



**EDUCACIÓN**

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Orizaba

“2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata”

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

OPCIÓN I.- TESIS

TRABAJO PROFESIONAL

“EVALUACIÓN DE LA REMOCIÓN DE NITRÓGENO Y FÓSFORO CONTENIDOS EN AGUAS RESIDUALES DE ORIGEN PORCÍCOLA POR MEDIO DE *Spirulina maxima* y *Chlorella spp*”.

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS EN  
INGENIERÍA QUÍMICA

PRESENTA:

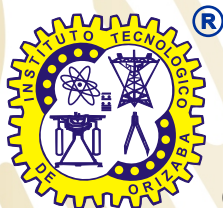
*I.Q. Ary Gayll Martínez Romero*

DIRECTOR DE TESIS:

*Dr. Juan Manuel Méndez Contreras*

CODIRECTOR DE TESIS:

*M.I. Norma Alejandra Vallejo Cantú*



ORIZABA, VERACRUZ, MÉXICO.

SEPTIEMBRE 2019



# EDUCACIÓN

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



## TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Orizaba

"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

FECHA: 10/09/2019  
DEPENDENCIA: POSGRADO  
ASUNTO: Autorización de Impresión  
OPCIÓN: I

C. ARY GAYLL MARTINEZ ROMERO  
CANDIDATO A GRADO DE MAESTRO EN:  
CIENCIAS EN INGENIERIA QUIMICA

De acuerdo con el Reglamento de Titulación vigente de los Centros de Enseñanza Técnica Superior, dependiente de la Dirección General de Institutos Tecnológicos de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo respecto a su Trabajo Profesional titulado:

**"EVALUACION DE LA REMOCION DE NITROGENO Y FOSFORO CONTENIDOS EN AGUAS RESIDUALES DE ORIGEN PORCICOLA POR MEDIO DE SPIRULINA MAXIMA Y CHLORELLA SPP".**

Comunico a Usted que este Departamento concede su autorización para que proceda a la impresión del mismo.

A T E N T A M E N T E

  
MARIO LEONCIO ARRIJOJA RODRIGUEZ  
JEFE DE LA DIV. DE ESTUDIOS DE POSGRADO



Avenida Oriente 9 Núm. 852, Colonia Emiliano Zapata, C.P. 94320 Orizaba, Veracruz, México

Tel. 01 (272) 7 24 40 96, Fax. 01 (272) 7 25 17 28 e-mail: orizaba@itorizaba.edu.mx

www.orizaba.tecnm.mx







**SEP**  
SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MEXICO

Instituto Tecnológico de Orizaba

"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

FECHA : 21/06/2019

ASUNTO: Revisión de Trabajo Escrito

**C. DR. RUBEN POSADA GOMEZ**  
JEFE DE LA DIVISION DE ESTUDIOS  
DE POSGRADO E INVESTIGACION.  
P R E S E N T E

Los que suscriben, miembros del jurado, han realizado la revisión de la Tesis del (la) C. :

**ARY GAYLL MARTINEZ ROMERO**

la cual lleva el título de:

**"EVALUACION DE LA REMOCION DE NITROGENO Y FOSFORO CONTENIDOS EN AGUAS RESIDUALES DE ORIGEN PORCICOLA POR MEDIO DE SPIRULINA MAXIMA Y CHLORELLA SPP".**

Y concluyen que se acepta.

A T E N T A M E N T E

PRESIDENTE : DR. **JUAN MANUEL MENDEZ CONTRERAS**

SECRETARIO : M.I. **NORMA ALEJANDRA VALLEJO CANTU**

VOCAL : M.I. **ADRIAN REYES BENITEZ**

VOCAL SUP. : DR. **ALEJANDRO ALVARADO LASSMAN**

FIRMA  
FIRMA  
FIRMA  
FIRMA

EGRESADO(A) DE LA MAESTRIA EN CIENCIAS EN INGENIERIA QUIMICA

OPCION: I **Tesis**



Avenida Oriente 9 Núm. 852, Colonia Emiliano Zapata, C.P. 94320 Orizaba, Veracruz, México

Tel. 01 (272) 7 24 40 96, Fax. 01 (272) 7 25 17 28 e-mail: orizaba@itorizaba.edu.mx

www.orizaba.tecnm.mx



## DEDICATORIAS

*A Dios, tu amor y tu bondad no tienen fin, me permites sonreír ante todos mis logros que son resultado de tu ayuda, y cuando caigo y me pones a prueba, aprendo de mis errores y me doy cuenta de lo que pones en frente mío para que mejore como ser humano, y crezca de diversas maneras, te lo agradezco padre.*

*A mis abuelos Elo y Enrique †, que a pesar que ya no están a mi lado, su cariño y amor prevalece en mi corazón, los llevo siempre en mi mente, espero estén orgullosos de mí.*

*A mi madre, la Sra. Guadalupe Romero Benítez, la principal promotora de mis sueños, por creer y confiar en mí, gracias por estar ahí conmigo en todo momento y nunca dejarme caer, este logro es tuyo también, te amo.*

*A mi padre Christian Rivas y a mis hermanos Enrique y Ángel, por su paciencia y tolerancia conmigo en esta etapa importante de mi vida y sobre todo por su apoyo.*

*A la familia Reyes Gutiérrez, por su amistad, cariño, apoyo y confianza, en especial a José Antonio Reyes Gutiérrez, gracias por estar siempre conmigo y ser un gran compañero.*

*A todas las personas que me ayudaron en la realización de esta investigación en el laboratorio, por su tiempo brindado y dedicación.*

## RECONOCIMIENTOS

**Dr. Juan Manuel Méndez Contreras** por aceptarme y permitirme integrarme a su equipo de investigación, su confianza, por su dirección en la realización de este proyecto, por sus observaciones constructivas y sus grandes conocimientos compartidos a lo largo de este proyecto y en mi formación académica.

**M.I.Q. Norma Alejandra Vallejo Cantú** por su disponibilidad, apoyo, observaciones, aportaciones y sus conocimientos compartidos tanto en clase y en la presente investigación.

**Dr. Alejandro Alvarado Lassman** agradezco su amable atención, observaciones y aportaciones en la realización de este trabajo de investigación.

**M.I.A. Adrián Reyes Benítez** le agradezco su amable atención y apoyo como tutor, por las observaciones, aportaciones y sus conocimientos impartidos tanto en tutoría, en clases y en la presente investigación.

A cada uno de mis profesores investigadores de la Maestría en Ciencias en Ingeniería Química: **Dr Atenodoro**, **Dr. Erick Samuel** y la **Dra. Rosalía** por sus grandes enseñanzas, compartir conocimientos y prepararme para ser un profesionalista.

**Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca otorgada con número de registro 466085 en el periodo Febrero 2017 a Enero 2019.

**TecNM** por la beca “1000 Jóvenes en la ciencia” otorgada para iniciar mis estudios de maestría en el TecNM campus Orizaba en el periodo enero-junio 2017.

## RESUMEN

### EVALUACIÓN DE LA REMOCIÓN DE NITRÓGENO Y FÓSFORO CONTENIDOS EN AGUAS RESIDUALES DE ORIGEN PORCÍCOLA POR MEDIO DE *SPIRULINA MAXIMA* Y *CHLORELLA SPP.*

**Elaborada por:** I.Q. Ary Gayll Martínez Romero

**Dirigida por:** Dr. Juan Manuel Méndez Contreras

**Co-dirigida por:** M.I.Q. Norma Alejandra vallejo Cantú

Las microalgas se han encontrado en el centro de interés en los últimos años como un sistema alternativo para el tratamiento biológico de aguas residuales, proveen una alternativa para la remoción de contaminantes (N y P) de las aguas residuales, mientras que producen biomasa que puede ser empleada para la obtención de biomásas alimenticias y sustancias químicas de alto valor.

La presente investigación tiene como objetivo evaluar el efecto de *Spirulina maxima* y *Chlorella spp.* en la remoción de nitrógeno y fósforo presentes en aguas residuales de origen porcícola.

Se realizó un montaje de cinéticas de crecimiento, usando microreactores de plástico de con un volumen útil de 500 mL, los cuales se mantuvieron durante seis días. Se propusieron las siguientes concentraciones equidistantes, teniendo como volumen algal el 30%: 25%, 50% y 75% v/v: agua residual/ agua destilada. Durante esta etapa experimental se evaluó el pH, SST, DQO<sub>T</sub>, N<sub>T</sub>, P<sub>T</sub>, concentración celular y biomasa.

Los resultados muestran que los efluentes porcícolas a diluciones mayores (25%) empleando *S. maxima* y *Chlorella spp* se logran excelentes remociones de 50.16% y 56.48% respectivamente para P<sub>T</sub>, y del 100% para N<sub>T</sub> (ambas especies). Produciendo 6302.50 mg de biomasa de *Spirulina maxima*/L y 1680 mg de *Chlorella spp*/L.

## ABSTRACT

### EVALUATION OF THE REMOVAL OF NITROGEN AND PHOSPHORUS CONTAINED IN WASTEWATER OF PORCINE ORIGIN THROUGH SPIRULINA MAXIMA AND CHLORELLA SPP

**Elaborated by:** I.Q. Ary Gayll Martínez Romero

**Directed by:** Dr. Juan Manuel Méndez Contreras

**Co-advised by:** M.I.Q. Norma Alejandra Vallejo Cantú

Microalgae have been in the center of interest in recent years as an alternative system for the biological treatment of wastewater, providing an alternative for the removal of pollutants (N and P) from wastewater, while producing biomass that can be used to obtain food biomasses and high-value chemical substances.

The objective of this research is to evaluate the effect of *Spirulina maxima* and *Chlorella* spp. in the removal of nitrogen and phosphorus present in wastewater of porcine origin.

An assembly of growth kinetics was made, using plastic microreactors with a useful volume of 500 mL, which were maintained for six days. The following equidistant concentrations were proposed, having 30% as algal volume: 25%, 50% and 75% v / v: residual water / distilled water. During this experimental stage, pH, TSS, COD, TN, TP, cell concentration and biomass were evaluated.

The results show that the swine effluents at higher dilutions (25%) using *S. maxima* and *Chlorella* spp achieve excellent removals of 50.16% and 56.48% respectively for  $T_p$ , and 100% for TN (both species). Producing 6302.50 mg *Spirulina maxima* biomass /L and 1680 mg *Chlorella* spp biomass/L.

---

**ÍNDICE**

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>x</b>
<b>NOMENCLATURA</b> .....	<b>xii</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b> .....	<b>4</b>
1.1 Ganado porcino .....	4
1.2 Producción porcícola .....	4
1.2.1 Producción mundial.....	4
1.2.2 Producción nacional.....	6
1.3 Impacto ambiental de la producción porcícola.....	7
1.3.1 Problemática ambiental.....	7
1.3.2 Granjas porcícolas .....	7
1.3.3 Excretas porcícolas .....	8
1.3.3.1 Excreta sólida .....	10
1.3.3.2 Excreta líquida .....	11
1.3.4 Agua residual porcícola.....	11
1.3.5 Impacto ambiental de las aguas residuales porcícolas .....	12
1.4 Cultivo de microalgas y cianobacterias para el tratamiento de aguas residuales .....	13
1.5 Algas.....	13
1.5.1 Estructura vegetativa.....	15
1.5.2 Ciclo vital.....	15
1.5.3 Crecimiento .....	16



---

1.5.4 Nutrición .....	18
1.5.5 Clasificación de las algas .....	18
1.5.5.1 Algas verdes .....	18
1.5.5.2 Algas rojas .....	19
1.5.5.3 Algas pardas .....	19
1.5.5.4 Algas azul- verdosas ó cianobacterias .....	20
1.5.6 Fotosíntesis .....	21
1.5.7 Pigmentos naturales .....	22
1.5.7.1 Clorofila .....	23
1.5.7.2 Carotenoides .....	23
1.5.8 Depuración .....	24
1.6 Microalgas .....	25
1.6.1 Remediación de contaminantes .....	26
1.6.2 Otras aplicaciones .....	26
1.6.3 <i>Chlorella spp</i> .....	27
1.7 Cianobacterias .....	29
1.7.1 <i>Spirulina maxima</i> .....	29
1.8 Sistemas y condiciones de cultivo .....	31
1.8.1 Metabolismo .....	31
1.8.2 Sistemas de cultivo .....	32
1.8.3 Luz .....	32
1.8.4 Temperatura .....	32
1.8.5 Mezcla .....	33
1.8.6 pH .....	34

---

1.8.7 Nutrientes.....	34
1.8.8 Pastoreo y depredación .....	34
1.8.9 Reducción de compuestos contaminantes desde aguas residuales .....	35
1.9 Avances .....	35
<b>CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>40</b>
2.1 Metodología experimental.....	40
2.2 Obtención del efluente de origen porcícola.....	42
2.3 Caracterización y acondicionamiento del efluente porcícola .....	43
2.3.1 Caracterización del efluente porcícola crudo .....	43
2.3.2 Acondicionamiento del efluente crudo porcícola .....	44
2.4 Propagación de las especies <i>Spirulina maxima</i> y <i>Chlorella spp</i> en fotobiorreactores con nutrientes sintéticos.....	45
2.4.1 Especie <i>Spirulina maxima</i> .....	45
2.4.2 Especie <i>Chlorella spp</i> .....	46
2.4.3 Condiciones de propagación de las especies .....	46
2.5 Pruebas experimentales para la remoción de nutrientes en efluentes de origen porcícola .....	47
2.5.1 Diseño experimental unifactorial .....	47
2.5.2 Condiciones de operación de las pruebas experimentales para la remoción simultanea de nutrientes .....	48
2.5.3 Parámetros evaluados durante y después de la operación de las pruebas experimentales.....	50
2.5.3.1 pH .....	52
2.5.3.2 Sólidos Totales (ST) .....	52
2.5.3.3 Sólidos Totales Volátiles (STV) .....	52

---

2.5.3.4 Sólidos Suspendidos Totales (SST) .....	53
2.5.3.5 Demanda Química de Oxígeno Total (DQO <sub>T</sub> ) .....	54
2.5.3.6 Nitrógeno total .....	54
2.5.3.7 Fósforo total.....	55
2.5.3.8 Coliformes fecales .....	55
2.5.3.9 Concentración celular: cámara de Neubauer.....	55
2.5.3.10 Biomasa: Peso seco .....	57
2.6 Determinación de parámetros cinéticos.....	57
2.6.1 Parámetros cinéticos en la degradación de nutrientes.....	57
2.6.1.1 Estimación de los parámetros cinéticos de la ecuación de Monod....	59
2.6.2 Parámetros cinéticos de desarrollo poblacional .....	60
2.6.2.1 Tasa de crecimiento celular .....	60
2.6.2.2 Tiempo de duplicación ( $t_d$ ) .....	60
2.6.2.3 Número de generaciones (ng): .....	61
2.6.2.4 Rendimiento de la biomasa .....	61
2.6.2.5 Productividad de la biomasa.....	61
2.7 Análisis estadístico y discusión de resultados obtenidos.....	62
<b>CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>64</b>
3.1 Etapa 1 Caracterización del efluente porcícola.....	64
3.1.1 Caracterización del efluente porcícola crudo .....	64
3.1.2 Caracterización del efluente porcícola acondicionado .....	65
3.1.3 Caracterización del efluente porcícola diluido de la mejor prueba previa..	66
3.2 Etapa 2 Propagación de las especies <i>Spirulina maxima</i> y <i>Chlorella spp</i> en fotobiorreactores con nutrientes sintéticos.....	69

