la curva patrón y 6 de las muestras de entrada y salida del reactor UASB de la UAM-I) se midió la absorbancia a 543 nm después de 20 min de reacción.

Cálculo

Para realizar la curva estándar se ingresaron los datos a Excel y se graficó la concentración de NO₂⁻ (mg/L) vs absorbancia (u. a.).

11.6 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FOSFATO

Equipo

Espectrofotómetro UV/VIS (Perkin Elmer®, Lambda 25), para su uso a 220 nm y 275 nm con células de sílices emparejadas de trayectoria de 1 cm o más luz.

Reactivos

- Agua libre de nitratos: Se usó agua destilada y desionizada de alta pureza a preparar todas las soluciones y diluciones.
- Ácido sulfúrico (H₂SO₄) [5N]: se disolvieron 1.4 mL ácido sulfúrico (H₂SO₄) pureza de 97.4 %, J. T. Baker®, en 60 mL con agua destilada y desionizada en baño de hielo y en campana de extracción; se aforó a 100 mL (H₂Od).
- Tartrato de antimonio y potasio (K₂ (C₄H₂O₆Sb)₂ · 3H₂O): Se pesaron 0.3 g de tartrato de antimonio y potasio (K₂(C₄H₂O₆Sb)₂ · 3H₂O) pureza de 99 %, Meyer®, en 50 mL con agua destilada y desionizada; se aforó a 100 mL (H₂Od).
- Molibdato de amonio ((NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4 H₂O): se disolvieron 2 g de molibdato de amonio ((NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4 H₂O) pureza de 99 %, J. T. Baker®, en 25 mL con agua destilada y desionizada; se aforó a 50 mL (H₂Od).
- Ácido ascórbico (C₆H₈O₆) [0.1M]: Se pesaron 1.76 g de ácido ascórbico (C₆H₈O₆) pureza de 99 %, Meyer®, en 50 mL con agua destilada y desionizada; se aforó a 100 mL (H₂Od).
- Mezcla para fosfato:

6.50	mL	Ácido sulfúrico
0.65	mL	Tartrato de antimonio y fosfato
1.95	mL	Molibdato de amonio
3.90	mL	Ácido ascórbico
13.00	mL	Mezcla para fosfato
- Solución patrón de fosfato: se disolvieron 43.93 g de fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) pureza de 99 %, J. T. Baker®, previamente secados a 105 °C por una hora, en 50 mL de agua destilada y desionizada. Se aforó a 100 mL (H₂Od). Esta solución corresponde a 1 mL= 100 mg PO₄.

Procedimiento

Para la curva se determinaron cinco puntos por triplicado. Se agregó a cada tubo de ensaye con capacidad de 5 mL, solución patrón de fosfato y mezcla para fosfato en las siguientes cantidades:

Concentración de PO ₄ ³⁺ (mg/L)	Volumen de solución patrón de fosfato (mL)	Volumen de agua destilada (mL)	Volumen de mezcla para fosfato (mL)
0	0	5	0.8
100	1	4	0.8
200	2	3	0.8
300	3	2	0.8
400	4	1	0.8
500	5	0	0.8

Para las muestras de agua residual: Se filtraron 10 mL de muestra con filtro para jeringa Millex® 25 mm (poro de 2 µm) y se diluyeron 1:10 de la siguiente forma (por triplicado):

Agua residual	Volumen de muestra filtrada (mL)	Volumen de agua destilada (mL)	Volumen de mezcla para fosfato (mL)
Entrada del reactor UASB	0.5	4.5	0.8
Salida del reactor UASB	0.5	4.5	0.8

La reacción tiñe a una coloración azul. Todos los tubos de ensaye (22 en total: 16 de la curva patrón y 6 de las muestras de entrada y salida del reactor UASB de la UAM-I) se midió a 880 nm después de 2 horas y 30 min de reacción.

Cálculo

Para realizar la curva estándar se ingresaron los datos a Excel y se graficó PO₄³⁺ mg/L vs absorbancia.