---

3.2.1 Cianobacteria: <i>Spirulina maxima</i> .....	70
3.2.2 Microalga: <i>Chlorella spp</i> .....	71
3.3 Etapa 3 Pruebas experimentales para la remoción simultanea de nitrógeno y fósforo en efluentes de origen porcícola, empleando las especies <i>Spirulina maxima</i> y <i>Chlorella spp</i> .....	71
3.3.1 Degradación de nitrógeno durante el desarrollo de <i>Spirulina maxima</i> .....	71
3.3.2 Degradación de nitrógeno durante el desarrollo de <i>Chlorella spp</i> .....	73
3.3.3 Degradación de fósforo durante el desarrollo de <i>Spirulina maxima</i> .....	75
3.3.4 Degradación de fósforo durante el desarrollo de <i>Chlorella spp</i> .....	76
3.4 Etapa 4 Caracterización del efluente tratado y evaluación de la calidad. ....	78
3.4.1 Monitoreo de pH durante el desarrollo de <i>Spirulina maxima</i> .....	78
3.4.2 Monitoreo de pH durante el desarrollo de <i>Chlorella spp</i> . ....	79
3.4.3 Monitoreo de DQO durante el desarrollo de <i>Spirulina maxima</i> .....	80
3.4.4 Monitoreo de DQO durante el desarrollo de <i>Chlorella spp</i> .....	81
3.4.5 Caracterización del efluente tratado biológicamente por medio de la <i>Spirulina maxima</i> .....	82
3.4.6 Caracterización del efluente tratado biológicamente por medio de <i>Chlorella spp</i> .....	85
3.5 Etapa 5 Evaluación del desarrollo poblacional de las especies <i>Spirulina maxima</i> y <i>Chlorella spp</i> .....	86
3.5.1 Crecimiento celular durante el desarrollo de <i>Spirulina maxima</i> .....	86
3.5.2 Crecimiento celular durante el desarrollo de <i>Chlorella spp</i> . ....	88
3.5.3 Producción de biomasa de <i>Spirulina maxima</i> .....	89
3.5.4 Producción de biomasa de <i>Chlorella spp</i> .....	91
3.6 Determinación de parámetros cinéticos en la degradación de nutrientes.....	92

---

3.6.1 Parámetros cinéticos en la degradación de nitrógeno por medio de <i>Spirulina maxima</i> .....	92
3.6.2 Parámetros cinéticos en la degradación de nitrógeno por medio de <i>Chlorella spp</i> .....	93
3.6.3 Parámetros cinéticos en la degradación de fósforo por medio de <i>Spirulina maxima</i> .....	93
3.6.4 Parámetros cinéticos en la degradación de fósforo por medio de <i>Chlorella spp</i> .....	94
3.7 Análisis estadístico de los resultados obtenidos.....	95
3.7.1 Degradación de nitrógeno total por medio de <i>Spirulina maxima</i> .....	95
3.7.2 Degradación de nitrógeno por medio de <i>Chlorella spp</i> .....	96
3.7.3 Degradación de fósforo por medio de <i>Spirulina maxima</i> .....	98
3.7.4 Degradación de fósforo por medio de <i>Chlorella spp</i> . ....	99
3.7.5 Crecimiento celular de <i>Spirulina maxima</i> .....	100
3.7.6 Crecimiento celular de <i>Chlorella spp</i> .....	101
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>104</b>
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>108</b>
<b>ANEXO A</b> .....	<b>110</b>
<b>ANEXO B</b> .....	<b>113</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>116</b>



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Producción mundial de carne de cerdo, 2006-2017 (FIRA, 2017). .....	5
Figura 1.2 Principales estados productores de carne de cerdo, 2014-2016 (FIRA, 2017).....	6
Figura 1.3 Ciclo vital de un alga unicelular ( <i>Chlamydomonas</i> ) (Tortora et al., 2007). 16	
Figura 1.4 Curva representativa de crecimiento de un cultivo (microalgas) (Romo, 2002).....	17
Figura 1.5 <i>Chlorella spp</i> .....	28
Figura 1.6 <i>Spirulina maxima</i> .....	30
Figura 1.7 Temperatura optima en condiciones de cultivo (Plasencia, 2012) .....	33
Figura 2.1 Metodología .....	40
Figura 2.2 Tanque séptico de la granja porcícola de Mariano Escobedo, Veracruz, Mexico.....	42
Figura 2.3 Tamiz 20 $\mu\text{m}$ .....	44
Figura 2.4 Centrifugadora.....	44
Figura 2.5 Efluente porcícola (a) crudo, (b) acondicionado.....	45
Figura 2.6 Montaje de cinéticas de crecimiento de la cianobacteria <i>Spirulina maxima</i> .....	49
Figura 2.7 Montaje de cinéticas de crecimiento de la microalga <i>Chlorella spp</i> .....	49
Figura 2.8 Pruebas experimentales con <i>Spirulina maxima</i> en el último día de cinéticas .....	51
Figura 2.9 Pruebas experimentales con <i>Chlorella spp</i> en el último día de cinéticas .	51
Figura 2.10 Detalle de la rejilla de una cámara de Neubauer (Celeromics, 2013 citado en Gonzalez, 2015).....	56
Figura 2.11 El efecto de la concentración sustrato (S) sobre la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) .....	58
Figura 2.12 Diagrama de Lineweaver-Burk.....	59
Figura 3.1 Propagación de <i>Spirulina maxima</i> (superior) y <i>Chlorella spp</i> (inferior).....	70
Figura 3.2 Células de <i>Spirulina maxima</i> vistas desde microscopio. A) 40x B) 100x	70

Figura 3.3 Células de <i>Chlorella spp</i> vistas desde microscopio. A) 40x B) 100x.....	71
Figura 3.4 Remoción de nitrógeno por <i>Spirulina maxima</i> .....	72
Figura 3.5 Remoción de nitrógeno por <i>Chlorella spp</i> . ....	74
Figura 3.6 Remoción de fósforo por <i>Spirulina maxima</i> .....	76
Figura 3.7 Remoción de fósforo por <i>Chlorella spp</i> . ....	77
Figura 3.8 Monitoreo de pH con <i>Spirulina maxima</i> .....	78
Figura 3.9 Monitoreo de pH con <i>Chlorella spp</i> . ....	79
Figura 3.10 Monitoreo de DQO con <i>Spirulina máxima</i> .....	80
Figura 3.11 Monitoreo de DQO con <i>Chlorella spp</i> .....	81
Figura 3.12 Concentración celular durante el desarrollo de <i>Spirulina maxima</i> .....	87
Figura 3.13 Concentración celular durante el desarrollo de <i>Chlorella spp</i> . ....	89
Figura 3.14 Biomasa <i>Spirulina maxima</i> .....	90
Figura 3.15 Biomasa <i>Chlorella spp</i> . ....	91
Figura 3.16 ANOVA de cinéticas al 25%, 50% y 75% de agua residual porcícola/ <i>Spirulina maxima</i> . (Degradación de N <sub>T</sub> ) .....	96
Figura 3.17 Método de Tukey-Kramer de cinéticas al 25%, 50% y 75% de agua residual porcícola/ <i>Spirulina maxima</i> . (Degradación de N).....	96
Figura 3.18 ANOVA de cinéticas al 25%, 50% y 75% de agua residual porcícola/ <i>Chlorella spp</i> . (Degradación de N) .....	97
Figura 3.19 Método de Tukey-Kramer de cinéticas al 25%, 50% y 75% de agua residual porcícola/ <i>Chlorella spp</i> . (Degradación de N) .....	97
Figura 3.20 ANOVA de cinéticas al 25%, 50% y 75% de agua residual porcícola/ <i>Spirulina maxima</i> . (Degradación de P).....	98
Figura 3.21 Método de Tukery-Kramer de cinéticas al 25%, 50% y 75% de agua residual porcícola/ <i>Spirulina maxima</i> . (Degradación de P).....	98
Figura 3.22 ANOVA de cinéticas al 25%, 50% y 75% de agua residual porcícola/ <i>Chlorella spp</i> . (Degradación de P) .....	99
Figura 3.23 Método de Tukey-Kramer de cinéticas al 25%, 50% y 75% de agua residual porcícola/ <i>Chlorella spp</i> . (Degradación de P) .....	100

Figura 3.24 ANOVA de cinéticas al 25%, 50% y 75% de agua residual porcícola/  
*Spirulina maxima*. (Crecimiento celular)..... 100

Figura 3.25 Método de Tukey-Kramer de cinéticas al 25%, 50% y 75% de agua  
residual porcícola/ *Spirulina maxima*. (Crecimiento celular)..... 101

Figura 3.26 ANOVA de cinéticas al 25%, 50% y 75% de agua residual porcícola/  
*Chlorella spp.* (Crecimiento celular) ..... 102

Figura 3.27 Método de Tukey- Kramer de cinéticas al 25%, 50% y 75% de agua  
residual porcícola/ *Chlorella spp.* (Crecimiento celular) ..... 102

---

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1 Producción diaria de excretas según el tipo de cerdo (Mariscal (2004) citado por Domínguez-Araujo et al. (2014)) .....	9
Tabla 1.2 Características principales de las algas (Tortora et al., 2007).....	14
Tabla 1.3 Estado de la producción de microalgas en 2010 (Brennan, 2010) .....	27
Tabla 1.4 Clasificación científica <i>Chlorella</i> .....	28
Tabla 1.5 Clasificación científica <i>Spirulina</i> .....	30
Tabla 2.1 Parámetros empleados para la caracterización del efluente .....	43
Tabla 2.2 Datos generales de la cepa de <i>Spirulina máxima</i> . .....	46
Tabla 2.3 Condición de operación en el diseño unifactorial .....	47
Tabla 2.4 Descripción de fotobiorreactores utilizados .....	48
Tabla 2.5 Concentraciones propuestas para la propagación de las especies.....	48
Tabla 2.6 Parámetros evaluados en las cinéticas de remoción de nutrientes y crecimiento.....	50
Tabla 3.1 Caracterización fisicoquímica y microbiológica del efluente porcícola crudo .....	64
Tabla 3.2 Caracterización fisicoquímica y microbiológica del efluente porcícola acondicionado.....	65
Tabla 3.3 Caracterización del efluente porcícola diluido de la mejor prueba previa..	67
Tabla 3.4 Resumen de la caracterización de los efluentes porcícolas en comparación con los valores de límites permisibles de acuerdo a PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017.....	68
Tabla 3.5 Caracterización de los efluente porcícola tratados biológicamente por medio de <i>Spirulina maxima</i> en comparación con los valores de límites permisibles de acuerdo a PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017.....	83
Tabla 3.6 Porcentaje de remoción de los valores promedios de la caracterización de EPC con los valores promedio de EPTB por medio de <i>Spirulina maxima</i> de las tres concentraciones de experimentación.....	84

Tabla 3.7 Caracterización de los efluente porcícola tratados biológicamente por medio de <i>Chlorella spp</i> en comparación con los valores de límites permisibles de acuerdo a PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017. ....	85
Tabla 3.8 Porcentaje de remoción de los valores promedios de la caracterización de EPC con los valores promedio de EPTB por medio de <i>Chlorella spp</i> de las tres concentraciones de experimentación. ....	86
Tabla 3.9 Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>Spirulina maxima</i> para cada concentración. ....	88
Tabla 3.10 Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>Chlorella spp</i> para cada concentración. ....	89
Tabla 3.11 Productividad obtenida por <i>Spirulina maxima</i> .....	90
Tabla 3.12 Productividad obtenida por <i>Chlorella spp</i> .....	92
Tabla 3.13 Parámetros cinéticos de degradación de nitrógeno en las pruebas experimentales con <i>Spirulina maxima</i> .....	93
Tabla 3.14 Parámetros cinéticos de degradación de nitrógeno en las pruebas experimentales con <i>Chlorella spp</i> .....	93
Tabla 3.15 Parámetros cinéticos de degradación de fósforo en las pruebas experimentales con <i>Spirulina maxima</i> .....	94
Tabla 3.16 Parámetros cinéticos de degradación de fósforo en las pruebas experimentales con <i>Chlorella spp</i> .....	94



## NOMENCLATURA

DQO <sub>T</sub>	Demanda química de oxígeno total
N <sub>T</sub>	Nitrógeno total
NMP	Número más probable
P <sub>T</sub>	Fósforo total
rpm	Revoluciones por minuto
SST	Sólidos suspendidos totales
% v/v	Por ciento volumen-volumen

## INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, México ocupa la novena posición, con una participación del 1.3 por ciento en la producción mundial de carne porcícola, con 1.4 millones de toneladas (FIRA, 2017). En México, la porcicultura es considerada como la tercer actividad ganadera (SAGARPA, 2016), con una producción de cerdos en el 2016 de 19.2 millones de cabezas (FIRA, 2017).

Sin embargo, esta agroindustria presenta problemas ambientales y sociales debido a la contaminación de las aguas y del suelo que se hallan a su alrededor (Garzón-Zúñiga and Buelna, 2014). El incremento de la producción animal ha conllevado a diferentes problemas de contaminación por el aumento de la densidad de animales y la carencia o ineficiencia en el tratamiento de los desechos o excretas (heces y orina) que se originan durante el proceso (Trejo Lizama et al., 2014). Estos desechos son los componentes principales de una mezcla que son acarreados por el agua de lavado, junto con otros componentes como agua, alimento desperdiciado, cama, suelo y otras partículas, a esta mezcla de residuos sólidos y líquidos se le conoce como agua residual porcícola (De la Mora-Orozco et al., 2014)

Las aguas residuales porcícolas son una de las fuentes de contaminación importantes cuando se descargan en la naturaleza sin tratamiento previo, su liberación al medio ambiente provoca graves problemas de contaminación (Mezzomo et al., 2010). La alta concentración de nutrientes favorece el crecimiento masivo de algas, las cuales no permiten el paso de la luz solar, impidiendo con esto que se lleve a cabo el proceso de fotosíntesis, dando como resultado el agotamiento del  $O_2$  disuelto, favoreciendo la proliferación de organismos indeseables, y en el peor de los casos provocando la eutrofización de los cuerpos de agua (De la Mora Orozco et al., 2014). La eutrofización de cuerpos de agua se presenta como un problema prioritario a nivel mundial que afecta la mayoría de las aguas superficiales en la actualidad.

Las microalgas se han encontrado en el centro de interés en los últimos años como un sistema alternativo para el tratamiento biológico de aguas residuales con diferentes aplicaciones en el tratamiento de aguas residuales. Proveen una alternativa para la remoción de contaminantes (N y P) de las aguas residuales, disminuir la eutrofización en los medios acuáticos, mientras que producen biomasa que puede ser empleada para la obtención de biomasa alimenticias y sustancias químicas de alto valor (Delgadillo-Mirquez et al., 2016).

Sin embargo, este gran problema puede transformarse en una oportunidad, ya que las aguas residuales se pueden presentar como medio de cultivo factible para la producción de biomasa microalgal. México como uno de los principales países productores de cerdo, necesita de la implementación de sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales, y la utilización de microalgas tiene grandes beneficios como la obtención de aguas que garanticen valores de nutrientes permisibles de acuerdo al proyecto de modificación de la Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017, para ser liberadas a cuerpos de agua, o para emplear estos efluentes para diversos usos (agua de riego, aguas recreativas sin contacto directo humano, reutilización industrial, etc.).

Es por ello que esta investigación tiene como objetivo evaluar el efecto de *Spirulina maxima* y *Chlorella spp* en la remoción de nitrógeno y fósforo presentes en aguas residuales de origen porcícola. Para dicho objetivo se deberán cumplir los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar los efluentes de origen porcícola en términos de nutrientes,
- Determinar parámetros cinéticos de degradación de nitrógeno y fósforo durante el desarrollo de *Spirulina maxima* y *Chlorella spp*, y
- Determinar la cinética de desarrollo poblacional de *Spirulina maxima* y *Chlorella spp*. durante la degradación de nutrientes contenidos en aguas residuales de origen porcícola.

# **CAPÍTULO 1**

## **FUNDAMENTOS TEÓRICOS**



## **CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS**

### **1.1 Ganado porcino**

La crianza y producción de cerdo, a pesar de las prohibiciones religiosas, se da en casi todo el mundo, con la finalidad de obtener alimento cárnico, que posee buenas características nutricionales y un buen sabor. Los cerdos crecen y maduran con rapidez, tienen un periodo de gestación corto (114 días), de las madres se obtienen camadas numerosas, son omnívoros y consumen una gran variedad de alimentos convirtiendo los cereales y leguminosas en carne (Domínguez-Araujo et al., 2014).

Por muchos años la carne de cerdo fue considerada un alimento poco nutritivo, “pesado”, y en general, se asociaba con enfermedades y parásitos. Sin embargo, en los últimos 25-30 años aproximadamente, la carne de porcino ha disminuido cerca del 31% el contenido de grasa, 14% en calorías y 10% en colesterol, resultado del avance tecnológico en la porcicultura mundial. Además, el control zoonosario de la carne de cerdo ha aumentado la percepción de salubridad e inocuidad de la carne. Así, la carne de porcino se ha colocado como una fuente nutricional valiosa, de gran calidad y sabor. Esto se ve reflejado en avances en la producción y consumo mundial y nacional de la carne (FIRA, 2012).

### **1.2 Producción porcícola**

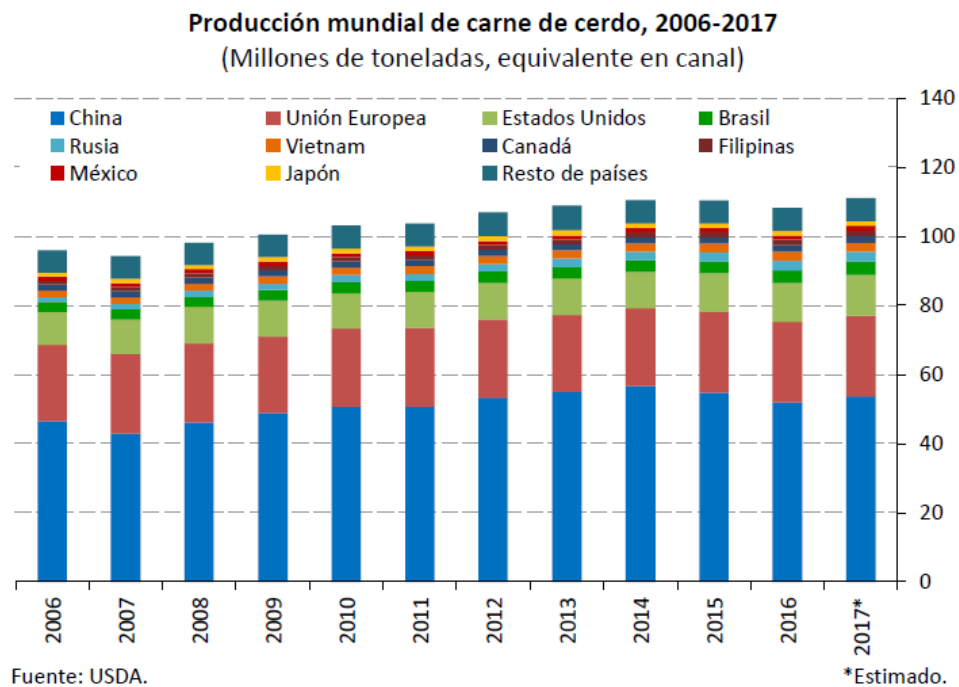
#### **1.2.1 Producción mundial**

De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (2016) la carne roja de mayor consumo mundial es la carne de cerdo, cuya demanda en las últimas décadas ha experimentado un fuerte incremento. Los factores que han influido para generar este fenómeno han sido: los cambios en los hábitos alimenticios derivados de los procesos de urbanización y del efecto “demostración” en el consumo, el crecimiento de la población y el crecimiento



del ingreso per cápita (Pérez-Espejo, 2006). Junto con el de las aves de corral, el porcino es el subsector pecuario de mayor crecimiento, con un número de animales que alcanzará los mil millones antes de 2015, el doble que en la década de 1970 (FAO, 2016).

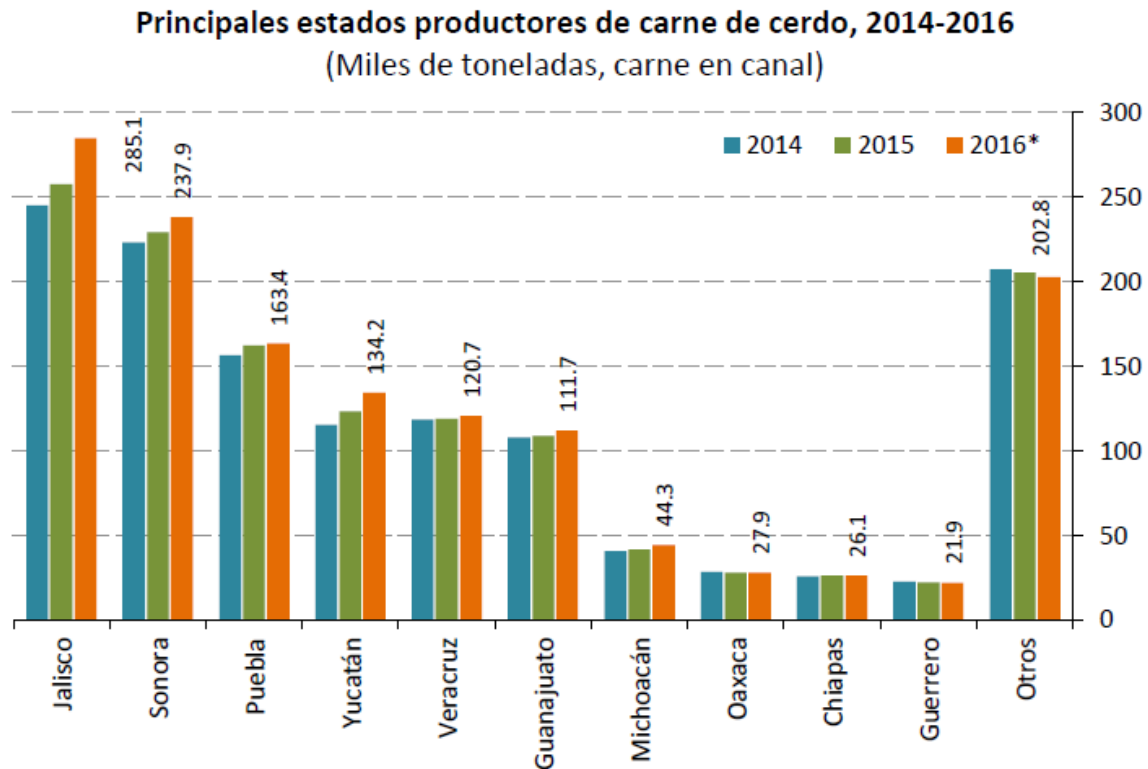
“La producción mundial de carne de cerdo creció a una tasa promedio anual de 1.6 por ciento durante el periodo 2007-2016. De acuerdo con estimaciones del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), se espera que en 2017 se ubique en un máximo histórico de 111.0 millones de toneladas, lo que representa un incremento de 2.6 por ciento con respecto al año previo” (FIRA, 2017). En 2016, China aportó 47.9, la Unión Europea 21.6, Estados Unidos 10.4 y Brasil 3.4 por ciento de la producción mundial de carne de cerdo. México se ubica en la novena posición, con un aporte del 1.3 por ciento en la producción mundial de este tipo de carne, con 1.4 millones de toneladas (FIRA, 2017). En la Figura 1.1 se presenta la producción mundial de carne de cerdo del 2006 al 2017, el año 2017 con una producción estimada.



**Figura 1.1** Producción mundial de carne de cerdo, 2006-2017 (FIRA, 2017).

## 1.2.2 Producción nacional

Durante la década actual, la producción nacional de carne de cerdo registro una tendencia creciente, con una tasa de crecimiento promedio anual de 2.2 por ciento, para en el 2016 ubicarse en 1.38 millones de toneladas. En 2016, el 76.5 por ciento de la producción nacional se concentró en seis entidades: Jalisco aportó 20.7, Sonora 17.3, Puebla 11.9, Yucatán 9.8, Veracruz 8.8 y Guanajuato 8.1 por ciento de la producción total nacional de carne de cerdo. Se prevé que para el 2017 la producción nacional de carne se ubique en 1.43 millones de toneladas, es decir, se registre un crecimiento anual de 3.8 por ciento y su nivel más alto desde 1984 (FIRA, 2017). En la Figura 1.2 se presenta la producción de los principales estados de la república mexicana productores de carne de cerdo de 2014, 2015 y 2016.



Fuente: SIAP-SAGARPA.

\*Preliminar.

**Figura 1.2** Principales estados productores de carne de cerdo, 2014-2016 (FIRA, 2017).

De acuerdo con el USDA, el sector porcino mexicano se está consolidando mediante la integración vertical en las granjas comerciales. La producción de cerdos continúa creciendo gracias al mejoramiento de la bioseguridad y la genética. Se prevé que la producción de cerdos para 2017 sea de 19.8 millones de cabezas, mayor con respecto a 19.2 millones de cabezas en 2016, lo que refleja el continuo crecimiento en el sector (FIRA, 2017).

### **1.3 Impacto ambiental de la producción porcícola**

#### **1.3.1 Problemática ambiental**

En México, la porcicultura es considerada como la tercer actividad ganadera (SAGARPA, 2016), sin embargo, esta importante agroindustria en México presenta problemas ambientales y sociales debido a la contaminación de las aguas y del suelo (Garzón-Zúñiga y Buelna, 2014) provocado por el incremento de la producción animal que ha conllevado a estos problemas por el aumento de la densidad de animales y la ineficiencia en el tratamiento de los desechos que se originan en el proceso (Trejo-Lizama et al., 2014).

#### **1.3.2 Granjas porcícolas**

La producción porcícola se efectúa en granjas tecnificadas, semitecnificadas, y no tecnificadas o también llamada de traspatio. Esta clasificación refleja diferentes maneras de manejo de los procesos productivos (automatización) y del uso del agua (nivel de dilución) (Escalante-Estrada et al., 2012).

De acuerdo a Lastra et al. (2000); Navarrete et al. (2009); FIRA (2012) y Galindo et al. (2013) citados por Domínguez-Araujo et al. (2014), las características de cada tipo de granja son:

- **Granjas tecnificadas:** Los cerdos son criados en granjas comúnmente grandes que pueden llegar a albergar a más de 100,000 cerdos de distintas edades, están situadas en instalaciones automatizadas, además de que emplean lo

último en tecnología para su producción. Generalmente los animales producidos en este tipo de instalación van a los mercados de las grandes ciudades. Los procesos de limpieza y recolección de residuos se rigen por el equipamiento que poseen estos sistemas.

- **Granjas tradicionales o semitecnificadas:** Los cerdos son criados en instalaciones de diferente tamaño, donde albergan desde 100 animales en adelante y su propósito es la venta del ganado para abasto. A diferencia de las granjas tecnificadas, estas instalaciones son tradicionales y no emplean lo último que hay en tecnología para la producción. Este tipo de producción se adapta para la implementación de buenas prácticas de manejo, dentro de la línea de producción, así como el manejo de residuos, debido a que las instalaciones se prestan para la limpieza y recolección de residuos.
- **Traspatio, sistema rural o de autoabastecimiento:** Los porcinos son criados en corrales rústicos contruidos sin tecnología alguna con materiales de la región. Este tipo de producción se da sobre todo en las zonas rurales de nuestro país y son instalaciones de pocos animales, en la mayoría de los casos no pasan de 10. En la mayoría de este tipo de sistema no existe ningún manejo de los residuos generados, más aún potencializan el grado de contaminación.

### 1.3.3 Excretas porcícolas

Conocer la población animal de la granja, es de vital importancia, es relevante calcular el número exacto de materia fecal que genera cada animal, calcular el total de excretas de todas las etapas de producción ayudara a planificar las metas y objetivos dentro de la misma explotación. De acuerdo a varios estudios realizados años atrás por Gadd (1973); Pérez (1992) y Penz (2000) citados por Domínguez-Araujo et al. (2014) para estimar la cantidad de materia fecal incluyendo las heces, orina y agua, como se muestra en la Tabla 1.1.

**Tabla 1.1** Producción diaria de excretas según el tipo de cerdo (Mariscal (2004) citado por Domínguez-Araujo et al. (2014))

	Estiércol kg/día	Estiércol + orina kg/día	Volumen L agua/día	Volumen m <sup>3</sup> /animal/mes
<b>25-100 kg</b>	2.3	4.9	7.0	0.25
<b>Hembra</b>	3.6	11.0	16.0	0.48
<b>H. lactación</b>	6.4	18.0	27.0	0.81
<b>Semental</b>	3.0	6.0	9.0	0.28
<b>Lechón</b>	0.25	0.95	1.4	0.05
<b>Promedio</b>	2.35	5.8	8.6	0.27

De acuerdo a Taiganides et al. (1996) citado por Domínguez-Araujo et al. (2014) los principales componentes de los residuos de una granja son las excretas (heces y orina), agua con excreta, alimento desperdiciado, suelo y otros elementos presentes en los corrales por lo que, conforme a su forma física se clasifica en:

- **Sólidos:** que son de forma pastosa, color café oscuro y en promedio con un 60% de humedad (excreta fresca y sin mucha presencia de orina). Estos residuos son los que se mantienen por más tiempo dentro de las instalaciones de las granjas y por la materia solida que contienen son los que tardan más en degradarse y se clasifican en:
  - **Orgánicos:** representan el 90%, compuesto de microorganismos patógenos y no patógenos, También contienen enzimas y aminoácidos, que junto con los microorganismos son considerados como materia volátil, que es la que perjudica los recursos naturales.
  - **Inorgánicos:** representan el 10% de ciertos metales (arsénico, cobre, boro, etc.) y materia inerte (cenizas), que sin tratamiento de estos residuos se acumulan, dañando a cuerpos de agua, suelo y aire.
- **Semisólidos:** es la relación de 50% sólido (excreta fresca del recto) y 50% orina, siendo una buena fuente de nutrientes y de metabolitos, pero por su forma es

difícil de manejar, existen métodos de tratamiento, y conforme al sistema de limpieza de la granja, se puede obtener de diferentes etapas productivas

- **Líquidos:** donde el agua se representa en mayor porcentaje, y que se mezcla con las excretas de acuerdo al tipo de sistema de lavado que se implementa en la granja porcina.

### 1.3.3.1 Excreta sólida

De acuerdo a Castellanos et al. (2010) citado por Domínguez-Araujo et al. (2014) las excretas sólidas son las más abundantes, el sistema de extracción afecta en la consistencia de estas, y es que la forma recomendable para conservar este tipo de excretas y la mayor cantidad de nutrientes, es por medio del barrido o paleado manual y acarreo mecánico. Sin importar cuál sea el tipo de granja, los cerdos no consumirán el 100 % de los nutrimentos ingeridos, en proporción se excreta del 45 al 60% de Nitrógeno, de 50 a 80 % del calcio y fósforo, y de 70 a 95 % del potasio, sodio, magnesio, cobre, zinc, manganeso y hierro, que sin ningún tratamiento se convierten en un problema ambiental y sanitario. Pero además se considera al residuo como una fuente potencial de nutrientes para llevar a cabo estrategias de reutilización y aminorar el impacto de estos nutrimentos sobre la contaminación de los cuerpos receptores. Los dos elementos principales a considerar en las excretas sólidas frescas, son el Nitrógeno (N) y Fósforo (P).

El nitrógeno (N) es un elemento fundamental en la producción animal, influyendo en el crecimiento y desarrollo del mismo, además este nutrimento es esencial para la mayoría de las plantas y cultivos forrajeros, la gran parte de este nutriente es excretado en el estiércol, siendo esto importante para la agricultura, volviéndose un problema cuando grandes cantidades de N se acumulan en el suelo y contribuyen al deterioro ambiental (Ruvalcaba, 2012 citado en Domínguez-Araujo et al. 2014).