11.7 CURVAS ESTÁNDAR DE LOS NUTRIENTES

a) Demanda química de oxígeno (DQO)

b) Concentración de nitrato

c) Nitrito

d) Fosfato

11.8 MEDIO DE CULTIVO BOLD 3N MODIFICADO pH 7

Sustancia	Soluciones Stock para preparar 400 mL H ₂ O (g)	Alícuota para preparar 1 L de solución final (mL)	Concentración final (g/L)
NaNO ₃	10.0	30	0.75
CaCl ₂ 2H ₂ O	1.0	10	0.25
MgSO ₄ 7H ₂ O	3.0	10	0.075
K ₂ HPO ₄	3.0	10	0.075
KH ₂ PO ₄	7.0	10	0.175
NaCl	1.0	10	0.025
UTEX, 2016			

El medio resultante tiene aproximadamente un pH de 6.5 por lo que requiere un ajuste con NaOH [1M] pureza 95 %, J.T.Baker®, basta de una a dos gotas por cada 100 mL de medio, es importante agitar y verificar con pH-metro (Hanna Instrument® HI99141) tras la adición de cada gota hasta alcanzar el pH 7.

11.9 CONTENIDO DE LOS FERTILIZANTES COMERCIALES EN LOS EXPERIMENTOS

La relación N-P-K de cada medio fue: 20-30-10 para Folim®, 11-10-12 para Vita® y 12-5-8 para Bold 3N modificado. Composición de los macronutrientes de nitrógeno, fósforo y potasio en los fertilizantes Folim® y Vita® comparado con Bold 3N modificado:

Composición	Folim®	Vita®	Bold 3N modificado
	(g/L)		
Nitrógeno amoniacal (N-NH ₃)	0.05	0.11	0
Nitrógeno de urea (N- CON ₂ H ₄)	0.05	0	0
Nitrógeno de NaNO ₃	0	0	0.123
Fósforo (P ₂ O ₅)	0.15	0	0
Fósforo (P ₂ O ₂)	0	0.1	0
Fósforo (K ₂ HPO ₄ y KH ₂ PO ₄)	0	0	0.053
Potasio (K ₂ O)	0.05	0.12	0
Potasio (K ₂ HPO ₄ y KH ₂ PO ₄)	0	0	0.084

Composición de otros elementos en los fertilizantes Folim® y Vita® comparado con Bold 3N modificado:

Composición	Folim®	Vita®	Bold 3N modificado
	(g/L)		
Hierro (Fe)	0.136	0	0
Magnesio (Mg)	0.069	0	0.007
Zinc (Zn)	0.097	0	0
Cobre (Cu)	0.069	0	0
Molibdeno (Mo)	0.001	0	0
Boro (B)	0.035	0	0
Azufre (S)	0.2	0	0.009
Calcio (Ca)	0	0	0.068
Cloro (Cl)	0	0	0.014
Hidrógeno (H)	0	0	0.014
Oxígeno (O)	0.059	0.054	0.641
Quelatos (% p/p)	5	0	0

11.10 CURVAS ESTÁNDAR DE *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 EN DISTINTOS MEDIOS

a) Bold 3N modificado con pH 7

b) Fertilizante Folim®

c) Fertilizante Vita®

d) Agua residual (efluente del reactor UASB de la PTAR de la UAM-I), pH 7

11.11 Cinética de crecimiento de *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 (no axénica) en agua residual de la UAM Iztapalapa, aireada con bomba de aire.

PONENCIAS

Microalgae culture for triacylglycerides production

Nancy Nayeli Domínguez Alfaro¹, Blanca Estela Chávez Sandoval², Patricia Ruiz Sánchez³, Hugo Joaquín Ávila Paredes¹, Margarita Mercedes González Brambila²

¹Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, ²Departamento de Energía, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco, ³Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Introduction

Triacylglycerides are precursors of biodiesel (produced by transesterification^[1,4], eq. 1), a renewable biofuel. They can be produced by oleaginous plants and microalgae^[1]. From these two options, the second has the advantages that microalgae are species with a faster grow and a good oil productivity, besides the fact that there are no conflicts arising from the use of sources assigned to food^[3].

Microalgae species with the reported highest lipid contents are *Chlorella*, *Cryptocodinium*, *Cylindrotheca*, with values between 20 and 50 w. %^[2]. The lipid content is highly dependent on the culture conditions^[2, 3].

Equation 1. Biodiesel production via triacylglyceride transesterification

Objective

To extract and quantify lipids from *Chlorella vulgaris*, *Chlorella protothecoides* and *Spirulina* sp.

Methodology

a) Cultivation of microalgae under controlled conditions.

b) Soxhlet extraction of lipids with hexane.

c) Recovery of hexane in a rotary evaporator.