El fósforo (P) en el porcino se encuentra en el sistema óseo, siendo parte fundamental en moléculas, ácidos nucleicos, fosfoproteínas, coenzimas y ligadura de

gran contenido energético (Shimada, 2009 citado por Domínguez-Araujo et al. 2014), los porcinos solo pueden aprovechar de forma natural un tercio del fósforo presente en las plantas; el resto lo excretan en las heces, esto aporta de forma significativa al aumento de la carga contaminante de las deyecciones porcinas (Kim y Lei 2005 citado por Domínguez-Araujo et al. 2014).

### **1.3.3.2 Excreta líquida**

Para definir el volumen total de agua que una granja de cerdos requiere, se considera la que los cerdos necesitan para satisfacer sus necesidades diariamente, a esto, se suma la gran cantidad de agua que se desperdicia en los corrales, por lo que se tiene que considerar cuánta agua se necesita para el lavado y desinfectado de los corrales, calculando el total de agua que necesita una granja de ciclo completo, la mezcla de esta agua y la mínima parte de excreta sólida, da como resultado la forma líquida de las excretas (Taiganides et al., 1996 citado por Domínguez-Araujo et al. 2014)

### **1.3.4 Agua residual porcícola**

Las grandes cantidades de residuos generados en una granja, son una mezcla de residuos sólidos y líquidos que son transportados por las descargas de agua utilizada para limpiar los establos, sus principales componentes son las excretas de cerdo compuestas por heces y orina, junto con otros componentes como agua, residuos de alimentación, materiales usados como cama, suelo y otras partículas, a esta mezcla de residuos sólidos y líquidos se le conoce como agua residual porcícola (de la Mora-Orozco et al. 2014) .Cerca del 82% del agua que entra a las granjas, sale como agua residual, las aguas residuales presenta una alta variación en la concentración de contaminantes dependiendo del proceso productivo (maternidad, destete, engorda, mezcla, ciclo completo), dimensión de la granja, y uso del agua (Garzón-Zúñiga y Buelna, 2014).

Los efluentes de la industria porcícola contienen una alta concentración de sólidos, materia orgánica, nitrógeno y fósforo, la cual a falta de tratamiento y bajo ciertas condiciones de tratamiento producen gases de efecto invernadero (GEI) como son: metano ( $\text{CH}_4$ ), bióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) (Escalante-Estrada et al., 2012).

La depuración del agua residual proveniente de la crianza porcina es una necesidad indispensable para conseguir un medio ambiente apto, por esta razón la cantidad de residual producido es considerable para dimensionar los tratamientos. (Chao-Espinosa et al., 2012).

### 1.3.5 Impacto ambiental de las aguas residuales porcícolas

La producción de cerdos tiene impactos negativos al agua, suelo y aire, ocasionado por la contaminación que provoca las aguas residuales sin ningún tratamiento previo (Pérez-Gutiérrez et al., 2015):

- **Contaminación del agua:** Los contaminantes procedentes de los residuos porcícolas principalmente los compuestos de nitrógeno y fósforo, materia orgánica, y sólidos suspendidos entre otros, pueden desplazarse por medio de escurrimientos y llegar hasta los cuerpos de agua superficiales como arroyos, ríos y lagos o por infiltración a mantos freáticos. La alta concentración de nutrientes favorece el crecimiento masivo de algas, las cuales no permiten el paso de la luz solar, impidiendo con esto que se lleve a cabo el proceso de fotosíntesis, dando como resultado el agotamiento del  $\text{O}_2$  disuelto, favoreciendo la proliferación de organismos indeseables, y en el peor de los casos provocando la eutrofización de los cuerpos de agua (De la Mora-Orozco et al., 2014).
- **Contaminación del aire:** se puede identificar un deterioro de la calidad del aire mediante la generación de gases tóxicos, principalmente dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), ácido sulfhídrico ( $\text{H}_2\text{S}$ ) y metano ( $\text{CH}_4$ ), , además de la generación de malos olores (Pérez-Espejo, 2006).



- **Contaminación del suelo:** un elevado volumen de excremento directamente en el suelo afecta negativamente, ya que produce cambio en el pH, causa la acumulación de nutrientes en áreas reducidas, lo cual provoca igualmente la infiltración de contaminantes como es el caso de los nitratos dañando directamente al subsuelo. Además en la capa superficial se puede provocar la acumulación de algunos elementos como sales de hierro y cobre que dañan su fertilidad (De la Mora-Orozco et al., 2014). Contaminación microbiológica en la aplicación de excretas a terrenos agrícolas (Pérez-Espejo, 2006).

#### **1.4 Cultivo de microalgas y cianobacterias para el tratamiento de aguas residuales**

El agua residual porcícola se puede emplear como medio para el crecimiento de microalgas y cianobacterias mediante aireación o digestión anaerobia. Además, los nutrientes hallados en las aguas residuales pueden convertirse en biomasa, eliminando los compuestos que causan contaminación, permitiendo la reutilización del agua después del tratamiento (Mezzomo et al., 2010).

#### **1.5 Algas**

Las algas son un conjunto heterogéneo de organismos eucariotes, fotosintéticos, con gran diversidad de formas, tamaño (desde microscópicas unicelulares hasta agregados pluricelulares de varios metros), estructura celular, metabolismo, composición química, ciclos de vida y hábitats. Presentan cloroplastos con clorofila, donde se capta la energía luminosa como fuente de energía.

Son aerobias y necesitan para su desarrollo la luz, humedad, y macroelementos. Aun cuando su hábitat principal es el acuático, también se pueden encontrar en el suelo, sobre la nieve, sobre las rocas de manantiales termales, y sobre los árboles (Olivas y Alarcón, 2004 citado por Caballero, 2013).

Las algas pueden ser definidas como organismos que efectúan la fotosíntesis oxigénica y que poseen cloroplastos. No deben confundirse con las cianobacterias, que igualmente producen oxígeno en la fotosíntesis a pesar de que son Bacteria, puesto que evolutivamente son muy diferentes a las algas.

Algunas de ellas son o bien microorganismos unicelulares o coloniales; las últimas forman agregadas extremo con extremo se dice que son filamentosas. Contienen orgánulos abundantes en clorofila (cloroplastos) y pueden vivir en medios a cargo de solo de unos cuantos minerales, CO<sub>2</sub> y luz. Contienen clorofila, por lo que, la mayoría son de color verde. Aunque algunas presentan color marrón o rojo debido a la presencia de xantofilas que enmascaran el color verde.

Las algas proliferan en hábitat acuáticos tanto dulces como salados. También están presentes en hábitat artificiales como peceras o piscinas. Igual son comunes en el suelo; algunas algas sobreviven en medios secos así como en hábitat ácidos. Por debajo de pHs 4-5, las cianobacterias no pueden desarrollarse; así que ciertas algas son los únicos microorganismos fotosintéticos oxigénicos (Madigan et al., 2004)

En la Tabla 1.2 se presenta de manera resumida las características principales de las algas.

**Tabla 1.2** Características principales de las algas (Tortora et al., 2007)

<b>Microorganismo</b>	<b>Alga</b>
<b>Reino</b>	Protista
<b>Tipo de nutrición</b>	Fotoautótrofa
<b>Multicelularidad</b>	Algunas
<b>Disposición celular</b>	Unicelulares, coloniales, filamentosos, tejidos
<b>Método para la adquisición de alimentos</b>	Difusión
<b>Características relevantes</b>	Pigmentos
<b>Formación de embrión</b>	No

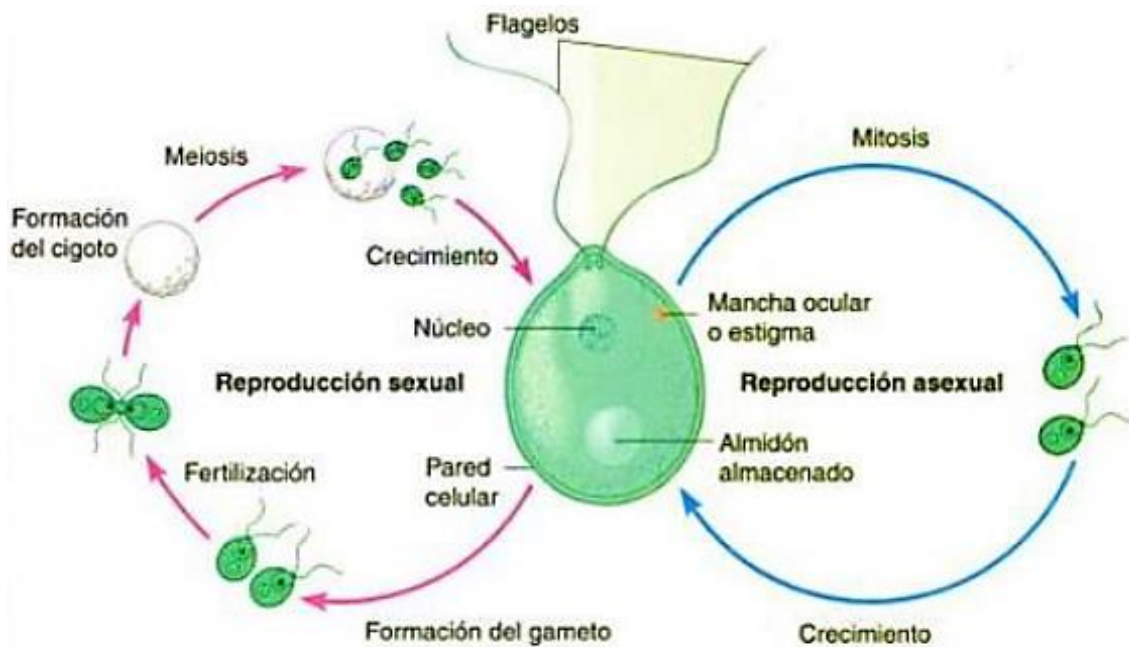
Las algas se consideran plantas talófitas, es decir, no poseen raíz, tallo y hojas; no desarrollan embrión y son organismos autótrofos, es decir, tienen la capacidad de sintetizar su propio alimento. Además de proveer cerca de la mitad de producción primaria total del mundo, de la cual dependen gran parte de los productores secundarios acuáticos, intervienen en los distintos ciclos biogeoquímicos globales, con la producción de oxígeno atmosférico y la regulación del clima (Peña et al., 2012 citado en Caballero, 2013).

### **1.5.1 Estructura vegetativa**

El cuerpo de un alga multicelular recibe el nombre de tallo. Los tallos de las algas multicelulares más grandes, mejor conocidas como algas marinas, consiste de discos de fijación ramificados (que aseguran el alga a la roca), una estructura de apoyo y a menudo estipes huecos y hojas. Las células que recubren el tallo pueden realizar la fotosíntesis. Al tallo le falta el tejido conductivo (xilema y floema) característico de las plantas vasculares; las algas absorben nutrientes del agua en toda su superficie. El estipe no está lignificado ni es leñoso de modo que no ofrece el soporte del tallo de una planta; por el contrario, el agua circundante sostiene el tallo del alga; algunas algas se conservan a flote mediante una vesícula llena de gas denominada neumoquiste (Tortora et al., 2007).

### **1.5.2 Ciclo vital**

Todas las algas pueden reproducirse de forma sexual. Las algas multicelulares con tallos y formas filamentosas pueden fragmentarse; cada fragmento es capaz de formar un tallo o filamento nuevo. Cuando un alga unicelular se divide, su núcleo se divide (mitosis) y los dos núcleos resultantes se dirigen a los extremos opuestos de la célula. Después la célula se divide en dos células completas (citocinesis). En las algas igual se presenta la reproducción sexual, como se puede observar en la Figura 1.3.



**Figura 1.3** Ciclo vital de un alga unicelular (*Chlamydomonas*) (Tortora et al., 2007).

En ciertas especies puede ocurrir reproducción asexual durante varias generaciones y luego, en distintas condiciones, la misma especie se reproduce de manera asexual. Otras especies alternan generaciones de forma que la descendencia resultante de la reproducción sexual se reproduce de forma asexual y la generación siguiente lo hace de forma sexual (Tortora et al., 2007).

### 1.5.3 Crecimiento

Independientemente del tipo de especie y volumen al que es cultivada se reconoce un patrón estándar de crecimiento indicado por las siguientes fases (Figura 1.4):

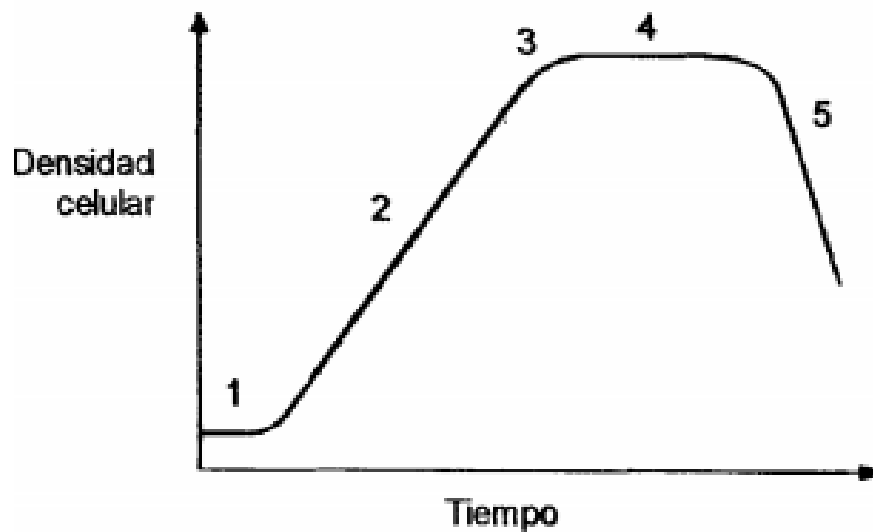
- 1. Fase de adaptación:** En el cual no ocurre incremento en el número de células, pudiendo inclusive llegar a disminuir en número en relación con el inoculo inicial.
- 2. Fase exponencial:** una vez que se adaptan al medio de cultivo, las microalgas empiezan a multiplicarse; debido a que la división da lugar a nuevas células que son

capaces de dividirse, el aumento en número de microalgas se acelera continuamente de manera exponencial.

**3. Fase de declinación relativa de crecimiento:** en esta fase, conforme el cultivo va creciendo se da una disminución de nutrientes, cambios de pH y alteración de otros factores como resultado del incremento de la población; por tanto las microalgas disminuyen su tasa de división celular.

**4. Fase estacionaria:** ya no se aprecia una división celular neta, esto es que el número de células alcanzado se conserva de forma constante por un periodo de tiempo debido al balance entre la natalidad y la mortalidad que presenta la población en cultivo.

**5. Fase de muerte:** las células pueden permanecer en la fase anterior semanas e incluso hasta meses, aun cuando lo más normal es que empiecen a morir, es entonces cuando se presenta esta fase.



**Figura 1.4** Curva representativa de crecimiento de un cultivo (microalgas) (Romo, 2002).

Para el estudio de la productividad de las microalgas los modelos cinéticos son una herramienta esencial, ya que no solo proporcionan una base para el diseño del

reactor, sino también para el mejoramiento de procesos a través de facilitar la exploración de distintas condiciones ambientales y de funcionamiento (García-Gozalbes et al., 2015).

#### **1.5.4 Nutrición**

Algas es un nombre común que abarca varios filos. Casi todas las algas son fotosintéticas; no obstante los oomicetos, o algas similares a hongos, son quimioheterótrofos. Las algas fotosintéticas se localizan a lo largo de la zona fótica (luminosa) de las amplias masas de agua. La clorofila a (un pigmento que capta la luz) y los pigmentos accesorios que participan en la fotosíntesis son lo que determinan los colores propios de diversas algas (Tortora et al., 2007).

#### **1.5.5 Clasificación de las algas**

En la clasificación, se estima un número de entre cuatro y nueve clasificaciones, según el autor. Esta variación es aclarada en parte por la postura asignada a las algas azul-verdosas, consideradas actualmente como un tipo de bacterias por sus características y tipo de célula procariótica (un tipo de célula con menor grado evolutivo); agregado a este grupo se identifican tres grupos de algas eucarióticas (un tipo de célula con mayor grado evolutivo): las algas verdes (Chlorophyta), algas rojas (Rhodophyta) y las algas pardas (Phaeophyta) (Peña et al., 2005 citado por Caballero, 2013).

##### **1.5.5.1 Algas verdes**

Poseen paredes celulares de celulosa, contienen clorofila a y b, y almacenan almidón al igual que las plantas. Se piensa que dieron origen a las plantas terrestres. La mayoría son microscópicas, sin embargo pueden ser unicelulares o multicelulares. Ciertas clases filamentosas producen el verdín de los estanques (Tortora et al., 2007).

Se encuentran presentes en todos los ambientes acuáticos como los ríos, lagos y mares. En esta división existen dos grupos importantes llamados generalmente diatomeas y dinoflagelados. Los dos subgrupos se distribuyen ampliamente en aguas saladas y dulces, juegan un papel principal como constituyente de la vegetación acuática (Peña et al., 2005 citado por Caballero, 2013).

### **1.5.5.2 Algas rojas**

Poseen tallos ramificados delicados y pueden vivir a grandes profundidades que las otras algas. Los tallos de algunas forman recubrimientos semejantes a costras que cubren las rocas, conchas y caparazones. Los pigmentos rojos facilitan que las algas rojas absorban la luz azul que ingresa en las partes más profundas del océano. El agar empleado en los medios microbiológicos se obtiene de muchas de estas algas. Otro material gelatinoso, el carragenano, resulta de una especie de alga roja denominada musgo de Irlanda. El carragenano y el agar pueden ser ingredientes espesantes agregados a la leche condensada, los helados y los productos farmacéuticos (Tortora et al., 2007).

Son llamadas florídeas por su almidón de reserva. Su principal particularidad es que no poseen ningún tipo de flagelo y por la existencia de un pigmento fotosintético característico llamado ficobilina (ficoeritrina y ficocianina) que otorga el color propio a las algas rojas. Sus células contienen igualmente otros pigmentos como los carotenos y las xantofilas que se presentan también en la zanahoria (Caballero, 2013).

### **1.5.5.3 Algas pardas**

Son macroscópicas; algunos logran longitudes de 50 m. en mayor parte se encuentran presentes en las aguas costeras y presentan una velocidad de crecimiento excepcional. Tan solo algunas crecen a un ritmo que supera los 20 cm por día y por eso pueden cosecharse de modo regular. La algina (alginato), un espesante utilizado en muchos alimentos (por ejemplo, helados y productos de

repostería), se obtiene de sus paredes celulares. La algina igual se emplea en la producción de una gran variedad de artículos no alimentarios, como por ejemplo neumáticos y lociones para manos (Tortora et al., 2007).

Su nombre se debe a la coloración predominante: definida en gran parte por los tipos de pigmentos: clorofila a, c, beta-caroteno, violaxatina y fucoxantina. Se compone de un grupo importante con alrededor de 1500 especies, no presentan formas unicelulares ni etapas vegetativas (no reproductivas) móviles. La reserva alimenticia principal es la laminarina, un polímero de la glucosa que es el principal azúcar de las plantas. Asimismo cuenta como reserva en su pared celular con el ácido algínico que posee un elevado valor comercial y es empleado como emulsificante y estabilizante en la industria alimenticia y farmacéutica (Peña et al., 2005 citado en Caballero, 2013).

#### **1.5.5.4 Algas azul- verdosas ó cianobacterias**

Las cianobacterias, nombrada así por su pigmentación azul verdosa (cian) característica alguna vez recibieron el nombre de algas azul verdosas. Pese a que se asemejan a las algas eucariontes y por lo regular habitan los mismos nichos ambientales, se trata de una denominación errónea porque son bacterias, no algas. Realizan la fotosíntesis con producción de oxígeno (oxigénica), como lo hacen las plantas y las algas eucariontes. Pueden fijar el nitrógeno de la atmósfera, en la mayoría de los casos esta función se ubica en células especializadas denominadas heteroquistes, que contienen enzimas que fijan el gas nitrógeno ( $N_2$ ) en el amonio ( $NH_4^-$ ) que puede ser empleado por la célula que está creciendo. Las especies que se desarrollan en el agua suelen tener vacuolas de gas que les facilitan flotabilidad, desplazamiento y ayudan a que la célula flote en un ambiente favorable. Presentan variaciones morfológicas entre las que figuran formas unicelulares que se dividen por simple fisión binaria, formas coloniales que se dividen por fisión múltiple y formas filamentosas que se reproducen por fragmentación de los filamentos (Tortora et al., 2007).



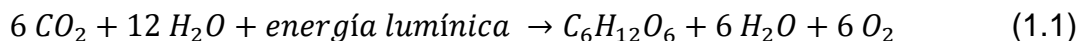
### 1.5.6 Fotosíntesis

Existen dos tipos de fotosíntesis, una anoxigénica, que es llevada a cabo por bacterias que utilizan la energía de la luz para extraer los protones y electrones de una gran variedad de moléculas donadoras, como el sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) obtenido de aguas termales ricas en sulfuro, para reducir el  $CO_2$  para formar moléculas orgánicas. La segunda es la fotosíntesis oxigénica que es producida tanto por microorganismos procariotas (cianobacterias) y eucariotas (algas) (Sánchez-García, 2013).

La fotosíntesis es un proceso que utilizan las plantas y numerosos microorganismos en el que sintetizan compuestos orgánicos complejos a partir de sustancias inorgánicas simples. En esencia la fotosíntesis es la conversión de energía lumínica en energía química. Ulteriormente la energía química se utiliza para convertir el  $CO_2$  procedente de la atmosfera en compuestos carbónicos más reducidos, sobre todo azúcares. El término fotosíntesis simplifica el proceso: foto que significa luz y síntesis se refiere a la producción de compuestos orgánicos. La síntesis de azúcares a través de la utilización de átomos de carbono provenientes del  $CO_2$  igual se conoce con el nombre de fijación del carbono. La conservación de la vida tal como la conocemos en la tierra depende del reciclado del carbono a través de este proceso. Las cianobacterias, las algas y las plantas verdes participan a este reciclado vital con la fotosíntesis.

Las plantas, las algas y las cianobacterias usan agua como fuente de hidrógeno y liberan  $O_2$ .

La fotosíntesis se puede resumir en la siguiente Ecuación (1.1):



Durante la fotosíntesis se extraen electrones de los átomos de hidrógeno (moléculas con escasa cantidad de energía) y se incorporan al azúcar (molécula de alta

energía). De esta forma la energía lumínica es indirectamente responsable del refuerzo energético (Tortora et al., 2007).

Los organismos que llevan a cabo la fotosíntesis se llaman fotótrofos. La mayor parte de los organismos fototróficos son igual autótrofos, en otras palabras son capaces de desarrollarse con  $\text{CO}_2$  como única fuente de carbono. La energía de la luz se usa en tal caso para la reducción del  $\text{CO}_2$  a compuestos orgánicos. Hay igual algunos fotótrofos que utilizan la luz como fuente de energía, pero que utilizan carbono orgánico como fuente de carbono; representan un estilo de vida denominado fotoheterótrofo. La capacidad de llevar a cabo la fotosíntesis, depende de la presencia de pigmentos fotosensibles, las clorofilas, que se encuentran en las plantas, algas y algunas bacterias (Madigan et al., 2004).

La fotosíntesis tiene lugar en dos estadios. El primer estadio, que recibe el nombre de reacciones dependientes de la luz (o lumínicas), la energía lumínica se emplea para convertir el ADP y el (P) en ATP. Asimismo en las formas predominantes de reacciones dependientes de la luz el transportador de electrones  $\text{NADP}^+$  es reducido a NADPH. Al igual que NADH, la coenzima  $\text{NADP}^+$  reducida (NADPH) es un transportador de electrones con alto contenido de energía. En el segundo estadio, designado con el nombre de reacciones independientes de la luz (u oscura), estos electrones se emplean junto con la energía derivada del ATP para reducir  $\text{CO}_2$  a azúcar (Tortora et al., 2007).

### **1.5.7 Pigmentos naturales**

Martínez-Silva (2010) citado por González-Falfán (2013) menciona que los pigmentos fotosintéticos microalgales pueden ser clasificados en tres grupos: la clorofila, los carotenoides y las ficobilinas, siendo que, cada uno difiere en su composición química y presenta diferente capacidad de absorción de la luz en una determinada longitud de onda.

Las clorofilas (pigmentos verdes) y carotenoides (pigmentos de color amarillo o naranja) son lipofílicos y se asocian en los complejos de clorofila-proteína, mientras que ficobilinas son hidrófilicas (Sánchez-García, 2013). Limnología (2007) citado por González-Falfán (2013) menciona que la concentración de pigmentos fotosintéticos varía ampliamente y depende del metabolismo algal y de factores fisicoquímicos como la luz, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes.

#### **1.5.7.1 Clorofila**

La clorofila a es el pigmento involucrado directamente en la transformación de la energía lumínica en energía química. Absorbe en la región del rojo (650-700 nm) y azul (400-500 nm). Las células fotosintéticas casi siempre contienen un segundo tipo de clorofila, la clorofila b, con un espectro de absorción ligeramente diferente. También existe una clorofila c, la cual se puede hallar en algas pardas. El contenido de clorofila del alga fitoplanctónica es entre el 1 y 2% en peso seco (Ruiz-Martínez, 2011).

Plant and Soil Sciences eLibraryPRO (2015) citado por González-Falfán (2013) menciona que las clorofilas, no absorben fotones en la región verde del espectro (entre los 500 y 600 nm), siendo este el color que se refleja o se transmite. La estructura de la clorofila incluye una larga cadena hidrofóbica que se encuentra unida al anillo tetrapirrólico por un enlace tipo éster. Un tetrapirrol se compone de cuatro unidades de pirroles (un anillo heterocíclico y aromático de cinco miembros con la fórmula  $C_4H_5N$ ) enlazadas por medio de un átomo metálico. Esta cadena es un grupo fitol que hace a la molécula de clorofila insoluble en agua, para mantener a las moléculas de clorofila localizadas dentro de las membranas fotosintéticas del cloroplasto.

#### **1.5.7.2 Carotenoides**

Cañizares-Villanueva y Perales (2012) citado por González-Falfán (2013) mencionan que los carotenoides, son el grupo más representativo de los tetraterpenos, son

moléculas con capacidad de absorber energía luminosa en la región del azul (400-500 nm), debido a la presencia de múltiples enlaces dobles conjugados. Estos compuestos están constituidos por carbono e hidrógeno y presentan colores en el rango del amarillo al rojo. Se encuentran principalmente en las bacterias purpúreas, y se dividen en carotenos y xantofilas (Ruiz-Martínez, 2011).

Primo-Yúfera (2007) citado por González-Falfán (2013) menciona que los carotenoides son colorantes poliénicos rojos y amarillos cuya molécula posee un grupo cromóforo de dobles enlaces conjugados en una cadena alifática ramificada (grupos metilos), formada por ocho restos de isopreno, por lo que son tetraterpenos. Algunos son lineales pero la mayor parte tienen uno o dos ciclos. Los carotenoides resultan de sustituir, en los carotenos algunos de los hidrógenos por grupos oxhidrilo, carbonilo, epóxido o carboxilo.

### **1.5.8 Depuración**

La fitorremediación se caracteriza por ser una práctica de limpieza pasiva y estéticamente agradable que aprovechan la capacidad de las plantas y la energía solar para el tratamiento de una gran variedad de contaminantes del medio ambiente. En este método las plantas intervienen como trampas o filtros biológicos que corrompen los contaminantes y estabilizan las sustancias metálicas halladas en el suelo y agua, al fijarlos en sus raíces y tallos, o metabolizándolos tal como lo hacen los microorganismos para finalmente convertirlos en composiciones menos peligrosas y más estables, como dióxido de carbono, agua y sales minerales (Arias-Martínez et al., 2010).

Las algas pueden asimilar considerables cantidades de nutrientes disueltos (orgánicos e inorgánicos), generalmente con preferencia para el amoníaco (Da Cruz-Coelho et al., 2014). La fitorremediación lleva asociada una producción de biomasa, ya sea ésta plantas superiores (filtros verdes, etc.), macroalgas o microalgas (Ruiz-Martínez, 2011).

## 1.6 Microalgas

Bajo el término de microalgas, se incluye a todos los microorganismos multicelulares simples y unicelulares, incluidas las microalgas procariotas, es decir, las cianobacterias (Cloroxibacterias), y las microalgas eucariotas, por ejemplo algas verdes (Chlorophyta), algas rojas (Rhodophyta) y diatomeas (Bacillariophyta) capaces de realizar la fotosíntesis (Brennan and Owende, 2010).

Las microalgas aprovechan la fotosíntesis para transformar el agua y el dióxido de carbono en azúcares por medio de energía luminosa. Estos azúcares se emplean después para apoyar el crecimiento de la biomasa (Blanken et al., 2016).

Las microalgas son organismos primitivos de plantas sin raíces, tallos u hojas, que se pueden encontrar en todos los ecosistemas terrestres, generalmente en agua (agua dulce, salobre y marina), así como en otros medios como la superficie húmeda de rocas, aguas termales, aire, nieve o incluso en el suelo del desierto (Oliveira et al., 2017).

La composición de las microalgas (contenido en lípidos, carbohidratos y proteínas) es variable, y puede ser manipulada mediante varios parámetros durante el proceso de su cultivo. Depende obviamente también de la especie considerada. De acuerdo a Markou (2011) citado por Ruiz-Martínez (2011) el tamaño de las algas eucariotas varía entre 0.5-30  $\mu\text{m}$ .

Las microalgas producen algunos bioproductos útiles que incluyen carotenoides (especialmente  $\beta$ -caroteno), astaxantina, ácido docosahexaenoico (DHA), ácido eicosapentaenoico (EPA), pigmentos bioactivos y funcionales, colorantes naturales, polisacáridos, antioxidantes y extractos de algas. El cultivo comercial de microalgas comenzó hace cinco décadas. Su aplicación comercial se introdujo por primera vez en Japón en la década de 1960. *Chlorella* fue el primer organismo objetivo (Mobin y Alam, 2017).

### 1.6.1 Remediación de contaminantes

Las microalgas son una interesante opción para mitigar el CO<sub>2</sub>, ya que son los mayores biofijadores de CO<sub>2</sub> del planeta. El CO<sub>2</sub> que necesitan para su crecimiento lo pueden obtener del aire, de carbonatos solubles y de emisiones industriales, y producir lípidos (Santos et al., 2014), por lo cual se consideran con potencial para la elaboración de biocombustibles de tercera generación (Arias et al., 2013).

La utilización de microalgas para la depuración de aguas residuales comenzó a finales de los años 50; en los 70 se desarrollaron en EEUU estanques de cultivo de microalgas para el tratamiento de aguas residuales aunque la extensión de este sistema se frenó por el auge de otros sistemas. Las algas se emplean en numerosas partes del mundo para el tratamiento de aguas residuales, pero a pequeña escala.

Proveen un medio para la remoción de contaminantes (nitrógeno, fósforo y carbono) de las aguas residuales, mientras que producen biomasa que podría ser empleada para la obtención de sustancias químicas de alto valor (metabolitos de algas) y/o biogás a través de la digestión anaeróbica. Asimismo las microalgas pueden reducir los efectos nocivos de los efluentes de las aguas residuales y disminuir la eutrofización en los medios acuáticos (Delgadillo-Mirquez et al., 2016).