Results

SPECIES:	EXTRACTED LIPIDS* (%)	
	EXPERIMENTAL	THEORETICAL
MICROALGAE		
<i>Spirulina</i> sp.	4.73	4-16.6 ^[2]
<i>C. protothecoides</i>	28.49	11-59 ^[2]
<i>C. vulgaris</i>	---	15-58 ^[2]
PALM OIL		
<i>Elaeis guineensis</i> (mesocarp)	5.84 ^[5]	45-55 ^[5]
		*Dry weight.

Conclusions

It was possible to extract the oils contained in microalgae: *Spirulina* Sp. and *Chlorella protothecoides*, cultured under controlled conditions. *C. protothecoides* showed a higher lipid content. Determination of the lipid content of *Chlorella vulgaris* is currently in progress.

References

1. Alemayehu et al. (2015) *J. of Forest Products & Ind*, 4(2): 80-85
2. Ariad et al. (2012) *Acta Biol Colomb*, 18 (1): 43-68
3. Mata et al. (2010) *Renew Sust Energ Rev*, 14:217-232
4. Meireles & Pereira (2013) *J Braz Chem. Soc.* 24(1): 17-57
5. Morillo et al (2010) *Bioagro* 22(2): 89-94

Production of biodiesel precursors by microalgae culturing.

NANCY NAYELI DOMÍNGUEZ ALFARO¹, BLANCA ESTELA CHÁVEZ SANDOVAL²,
PATRICIA RUIZ SÁNCHEZ³, HUGO JOAQUÍN ÁVILA PAREDES¹ Y MARGARITA
MERCEDES GONZÁLEZ BRAMBILA²

¹Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa, ²Departamento de Energía, Universidad Autónoma Metropolitana - Azcapotzalco, ³Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.

Introduction

Microalgae metabolites constitute raw materials for a large variety of biotechnological products, used in the areas of food industry, medicine, animal feed, pigments and biofuels. Although there are other synthesis routes, production of those substances based on microalgae culture is generally motivated by the search of sustainability⁽¹⁻³⁾.

In the described context, biodiesel production based on microalgae lipids is an efficient and promising solution to current environmental issues and the imminent shortage of fossil fuels in the near future. Microalgae exhibit high growth rates and high content of lipids that are suitable for transesterification (eq. 1), the process to produce biodiesel from triacylglycerides⁽²⁾. They can be produced by oleaginous plants and microalgae⁽¹⁾. From these two options, the second has the advantages that microalgae are species with a faster growth and a good oil productivity, besides the fact that there are no conflicts arising from the use of sources assigned to food⁽⁴⁾.

Some reported microalgae species with the highest lipid contents are *Chlorella*, *Cryptocodinium*, *Cylindrotheca*, with values between 20 and 50 w %⁽⁵⁾. The lipid content is highly dependent on the culture conditions^(2,4,5): temperature, pH, light intensity, composition of culture medium (specially [N]/[P] ratios) and type of culture system.

The purpose of this study is to analyze the effect of culture media on the production of biomass and the concentration of triacylglycerides in *Chlorella vulgaris*, *Chlorella protothecoides* and *Spirulina* sp., at a laboratory scale, in order to continue scaling up the culture of those microalgae strains.

Methods

a) Culture conditions: Illumination with a 40 W lamp and two strips of LED lights (1m); photoperiod was 12 hours of light and 12 hours of darkness; continuous aeration; temperature maintained between 19 and 25 °C; pH was measured continuously (its value was between 6 and 7).

b) Soxhlet extraction of lipids with hexane.

c) Recovery of hexane in a rotary evaporator.

Results

Graph 1. Growth curve of *Spirulina* sp. in a 20 L reactor.

Table 1. Lipid content obtained from microalgae

SPECIES	CULTURE MEDIUM	BIOMASS CONCENTRATION (mg/L)	PERCENTAGE OF EXTRACTED LIPIDS* (%)	
			Experimental	Theoretical
Microalgae				
<i>Spirulina</i> sp.	BG11	0.94	4.7	4-16.6 ⁽⁵⁾
<i>Chlorella protothecoides</i>	Bold 3N	---	28.5	11-59 ⁽⁵⁾
<i>Chlorella vulgaris</i>	Bold 3N	---	---	15-58 ⁽⁵⁾
Palm oil				
<i>Elaeis guineensis</i> (mesocarp)	---	---	5.8 ⁽⁶⁾	45-55 ⁽⁶⁾

*Dry weight.

Conclusions

- A biomass concentration of 0.94 g/L for *Spirulina* sp. was obtained after 50 days in a fotobioreactor. *Chlorella vulgaris* and *Chlorella protothecoides* are being cultured in tubes to obtain suitable samples to inoculate fotobioreactors.
- It was possible to obtain the lipids from microalgae by a Soxhlet extraction. *C. protothecoides* exhibited a higher lipid content, compared to *Spirulina* sp., under the same culture conditions. Data from *Chlorella vulgaris* are still being determined.
- Culture of microalgae under different media, with commercial fertilizers, is in progress.

Bibliography

- Alenayehu et al. (2015) J of Forest Products & Ind, 4(2), 80-85
- Bonchai et al. (2012) Int J Biosci Biochem Bioinforma, 2(6): 407-410
- Braz et al. (2013) Chem Soc 24(1)
- Mata et al. (2010) Renew Sust Energ Rev 14:217-232
- Ariad et al. (2012) Acta Biol Colomb, 18 (1): 43 - 68
- Morillo, et al. (2010) Bioagro Barquisimeto 22(2)

Evaluación del crecimiento de *Chlorella vulgaris* en medios de cultivo con fertilizantes comerciales para la extracción de precursores de biodiesel

Domínguez Alfaro Nancy Nayeli¹, Mijangos Ramírez Martha Beatriz², Chávez Sandoval Blanca Estela^{2*},

González Brambila Margarita Mercedes², Ávila Paredes Hugo Joaquín^{1**}

¹Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, UAM Unidad Iztapalapa; ²Departamento de Energía, UAM Unidad Azcapotzalco;

*blanchavez29@gmail.com, **hjap@xanum.uam.mx

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos unicelulares, eucariontes, autótrofos, fotosintéticos y coloniales; entre sus principales aplicaciones se encuentran¹: captura de CO₂ uso como biofertilizante y la producción de compuestos como colorantes y lípidos precursores de biodiesel. Las microalgas reportadas con los contenidos más altos de lípidos son *Botryococcus* (25-80 %), *Cylindrotheca* (16-37 %) y *Chlorella* (14-32 %)².

El cultivo de las microalgas depende de ciertas variables que hacen posible su subsistencia, crecimiento, desarrollo y reproducción³; la energía solar tanto en forma de luz como de calor; macronutrientes (una fuente de carbono como el dióxido de carbono, y otras sustancias para proveer los elementos H, O, N, P, S, K y Na) y micronutrientes (Ca, Mg, Fe, Mn, Mo, Br, Cu, Zn, Si, Cr), además de un pH generalmente neutro⁴.

Respecto a la producción de precursores de biodiesel es importante maximizar tanto la cantidad de biomasa generada, como la concentración de triacilglicéridos en las células. Esto último se puede lograr sometiendo las células a estrés. Para aumentar la sustentabilidad del cultivo de microalgas, se ha buscado cultivarlas en medios basados en fertilizantes convencionales, que resultan menos costosos⁵.

En este contexto, se ha observado una densidad celular de hasta 6.35×10^3 células/mL con el fertilizante comercial Poliverdol® en 6 días de un cultivo mixto con *Chlorella vulgaris* y *Hydrophidium contortum* similar al medio de cultivo convencional: Guillard (6.40×10^3 células/mL)⁵.

OBJETIVO

Evaluar el crecimiento de la cepa *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 en medios de cultivo basados en fertilizantes comerciales y determinar el contenido de ácidos grasos en la biomasa obtenida.

MATERIALES Y MÉTODOS

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

TABLA 1. Solubilidad de los fertilizantes después del ajuste a pH 7.

Fertilizante	Relación NPK	pH inicial	Formación de precipitado	APP*
Scotts®	10-10-10	4.23 ± 0.02	Si	X
Miracle-Gro®	15-30-15	3.36 ± 0.02	Si	X
Vita®	11-10-12	6.43 ± 0.02	No	✓
FixaFol®	20-20-20	5.22 ± 0.02	Si	X
Folim®	20-31-10	6.18 ± 0.02	No	✓

*Aprobado para prueba como medio de cultivo de *Chlorella vulgaris* UTEX 2714

GRÁFICA 1. Curvas de crecimiento de *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 en medios con los fertilizantes Folim® y Vita®.