### 1.6.2 Otras aplicaciones

La biomasa de algas, además de contener proteínas, lípidos esenciales, pigmentos, carbohidratos, minerales y vitaminas, posee excelentes cualidades para la obtención de productos naturales (Santos et al., 2014). Las microalgas tienen una amplia gama de aplicaciones industriales. Su aplicación para la producción de biocombustibles y la purificación de aguas residuales han sido ampliamente reportadas. Las microalgas también se pueden usar para otras aplicaciones industriales como alimentos y productos farmacéuticos de alto valor, nutracéuticos (ingredientes nutricionales), alimentos saludables para humanos, alimentos para animales, aditivos alimentarios y forrajeros, polisacáridos, productos cosméticos, biorremediación, antioxidantes,

colorantes, biofertilizantes, alimentos para la acuicultura o producción de bioplásticos (Mobin y Alam, 2017). En la Tabla 1.3 se presenta algunas especies con sus respectivas aplicaciones y productos.

**Tabla 1.3** Estado de la producción de microalgas en 2010 (Brennan, 2010)

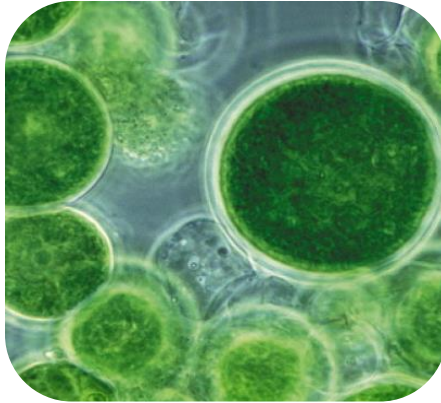
Microalga	Producción anual (ton peso seco)	País productor	Aplicación y producto	Precio (€)
<i>Spirulina</i>	3000	China, India, EEUU, Myanmar, Japón	Nutrición humana Nutrición animal Cosméticos, Ficobiliproteínas	36 kg <sup>-1</sup> 11 mg <sup>-1</sup>
<i>Chlorella</i>	2000	Taiwán, Alemania, Japón	Nutrición humana Cosméticos Acuicultura	36 kg <sup>-1</sup> 50 l <sup>-1</sup>
<i>Dunaliella salina</i>	1200	Australia, Israel, USA, Japón	Nutrición Humana Cosméticos B-caroteno	215-2150 kg <sup>-1</sup>

### 1.6.3 *Chlorella* spp

Son algas verdes simples, de tamaño pequeño, unicelulares y no presentan movimiento, no producen zoosporas (Figura 1.5). Las células presentan una pared celular fina y cloroplastos en forma de copa y se desarrollan formando células hijas o autoesporas iguales a la célula madre. Se desarrollan en condiciones autotróficas, heterotróficas y mixotróficas (Angulo-Mercado et al., 2012). Son de forma esférica (~ 2 a 10 µm de diámetro) y contiene los pigmentos fotosintéticos verdes clorofila -a y -b en su cloroplasto. Se multiplica rápidamente y solo requiere CO<sub>2</sub>, agua, luz solar y una pequeña cantidad de minerales. La *Chlorella* se ha cultivado comercialmente en fotobiorreactores, tanques circulares grandes y en estanques abiertos de paletas o estanques abiertos circulares (Mobin y Alam, 2017).

Su cultivo intensivo se debe a fines de alimentación y para la obtención de metabolitos, sin embargo este género ha sido empleado para el tratamiento biológico de aguas residuales, probando su efectividad en la remoción nutrientes, demanda química de oxígeno y metales. Su uso en aplicaciones de biorremediación ha sido

muy amplio, en forma suspendida o inmovilizada, como cepa pura o en asociación con otros microorganismos no fotosintéticos (Infante et al., 2012).



**Figura 1.5** *Chlorella* spp

La *Chlorella* se cosecha por centrifugación o autofloculación. Después de la cosecha, la biomasa se pulveriza o se seca en tambor y el polvo se vende directamente o se usa para hacer tabletas. La composición bioquímica de *Chlorella* muestra que contiene 11-58% de proteína, 12-28% de carbohidratos y 2-46% de lípidos de su peso seco. El valor de mercado comercial de *Chlorella* es de más de mil millones de dólares estadounidenses (Mobin y Alam, 2017). Su clasificación se muestra en la Tabla 1.4.

**Tabla 1.4** Clasificación científica *Chlorella*

<b>División</b>	<i>Chlorophyta</i>
<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>Clase</b>	<i>Chlorophyceae</i>
<b>Orden</b>	<i>Chlorococcales</i>
<b>Familia</b>	<i>Oocystaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Chlorella</i>

Perteneciente a la división *Chlorophyta*, *Chlorella* tiene en su composición una alta concentración de clorofila, que varía según el género, pero en sentido general es el pigmento predominante que les permite las transformaciones energéticas a través de la fotosíntesis, que es muchas veces mayor que la de otras plantas. *Chlorella* se



multiplica con gran rapidez, puede dividirse en cuatro células cada 20 horas (Maeda, et al., 1995 citado en Dominguez, 2014).

## **1.7 Cianobacterias**

Las cianobacterias son organismos procariontes que realizan fotosíntesis oxigénica y comprende tanto pigmentos fotosintéticos (clorofila a) típicos de las algas eucariontes y plantas, como pigmentos específicos (las ficobilinas) que les otorga el típico color verdeazulado y propiedades ecológicas únicas (Cirés-Gómez y Quesada de Corral, 2011), presentan una extensa diversidad morfológica, encontrándose formas unicelulares, coloniales y filamentosas (Pineda-Mendoza et al., 2011).

Se distribuyen en ambientes terrestres como suelos o superficies húmedas (muros, rocas, árboles, etc.) (Cirés-Gómez y Quesada de Corral, 2011), dulceacuícolas, marinos y determinadas especies tienen la capacidad de desarrollarse en ambientes alcalinos, ácidos y con altas temperaturas (Pineda-Mendoza et al., 2011).

Actualmente se clasifican según dos sistemas taxonómicos diferentes: la clasificación botánica y la nomenclatura microbiológica. Su naturaleza procarionte ha generado que las cianobacterias, que tradicionalmente se han considerado algas, actualmente se consideren bacterias, y de ahí los dos sistemas de clasificación paralelos (Cirés-Gómez y Quesada de Corral, 2011).

### **1.7.1 *Spirulina maxima***

Es una cianobacteria verdeazulada, fotosintética, autótrofa en forma de espiral que mide entre 5 y 500  $\mu\text{m}$ , del género *Arthrospira* (Figura 1.6). Se propaga en estanques y lagos naturales y artificiales con alta alcalinidad a temperaturas entre 15°C y 35°C, con un pH entre 8.5 y 11.5, en la Tabla 1.5 se muestra la clasificación científica de la *Spirulina maxima*.

Tabla 1.5 Clasificación científica *Spirulina*

<b>Dominio</b>	<i>Bacteria</i>
<b>Filo</b>	<i>Cyanobacteria</i>
<b>Clase</b>	<i>Cyanophyceae</i>
<b>Orden</b>	<i>Chroococcales</i>
<b>Familia</b>	<i>Spirulinaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Spirulina</i>

La *Spirulina maxima* es identificada por la FDA en 1981 como alimento nutritivo. Por sus características nutritivas y farmacológicas la *Spirulina maxima* es considerada alimento nutracéutico (Quintero-Rodríguez et al., 2016).

El principal pigmento fotosintético de *Spirulina* es la ficocianina (color azul). Las microalgas *Spirulina* también contienen clorofila-a y carotenoides. Algunos contienen pigmento fitocintrina que hace que el color de las microalgas sea rojo o rosado. La *Spirulina* se reproduce por fisión binaria (Mobin y Alam, 2017).

La *Spirulina* está siendo cultivada comercialmente como complemento alimenticio humano, como ingrediente de alimentación animal (Affan et al., 2015), obtención de energía y fertilizantes, para fabricar productos químicos finos tales como pigmentos, polisacáridos, carotenos, esteroides, vitaminas, ácidos grasos poli- insaturados y lípidos (Mezzomo et al., 2010), y poliinsaturados omega 3 y 6 (Affan et al., 2015).

Figura 1.6 *Spirulina maxima*

La *Spirulina* parece ser la cepa más conveniente en el intento de emplear fuentes no convencionales para combatir las deficiencias nutricionales (Gutiérrez-Salmeán et al., 2015). Como la *Spirulina* es filamentosa, su recolección es relativamente fácil. Su concentración inicial se logra usando una pantalla de gravedad inclinada o un filtro de pantalla vibrante. Es rica en proteínas, vitaminas, aminoácidos esenciales, minerales y ácidos grasos poliinsaturados esenciales y pigmentos que incluyen ficocianina, mixoxantofilo y zeaxantina. La *Spirulina* contiene 46-71% de proteína, 8-16% de carbohidratos y 4-9% de lípidos (de su peso seco). Los aminoácidos esenciales de la *Spirulina* contienen leucina, isoleucina y valina (Mobin y Alam, 2017)

## 1.8 Sistemas y condiciones de cultivo

### 1.8.1 Metabolismo

Las microalgas presentan muchos tipos de mecanismo de metabolismo: **Fotoautótrofa** (requieren solo compuestos inorgánicos como CO<sub>2</sub>, sales y una fuente de energía lumínica para su desarrollo) estos organismos comprenden bacterias fotosintéticas (bacterias verdes y púrpura y cianobacterias), algas y plantas verdes (Tórtora et al., 2007), **Heterótrofa** (no son fotosintéticos, es decir pueden desarrollarse bajo ausencia de luz, por lo que requieren una fuente externa de compuestos orgánicos y nutrientes como fuente de energía), **Fotoheterótrofa** (emplean compuestos orgánicos como fuente de carbono y de energía lumínica para su desarrollo) y **mixotrófica** (tienen la capacidad de crecer bajo procesos tanto autótrofos como heterótrofos, de manera que la fuente de energía es tanto la luz como la materia orgánica, el carbono lo obtienen por tanto de compuestos orgánicos y de CO<sub>2</sub>).

Hoy en día la producción fotoautótrofa es el único método de producción de microalgas que a gran escala resulta económicamente rentable y técnicamente viable para el caso de que no haya producción de energía (Brennan and Owende, 2010).

### **1.8.2 Sistemas de cultivo**

En la producción de microalgas existen dos diseños básicos: cultivos abiertos, donde la biomasa está expuesta a las condiciones ambientales (incluye tanto medios naturales como estanques y lagunas, como artificiales con una variedad de diseños); y cerrados, llamados fotobiorreactores con poco o ningún contacto con el medio externo (Hernández-Pérez y Labbé, 2014), sin embargo el concepto de fotobiorreactor se ha reservado para aparatos que permitan cultivos monoespecíficos, con el completo aislamiento de contaminantes ambientales. Estos son diseñados para cultivar microalgas que tratan el agua residual en corto tiempo y además producir biomasa con potencial diverso (López-Hernández et al., 2016).

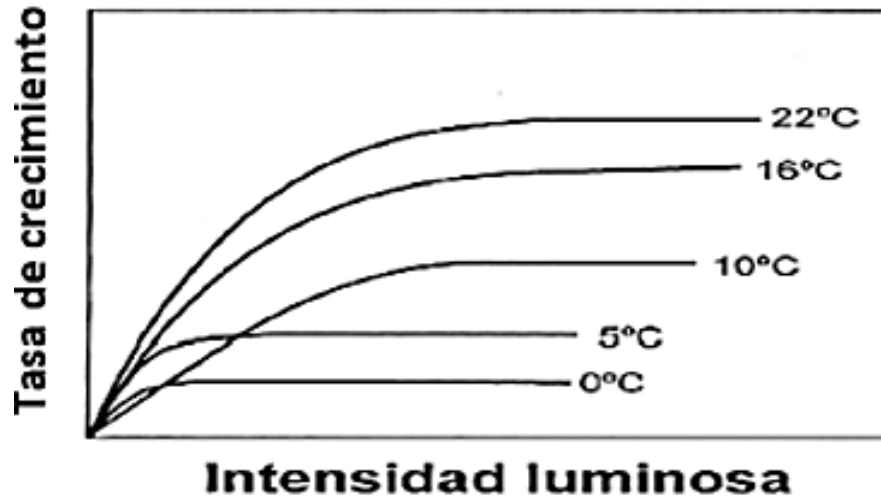
### **1.8.3 Luz**

En ambos sistemas de cultivo la fuente de luz y la intensidad de energía son factores que afectan su desarrollo y crecimiento. En cultivos de sistemas abiertos, la luz solar es la principal fuente de energía; para los sistemas de cultivo cerrados hay diversas fuentes luminosas a utilizar como: Lámparas de tungsteno o halógeno, diodos emisores de luz (LED), lámparas fluorescentes, fibra óptica y láser. Las luces convencionales en contacto cercano de la luz con las paredes del fotobiorreactor generará calor el cual dañaría el cultivo, por lo que investigaciones en la actualidad se centran en el uso de energía lumínica que no genere calor (Ramírez-Mérida et al., 2013).

### **1.8.4 Temperatura**

La temperatura óptima del cultivo depende de la microalga que se emplee y de sus características, pero el valor óptimo puede variar en función de los demás parámetros. Así, la temperatura óptima en condiciones naturales generalmente no coincide con la temperatura óptima en condiciones de cultivo porque los parámetros de cultivo difieren a su vez de los que se dan en su ambiente natural, existe un nivel

de iluminación óptimo para cada nivel de temperatura de cultivo como se muestra en la Figura 1.7 (Plasencia, 2012).



**Figura 1.7** Temperatura óptima en condiciones de cultivo (Plasencia, 2012)

El desarrollo algal crece proporcionalmente con la temperatura hasta alcanzar la temperatura óptima de cada especie (Hernández-Pérez y Labbé, 2014). La temperatura óptima para el cultivo de microalgas se encuentra generalmente entre los 20 y 24 °C, no obstante, estas pueden variar dependiendo del medio de cultivo, la especie y la cepa utilizada. Comúnmente, los cultivos de microalgas toleran temperaturas de entre 16 y 27 °C, en donde a temperaturas menores a 16 °C disminuyen el crecimiento, mientras que una temperatura mayor a los 35 °C resulta ser letal para un gran número de especies (Benavente-Valdés et al., 2012).

### 1.8.5 Mezcla

El mezclado asegura una distribución homogénea, favorece la transferencia de nutrientes, dispersión uniforme de cianobacterias entre las zonas oscuras e iluminadas, transferencia de energía, romper gradientes de difusión en la superficie celular, retirar el oxígeno fotosintético generado, evitar estratificación térmica ya que puede existir amplitud térmica entre fondo y superficie del fotobiorreactor de hasta 8 °C. Un buen mezclado puede aumentar la productividad hasta 40% en un

fotobiorreactor tubular. Entre los sistemas de mezcla se encuentra la bomba, agitación mecánica y mezcla de gases que trabajan solos o en combinación (Ramírez-Mérida et al., 2013).

### **1.8.6 pH**

Cada especie requiere de un rango determinado de pH que permita un desarrollo óptimo, siendo pH 8 el más adecuado para especies dulceacuícolas. Por encima o debajo de éste, presentan un descenso en la productividad, que no solo perjudica el crecimiento algal, sino también la capacidad de remoción del nitrógeno en sistemas de tratamientos de aguas (Hernández-Pérez y Labbé, 2014). El rango de pH para la mayoría de los cultivos de microalgas está entre 7 y 9, el pH se incrementa conforme a la edad del cultivo es mayor, esto es debido a la acumulación de minerales y la oxidación de nutrientes (Benavente- Valdés, et al., 2012)

### **1.8.7 Nutrientes**

Después del carbono, el nitrógeno es el nutriente más importante para las microalgas y se incorpora como nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) o como amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), es igual un factor crítico para regular el contenido de lípidos de las microalgas. El fósforo es esencial en varios procesos celulares, como la formación de ácidos nucleicos y transferencia de energía. Aunque el contenido en fósforo de las microalgas es menor al 1 %, su deficiencia en el medio de cultivo es una de las mayores limitaciones al crecimiento. En los medios de cultivo suele incorporarse en forma de  $\text{HPO}_4^{2-}$  o  $\text{HPO}_4^-$  (Hernández-Pérez y Labbé, 2014).

### **1.8.8 Pastoreo y depredación**

Los cultivos de microalgas son amenazados de pastoreo por algunos grupos zooplantónicos, tales como cladóceros, rotíferos o nemátodos, sobre todo en sistemas abiertos. La predación en pocos días puede disminuir la productividad entre un 90 a 99 %. Estas plagas se pueden eliminar mediante medios físicos, tales como

filtración, centrifugación, baja concentración de oxígeno disuelto (OD)/alta carga orgánica y tratamientos químicos, como aplicación de hormonas miméticas contra invertebrados, aumento de pH y concentración de amonio libre. Por otro lado, muchos zooplancteres son capaces de sobrevivir largos periodos de baja OD, por lo que Park et al. (2011) mencionan que el ajuste del pH hasta un valor de 11 es quizás el método más práctico de control (Hernández-Pérez y Labbé, 2014).

### **1.8.9 Reducción de compuestos contaminantes desde aguas residuales**

En el tratamiento de aguas residuales se busca reducir y/o eliminar la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), sólidos suspendidos, nutrientes, coliformes y toxicidad. (Hernández-Pérez y Labbé, 2014).

## **1.9 Avances**

Existe una gran cantidad de investigaciones sobre el empleo de microalgas y cianobacterias para la remoción de contaminantes y nutrientes, utilizando como medio de cultivo diversos tipos de residuos y aguas residuales, diferentes sistemas y condiciones de cultivo, y empleando distintas metodologías para su desarrollo. Todas estas investigaciones se encaminan a lograr un sistema efectivo, económico y sustentable, y también hay diversas investigaciones de microalgas y cianobacterias sobre su productividad en otras aplicaciones, a continuación se mencionan algunas:

Sepúlveda (2011) citado en Ramírez-Mérida et al. (2013) propuso tres sistemas de iluminación para fotobiorreactores de columna de burbujeo: 1) Lámpara fluorescente que irradiaba sobre el fotobiorreactor desde un solo punto, 2) Tira comercial flexible de LEDS colocada en forma de espiral rodeando la parte externa del fotobiorreactor y 3) Tira comercial flexible de LEDS colocada en forma de espiral rodeando la pared interna de un tubo hueco transparente colocado en el interior del fotobiorreactor. La biomasa generada con la configuración de iluminación de la tira de LEDS externa fue de 112 millones de células mL<sup>-1</sup>, aproximadamente el doble de la biomasa generada

con los otros dos sistemas utilizados esto debido a la mayor trayectoria de fotones dentro del fotobiorreactor.

Wang et al. (2010) citado en Ramírez-Mérida et al. (2013) lograron interesantes resultados con remociones de 100% para amonio, 75.7-82.5 % para nitrógeno total y 62.5-74.7 % para fósforo total con *Chlorella spp*, depurando lodos diluidos procedentes de la digestión anaerobia de estiércol de ganado. Li et al. (2011) citado en Ramírez-Mérida et al. (2013) utilizaron *Chlorella spp* para el tratamiento de aguas residuales municipales altamente concentradas, con 93.9 % para amonio, 89.1 % para nitrógeno total y 80.9 % para fósforo. Olguin et al. (2003) citado en Ramírez-Mérida et al. (2013) registraron una remoción de 91-96 % para  $\text{NH}_4$  y 72-87 % para  $\text{PO}_4$  con *Spirulina* para el tratamiento de agua residual de porqueriza en un sistema de cultivo HRAP (High Rate Algal Ponds).

Caballero (2013) determinó la dosis óptima de nutrientes y vitaminas para la microalga *Chlorella spp* y la concentración máxima de  $\text{CO}_2$  que puede tolerar sin que ésta tenga un efecto inhibitorio, esto es adicionando 1 mL de micronutrientes, 1 mL de macronutrientes y 0.5 mL de vitaminas por L de cultivo. Al cultivo se le adicionaron las dosis recomendables de macronutrientes, micronutrientes y vitaminas, y se suministró dióxido de carbono a diferentes flujos. Se determinó que el suministro de  $\text{CO}_2$  al cultivo de la microalga, tiene una influencia sobre el crecimiento de *Chlorella spp* siendo capaz de tolerar un punto máximo de 40 mL/min de  $\text{CO}_2$  y densidad celular de  $29.7 \times 10^6$  cel/mL. Se obtuvo en promedio una remoción de  $\text{CO}_2$  de 44.27 %, con un máximo de 49.1 % y un mínimo de remoción de 40.46 %, con una producción de oxígeno máxima de 23.9 % en el gas de salida.

Domínguez (2014) evaluó los requerimientos necesarios para el adecuado crecimiento de *Spirulina maxima* utilizando medio de cultivo UTEX (Spir1 y Spir2) en distintas porciones: 80-20, 60-40, 50-50, 40-60 y 20-80 (% v/v), respectivamente. Los resultados mostraron que la proporción 40-60 (% v/v) (Spir1 y Spir2) presentó el mayor crecimiento con  $5.75 \times 10^5$  cel/mL. Para evaluar el desempeño de



bioconversión de ambas especies, estas se adoptaron por separado a un fotobiorreactor tubular adicionando 7.6 mL/min de CO<sub>2</sub> una hora al día, por dos días consecutivos y suspendiendo la adición dos días. *Spirulina maxima* si realizo el consumo total del CO<sub>2</sub>, mientras que *Chlorella spp.* obtuvo un valor máximo de 97.792 % de remoción.

González (2015) encontró condiciones ambientales (temperatura, % CO<sub>2</sub>, medio de cultivo) para obtener mayor contenido fotosintético de microalgas. Los resultados indicaron un incremento en el contenido de pigmentos conforme avanzaron los diseños experimentales, sin embargo, los resultados globales fueron valores aún bajos de productividad y contenido de pigmentos comparados con otros autores.

Calderón (2017) desarrollo una metodología de aprovechamiento de las propiedades de subproductos (desechos) agroindustriales a partir de su caracterización nutritiva, con el fin de suministrar nutrientes en el cultivo poblacional de las especies: *Chlorella spp* y *Spirulina maxima* en fotobiorreactores para la obtención de biomasa principalmente. Logro determinar la dosis recomendada de los residuos como fuente de nutrientes para el crecimiento de las especies *Chlorella spp* y *Spirulina maxima*, la cual fue la dosis de 20 % lodo- 80 % agua y con un pretratamiento alcalino, con remociones del 67 % de DQO, y un crecimiento celular de  $1.54 \times 10^7$  cel/mL para la especie *Chlorella spp*. Por su parte para la especie *Spirulina maxima* con lodo porcícola, se obtuvo un crecimiento celular del  $7.23 \times 10^5$  cel/mL y una remoción del 63 % de DQO. La especie *Chlorella spp* con pollinaza alcanzó un crecimiento celular del  $1.46 \times 10^7$  cel/mL con una remoción del 62 % de DQO, mientras que con *Spirulina maxima* obtuvo un 59 % de remoción de DQO y un crecimiento celular del  $6.48 \times 10^5$  cel/mL. Para la melaza, la *Chlorella spp* obtuvo un porcentaje de remoción del 51 % de DQO con un crecimiento celular de  $1.35 \times 10^7$  cel/mL, en cuanto a la especie *Spirulina maxima* obtuvo un crecimiento celular de  $6.23 \times 10^5$  cel/mL y una remoción del 55 % de DQO. Altos contenidos de nitrógeno en el medio favorece la producción de biomasa, por ello la máxima producción de biomasa entre los dos residuos se obtuvo en el lodo porcícola con un 3.46 g/L de biomasa seca.

Morales (2018) cuantificó el porcentaje de remoción de fósforo mediante la operación de fotobiorreactores con residuo porcícola a diferentes proporciones de alimentación y en presencia de las microalgas *Spirulina maxima* y *Dunaliella spp*. Se monitorearon cinéticas de crecimiento, en periodos de operación de 21 días con agitación por burbujeo e iluminación con fotoperiodos de 12 h luz-obscuridad. Para la *Spirulina máxima* la dosis que corresponde a 20 % lodo y 80 % agua sin pretratamiento obtuvo la mayor remoción del experimento que fue de 47 %, y para *Dunaliella spp* la mayor remoción fue del 97 % que corresponde a la dosis de 20 % lodo y 80 % agua.

# **CAPÍTULO 2**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Metodología experimental

En el presente capítulo se describen de forma detallada los materiales y métodos empleados para el desarrollo de este proyecto de investigación, el cual de acuerdo a la metodología presentada en la Figura 2.1, describe las 6 etapas en las que se dividió el proyecto:

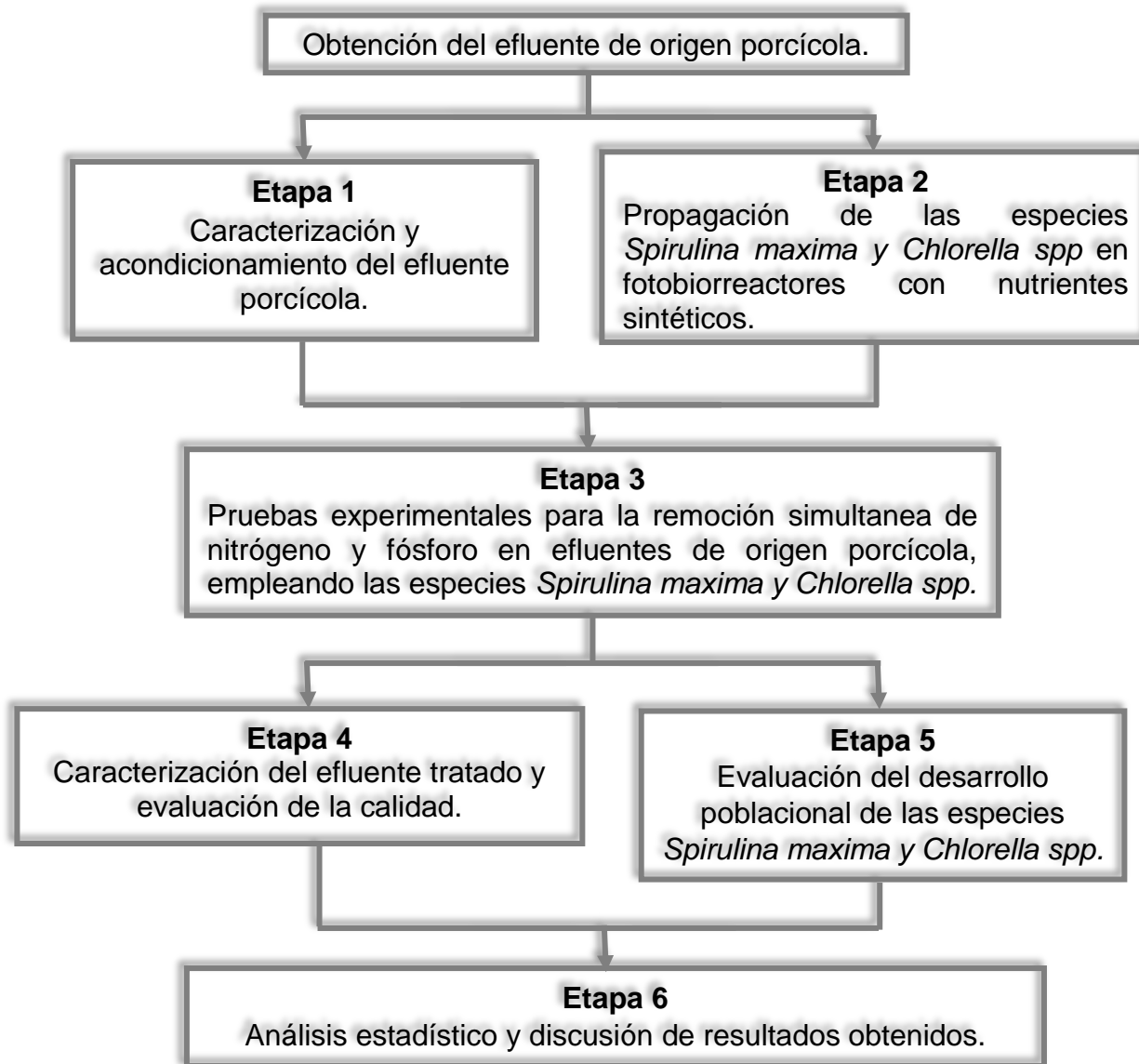


Figura 2.1 Metodología

Como etapa preliminar del proyecto se realizó la obtención de la materia prima que para este proyecto fue agua residual de origen porcícola; posteriormente se realizó la caracterización fisicoquímica y microbiológica, la caracterización es de gran importancia ya que permite conocer las condiciones iniciales del residuo y de igual manera poder manipularlos. También se procedió a la propagación de las especies *Spirulina maxima* y *Chlorella spp* en fotobiorreactores con sus medios correspondientes, esto con el objetivo principal de mantener vivas las especies durante el desarrollo experimental e incrementar la población de ambas especies para las pruebas experimentales.

Terminada la etapa 1 y 2, se procedió al montaje de cinéticas de degradación de nutrientes contenidos en aguas residuales de origen porcícola durante el desarrollo de las especies *Spirulina maxima* y *Chlorella spp*, en esta etapa experimental se manejaron tres concentraciones diferentes de agua residual porcícola, la cual cumple la función como fuente de nutrientes en el cultivo de microalgas y cianobacterias.

Al término de las cinéticas se procedió a la caracterización del efluente tratado para conocer las nuevas condiciones y obtener el porcentaje de remoción de ambos nutrientes, así como también determinar los parámetros cinéticos de degradación de los nutrientes durante el desarrollo de las especies y la cinética de desarrollo poblacional de las especies durante la degradación de nutrientes contenidos en el agua residual porcícola.

Posterior a los resultados se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y se procedió a comparar resultados, esto para determinar cuál de las tres concentraciones para ambas especies tuvo mayor remoción de nitrógeno y fósforo así como el mejor rendimiento en el desarrollo poblacional microalgal, y para finalizar se realizó la discusión de resultados, es importante mencionar que cada una de las técnicas realizada está regida bajo el respaldo de normas oficiales y métodos estándar.

## 2.2 Obtención del efluente de origen porcícola

La muestra de agua residual porcícola cruda o efluente porcícola crudo se obtuvo de una granja porcina semitecnificada, localizada en el municipio de Mariano Escobedo, Veracruz, México. Esta granja actualmente se dedica a la crianza de más de 50 ejemplares de diferentes especies en distintas etapas de desarrollo.

Cada corral tiene un canal de drenaje, en el que se va toda el agua de lavado, que arrastra principalmente y en mayor concentración orina de cerdo, y en menor cantidad restos de alimento, cama, restos de heces fecales y otras partículas. Toda esta agua residual generada en los corrales va a parar a un tanque séptico (Figura 2.2), del cual se obtuvo una muestra de 10 litros de agua residual porcícola, que fue depositada en un bidón para su fácil transporte y conservación. Durante el muestreo (paso del agua residual al bidón), se empleó un colador para separar todos aquellos residuos sólidos como piedras, ramas, plantas y alimento del efluente, para trabajar solo con residuo líquido.

La muestra se almacenó y se conservó en refrigeración a una temperatura de 4 °C, todo este procedimiento de muestreo se realizó de acuerdo a la norma NMX-AA-3-1980 llamada Norma mexicana "Aguas residuales.- Muestreo".