GRÁFICA 2. Concentración de biomasa y porcentaje de ácidos grasos extraídos de *Chlorella vulgaris* UTEX 2714

CONCLUSIONES

- Dos de los 5 fertilizantes comerciales evaluados, Folim® y Vita® presentaron alta solubilidad en agua, lo que permitió utilizarlos como medio de cultivo para *Chlorella vulgaris* UTEX 2714.
- La densidad celular en los medios de cultivo basados en los fertilizantes comerciales fue de $(6.46 \pm 1.74) \times 10^6$ células/mL con Bold 3N modificado, $(8.1 \pm 1.28) \times 10^6$ células/mL con Folim® y $(3.82 \pm 0.70) \times 10^6$ células/mL con Vita®, después de 12 días.
- Se logró extraer los aceites contenidos en *Chlorella vulgaris* UTEX 2714: 40.00 ± 0.11 % (Bold 3N modificado), 56.79 ± 1.94 % (Folim®) y 51.64 ± 1.42 % (Vita®).

REFERENCIAS

1. Singh, et al. (2011) Bioresource Technology 102(1), 26-34.
2. Wu et al. (2012) Energies, 5, 2667-2682.
3. Sakuraz González, H. (2006) Contactos, 59, 64-70.
4. Wayne, N. H. (1973) En: J. R. Stein (ed.) Handbook of Physiological Methods, Culture methods and growth measurements. Cambridge, Cambridge University Press, 7-24.
5. Brito et al. (2013) The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI – Food Technology, 37(1), 85-97.

UAM-I, 2016

Cultivo de *Chlorella vulgaris* en medios con fertilizantes comerciales para la producción de precursores de biodiesel.

Nancy Nayeli Domínguez Alfaro^{1*}, Blanca Estela Chávez Sandoval², Hugo Joaquín Ávila Paredes^{1**}

¹ Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixo 186, Del. Iztapalapa, Cd. de México, C.P. 09340.

² Departamento de Energía, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco, San Pablo Xalpa 180, Del. Azcapotzalco, Cd. de México, C.P. 02200.
*nancynayeli@gmail.com, **hjap@xanum.uam.mx

Resumen

En la producción de precursores de biodiesel, el cultivo de microalgas representa una opción prometedora debido a su velocidad de crecimiento y productividad de triacilglicéridos, mayores que las de las plantas. Aunque la composición de las microalgas depende de la cepa, las condiciones de cultivo y etapa de crecimiento, los géneros reportados con los contenidos más altos de lípidos son *Batryococcus* (25-80 % en base seca), *Cylindrotheca* (16-37 %) y *Chlorella* (14-32 %). En el presente estudio se evaluaron cinco fertilizantes comerciales como medio de cultivo y se determinaron curvas de crecimiento de la cepa *Chlorella vulgaris* UTEX 2714. De los fertilizantes evaluados, los que no presentaron precipitados fueron Folim® y Vita®; la densidad celular obtenida en el periodo de estudio fue de $(8.1 \pm 1.28) \times 10^6$ y $(3.82 \pm 0.70) \times 10^6$ células/mL, respectivamente. El contenido de lípidos fue de 56.79 ± 1.94 % para Folim® y 51.64 ± 1.42 % para Vita®.

Introducción

Las microalgas son organismos unicelulares, eucariontes, autótrofos (la mayoría), fotosintéticos y coloniales; entre sus aplicaciones se encuentran: la captura de CO₂, su uso como biofertilizante y la producción de compuestos como colorantes y lípidos precursores de biodiesel¹. Las microalgas reportadas con los contenidos más altos de lípidos son *Batryococcus* (25-80 % en base seca), *Cylindrotheca* (16-37 %) y *Chlorella* (14-32 %)².

Respecto a la producción de lípidos es importante maximizar: la cantidad de biomasa generada y la concentración de triacilglicéridos en las células. En busca de aumentar la sustentabilidad del cultivo de microalgas, se han desarrollado estudios sobre el efecto de la composición de medios basados en fertilizantes en la cinética de crecimiento^{3,4}. En este contexto, se ha observado un crecimiento celular de hasta 6250 % con una densidad celular final de $\sim 6.35 \times 10^3$ células/mL con el fertilizante comercial Poliverdol® en 6 días de cultivo mixto (*Chlorella vulgaris* y *Hydrophidium contortum*), resultado similar al obtenido en el medio convencional Guillard⁵. En el presente estudio se tuvo como objetivo evaluar el crecimiento de la cepa *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 en medios de cultivo basados en fertilizantes comerciales y determinar su contenido de lípidos.

Metodología

Resultados y discusión

Tabla 1. Solubilidad de los fertilizantes después del ajuste a pH 7.

Fertilizante	Relación NPK	pH inicial	Formación de precipitado	APP*
Scotts®	10-10-10	4.23 ± 0.02	Si	X
Miracle-Gro®	15-30-15	3.36 ± 0.02	Si	X
Vita®	11-10-12	6.43 ± 0.02	No	✓
FixaFol®	20-20-20	5.22 ± 0.02	Si	X
Folim®	20-31-10	6.18 ± 0.02	No	✓

*Aprobado para prueba como medio de cultivo de *Chlorella vulgaris* UTEX 2714

Gráfica 1. Curvas de crecimiento de *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 en medios con los fertilizantes Folim® y Vita®.

Tabla 2. Concentración de biomasa y porcentaje de lípidos extraídos de *Chlorella vulgaris* UTEX 2714.

Especie	Medio de cultivo	Concentración de biomasa (g/L)	Porcentaje de lípidos extraídos (%)
<i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714	Bold 3N modificado	0.086 ± 0.00102	40.00 ± 0.11
	Folim®	0.094 ± 0.0012	56.79 ± 1.94
	Vita®	0.082 ± 0.0012	51.64 ± 1.42
<i>Chlorella vulgaris</i> ESP 31 ⁵	Medio Bristol mixotrófico (glucosa y CO ₂)	2.88 ± 0.8	57.61
<i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 259 ⁶	Medio heterótrofo con peptona	0.25 ± 0.007	38 ± 2

Conclusiones

Dos de los 5 fertilizantes comerciales evaluados, Folim® y Vita® presentaron alta solubilidad en agua, lo que permitió utilizarlos como medio de cultivo para *Chlorella vulgaris* UTEX 2714.

El crecimiento celular obtenido y la densidad celular final en los cultivos en medios basados en los fertilizantes comerciales fue de 157 %, $(8.1 \pm 1.28) \times 10^6$ células/mL con Folim® y 47 %, $(3.82 \pm 0.70) \times 10^6$ células/mL con Vita®, a los 11 y 12 días de cultivo, respectivamente.

En ambos fertilizantes se logró extraer los aceites contenidos en *Chlorella vulgaris* UTEX 2714: 56.79 ± 1.94 % del cultivo en Folim® y 51.64 ± 1.42 % del cultivo en el medio con Vita®.

Para continuar el presente estudio sería importante caracterizar los lípidos para determinar concentración de los distintos tipos de triacilglicéridos que se obtuvieron de *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 en los medios con los distintos fertilizantes comerciales.

Agradecimientos

Los autores agradecen la ayuda proporcionada para la realización de experimentos al Dr. Jaime Eduardo Vernon Carter (Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, UAM Iztapalapa), Ing. María Isabel Reyes Arreola (Departamento de Biotecnología, UAM Iztapalapa), Eduardo Martínez Niño (Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, UAM Iztapalapa), y Martha Beatriz Mijangos Ramírez (Departamento de Energía, UAM Azcapotzalco). N. N. Domínguez Alfaro agradece al CONACYT por la beca para sus estudios de Maestría (2015-2016).

Referencias

- [1] Singh et al. (2011) *Bioresource Technology*; 102(1), 26-34.
- [2] Wu et al. (2012) *Energies*, 5, 2667-2682.
- [3] Brito et al. (2013) *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI – Food Technology*; 37(1):85-97.
- [4] Silva-Benavides (2016) *Agronomía Mesoamericana*; 27(2):265-275.
- [5] Yeh & Chang. (2012) *Bioresource Technology* 105: 120-127.
- [6] Liang et al. (2009) *Biotechnology Letters*; 31(7):1043-1049.

Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00018

Matrícula: 2151800898

Estudio del efecto de la concentración de CO₂ en la eliminación de N y P de agua residual de la UAM Iztapalapa, mediante el cultivo de *Chlorella* sp.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 16:00 horas del día 19 del mes de junio del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MARIA DE LOURDES MORENO RIVERA
DR. EMILIO ARENAS GUERRERO
DRA. BLANCA ESTELA CHAVEZ SANDOVAL

NANCY NAYELI DOMINGUEZ ALFARO
ALUMNA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS (ENERGIA Y MEDIO AMBIENTE)

DE: NANCY NAYELI DOMINGUEZ ALFARO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

DR. JOSE GILBERTO CORDOBA HERRERA

PRESIDENTA

DRA. MARIA DE LOURDES MORENO RIVERA

VOCAL

DR. EMILIO ARENAS GUERRERO

SECRETARIA

DRA. BLANCA ESTELA CHAVEZ SANDOVAL