**Figura 2.2** Tanque séptico de la granja porcícola de Mariano Escobedo, Veracruz, Mexico

## 2.3 Caracterización y acondicionamiento del efluente porcícola

### 2.3.1 Caracterización del efluente porcícola crudo

Una vez que la muestra fue trasladada al laboratorio, se llevó a cabo la caracterización fisicoquímica y microbiológica del efluente porcícola, con la finalidad de conocer las propiedades y composición del efluente, así como el nivel de contaminación del mismo. En la Tabla 2.1 se presenta los parámetros que se determinaron, junto a sus unidades en las que fueron reportadas y el método bajo el cual se realizó cada análisis, cada muestra se realizó por triplicado.

**Tabla 2.1** Parámetros empleados para la caracterización del efluente

Análisis físicos		
Parámetro	Unidad	Método
pH	-	Potenciómetro
Sólidos Totales (ST)	mg/L	Método: 2540 B de la APHA-AWWA-WPFC
Sólidos Totales Volátiles (SV)	mg/L	Método: 2540 E de la APHA-AWWA-WPFC
Sólidos Suspendidos Totales (SST)	mg/L	Método: 2540 D de la APHA-AWWA-WPFC
Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)	mg/L	Método: 2540 E de la APHA-AWWA-WPFC
Análisis químicos		
Parámetro	Unidad	Método
Demanda Química de Oxígeno total (DQO <sub>T</sub> )	mg O <sub>2</sub> /L	Método: 5220 D de la APHA-AWWA-WPFC: Micrométodo colorimétrico
Nitrógeno Total	mg N-NTK/L	Método Micro Kjeldhal Método 4500 – Norg B
Fósforo total	mg P/L	Método 4500-P B
Análisis microbiológicos		
Parámetro	Unidad	Método
Coliformes fecales	NMP /100 mL	NMX-AA-042-SCFI-2015

### 2.3.2 Acondicionamiento del efluente crudo porcícola

El agua residual porcícola cruda visualmente presenta una alta contaminación debido a la turbidez ocasionada por los sólidos suspendidos (SS), por este motivo y al no contar con PTAR la granja, es recomendable acondicionar la muestra con un tratamiento físico para reducir la contaminación del efluente. Los procesos físicos que se emplearon para el acondicionamiento del efluente porcícola fueron tamizado y centrifugación, que fueron elegidos por la rapidez del proceso de separación y por la disponibilidad en el laboratorio.

El proceso de tamizado se realizó por medio de un tamiz (Figura 2.3) de acero inoxidable de 20  $\mu\text{m}$ , posteriormente el agua tratada por el tamiz se centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos (Figura 2.4), el objetivo de este proceso fue acelerar lo que haría el proceso de sedimentación que por si solo se realizaría en horas.



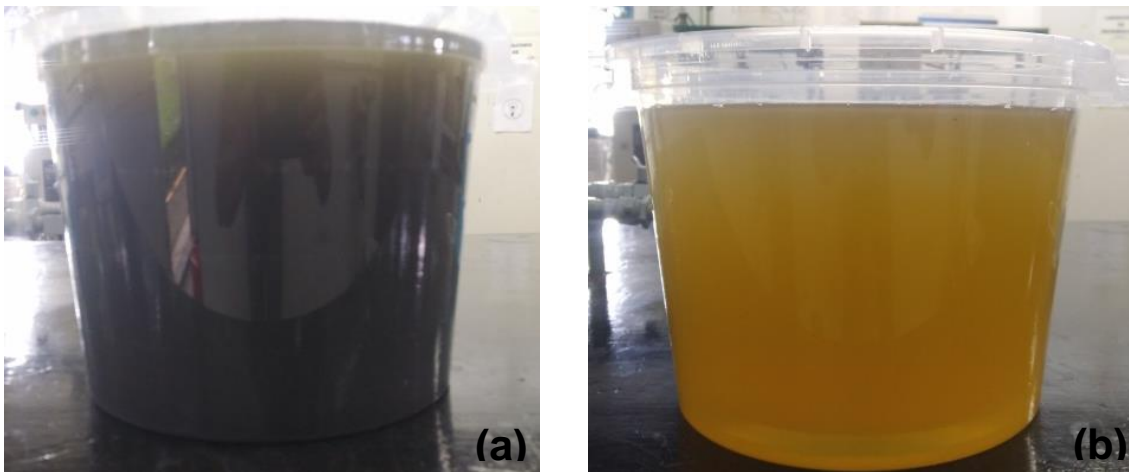
**Figura 2.3** Tamiz 20  $\mu\text{m}$



**Figura 2.4** Centrifugadora.



En la figura 2.5 se presenta el efluente porcícola crudo (a) antes de los procesos físicos y el efluente acondicionado (b) después de pasar por los dos tratamientos físicos. Se puede observar que después del tratamiento físico, el efluente crudo perdió/cambió su color café oscuro a un marrón dorado, lo que nos indica que redujo notablemente los SS, posteriormente se procede a realizar la caracterización fisicoquímica de la Tabla 2.1.



**Figura 2.5** Efluente porcícola (a) crudo, (b) acondicionado

#### **2.4 Propagación de las especies *Spirulina maxima* y *Chlorella spp* en fotobiorreactores con nutrientes sintéticos**

De acuerdo con la investigación de Caballero (2013), el cultivo de microalgas tiene requerimientos mínimos de nutrientes y vitaminas para lograr un crecimiento adecuado, por lo que es necesario adaptar el medio de cultivo necesario para su crecimiento y experimentación.

##### **2.4.1 Especie *Spirulina maxima***

La cepa de la cianobacteria *Spirulina máxima* fue obtenida de la Colección de Microorganismos del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), en la Ciudad de México. Esta colección de cepas

microbianas es la más importante del país, integrada por 3 500 microorganismos de importancia industrial tanto en el ámbito de la salud como en el de la agricultura y alimentación. Los datos generales se listan en la Tabla 2.2.

**Tabla 2.2** Datos generales de la cepa de *Spirulina máxima*.

Nombre	<i>Spirulina máxima</i>
Acrónimo	CDBB A-1484
Aislador	M. Lefevre (1963)

De acuerdo con las recomendaciones sugeridas por la universidad de Texas y el CINVESTAV para el correcto crecimiento de la cepa de *Spirulina maxima* se utiliza el medio de cultivo UTEX, formado por las soluciones que se listan en el Anexo A.

#### 2.4.2 Especie *Chlorella spp*

La microalga *Chlorella spp* fue obtenida de la Colección de Microalgas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR), en La Paz, B.C.S. Esta colección alberga 143 cepas de ambientes marinos, dulceacuícolas y salobres, pertenecientes a ocho grupos taxonómicos: Chlorophyta, Rhodophyta, Eustigmatophyta, Haptophyta, Bacillariophyta, Dinophyta y Cyanobacteria.

De acuerdo con las recomendaciones sugeridas por el CIBNOR para el correcto crecimiento de la microalga *Chlorella spp* se utiliza el medio de cultivo 3N-BBM+V (CCAP) (medio Bold-Basal con Nitrógeno y Vitaminas triples; modificado), formado por las soluciones que se listan en el Anexo B.

#### 2.4.3 Condiciones de propagación de las especies

Las especies *Spirulina maxima* y *Chlorella spp* son operadas en fotobiorreactores de vidrio cada uno con un volumen útil de 1000 mL a temperatura ambiente ya que por bibliografía ambas especies pueden desarrollarse a temperatura ambiente, se aplicó agitación por burbujeo de aire mediante una bomba y una iluminación en fotoperiodos de 12 h luz-obscuridad mediante una lámpara LED de luz fría de 20 W,

con capacidad de iluminación de 2500 Lux, para esto se llevó a cabo la lectura con un medidor digital de luminosidad Steren (modelo HER-410). La alimentación para ambas especies se realiza cada 30 días, es recomendable que la alimentación de la cianobacteria no pase de los 30 días, ya que a diferencia de la microalga *Chlorella spp* que aguanta un par de meses sin alimento, la *Spirulina maxima* no sobrevive más de este tiempo.

## **2.5 Pruebas experimentales para la remoción de nutrientes en efluentes de origen porcícola**

### **2.5.1 Diseño experimental unifactorial**

Para la remoción simultanea de N y P en aguas residuales de origen porcícola empleando las especies *Spirulina maxima* y *Chlorella spp*, se aplicó el diseño experimental con un factor, con el objetivo de comparar el desarrollo poblacional de ambas especies durante la degradación de nutrientes, bajo tres concentraciones distintas de medio de cultivo.

Las condiciones de operación de las pruebas experimentales se describen en la sección 2.5.2. La Tabla 2.3 muestra la condición de operación en la que se sometieron ambas especies.

**Tabla 2.3** Condición de operación en el diseño unifactorial

Factor	Niveles		
Concentración v/v: agua residual/agua destilada	25%	50%	75%

Se realizaron dos réplicas para determinar el error experimental, las variables de respuesta fueron determinación de N, P y DQO. Durante esta etapa se monitoreó el crecimiento diario y el pH.

## 2.5.2 Condiciones de operación de las pruebas experimentales para la remoción simultánea de nutrientes

Se realizó un montaje de cinéticas de crecimiento, realizadas en frascos de plástico de 1000 mL con un volumen útil de 500 mL, los cuales se mantuvieron durante 6 días a temperatura ambiente, se aplicó agitación continua por burbujeo mediante aire proporcionado por una bomba de pecera, y una iluminación en fotoperiodos de 12 h luz-obscuridad mediante una lámpara LED de luz fría de 20 W con capacidad de iluminación de 2500 Lux, (Calderón, 2017 empleo una iluminación de 3000 lux para *Spirulina maxima* y Domínguez, 2014 empleo 1500 lux para *S. maxima* y *Chlorella spp*). Las características de los fotobiorreactores se muestran en la Tabla 2.4.

**Tabla 2.4** Descripción de fotobiorreactores utilizados

Sección	Descripción
<b>Fotobiorreactores</b>	Botellas de plástico de 1000 mL
<b>Capacidad</b>	Volumen de trabajo de 500 mL
<b>Operación</b>	Por lote

La elección de las concentraciones se basó de acuerdo a Caballero (2013); debido a que el crecimiento microalgal se basa en la ley del mínimo, es decir, el crecimiento será limitado por aquella sustancia que se presente en menor cantidad a la mínima requerida. Por otra parte, un exceso en los requerimientos de nutrientes puede llegar a inhibir el óptimo crecimiento microalgal. Es por ello que, para la propagación de las especies se propusieron las siguientes concentraciones equidistantes como se muestra en la Tabla 2.5,

**Tabla 2.5** Concentraciones propuestas para la propagación de las especies

Concentración v/v: efluente porcicola/agua destilada	25%	50%	75%
<b>Alga (20%)</b>	150 mL	150 mL	150 mL
<b>Agua residual</b>	87.50 mL	175 mL	262.50 mL
<b>Agua</b>	262.50 mL	175 mL	87.50 mL

El volumen útil de cada fotobiorreactor es de 500 mL, del cual el 30% (de acuerdo a Calderón, 2017) de ese volumen útil (150 mL), corresponde a la alícuota del cultivo algal que se tomó de los fotobiorreactores de la Etapa 2 para la propagación de la especie que se explica en el apartado 2.4 para inocular los seis fotobiorreactores. El 70% restante del volumen útil (350 mL) representa ahora el 100% para las concentraciones propuestas en la Tabla 2.5.

En las Figuras 2.6 y 2.7 se presenta el montaje de las cinéticas de crecimiento de la cianobacteria *Spirulina maxima* y la microalga *Chlorella spp* en las pruebas experimentales para la remoción de nutrientes en las tres concentraciones de efluente porcícola propuestas con su respectiva réplica.



**Figura 2.6** Montaje de cinéticas de crecimiento de la cianobacteria *Spirulina maxima*



**Figura 2.7** Montaje de cinéticas de crecimiento de la microalga *Chlorella spp*

### 2.5.3 Parámetros evaluados durante y después de la operación de las pruebas experimentales

Durante seis días se evaluó el pH, SST, DQO<sub>T</sub>, Nitrógeno total, fósforo total, concentración celular y biomasa. En la Tabla 2.6 se muestran los parámetros analizados, así como el método empleado del mismo.

Después del último día de operación de las pruebas experimentales para la remoción de nutrientes en aguas residuales de origen porcícola, se procedió a realizar la caracterización del efluente tratado, con los parámetros mencionados en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.6** Parámetros evaluados en las cinéticas de remoción de nutrientes y crecimiento

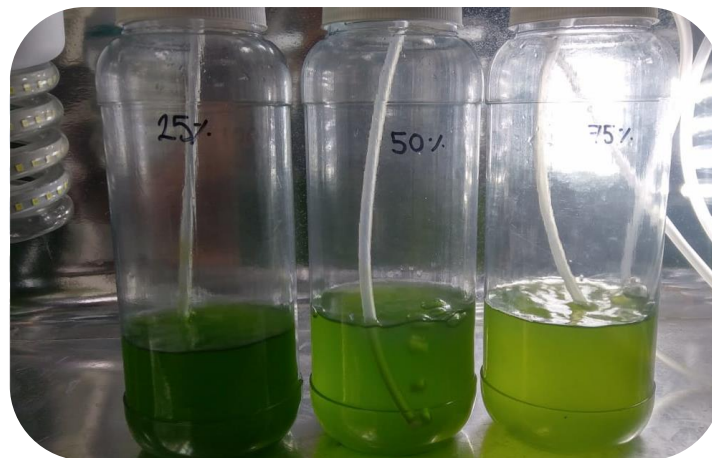
Parámetro	Método
pH	Potenciómetro
Sólidos Totales (ST)	Método: 2540 B de la APHA-AWWA-WPFC
Sólidos Totales Volátiles (SV)	Método: 2540 E de la APHA-AWWA-WPFC
Sólidos Suspendidos Totales (SST)	Método: 2540 D de la APHA-AWWA-WPFC
Demanda Química de Oxígeno total (DQO <sub>T</sub> )	Método: 5220 D de la APHA-AWWA-WPFC: Micrométodo colorimétrico
Nitrógeno Total	Método Micro Kjeldhal
Fósforo total	Método 4500-P B
Concentración celular	Cámara de Neubauer
Biomasa	Peso seco

En la figura 2.8 se presenta los fotobiorreactores con las concentraciones de 25%, 50% y 75% de efluente porcícola en el último día (día seis) de las pruebas experimentales con *Spirulina maxima*. Los experimentos con las concentraciones de 25% y 50% presentan una tonalidad de verde oscuro característico de un cultivo en crecimiento, a diferencia del experimento de la concentración 75% que presenta un verde amarillo característico de un cultivo que presenta muerte celular.



**Figura 2.8** Pruebas experimentales con *Spirulina maxima* en el último día de cinéticas

En la figura 2.9 se presenta los fotobiorreactores con las concentraciones de 25%, 50% y 75% de efluente porcícola en el último día (día seis) de las pruebas experimentales con *Chlorella spp.* Cada experimento presenta una tonalidad diferente, característica de la concentración celular, sin embargo ninguna de estas tonalidades es característica de muerte celular.



**Figura 2.9** Pruebas experimentales con *Chlorella spp.* en el último día de cinéticas

A continuación, se describen las técnicas utilizadas para el monitoreo de las cinéticas en estudio.

### 2.5.3.1 pH

La determinación de pH se realizó a través de un potenciómetro marca ORION Research. Inc. Model 250 A. siguiendo el método Potenciométrico 4500-H B de la Standard methods.

### 2.5.3.2 Sólidos Totales (ST)

Esta determinación se realizó mediante la técnica gravimétrica descrita en el método estándar 2540 B de la APHA-AWWA-WPFC (1999). Los Sólidos Totales se definen como el material residual después de evaporación y secado de una muestra a cierta temperatura, la muestra se evapora en un crisol a peso constante en una estufa a  $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por un lapso de 24 horas. El aumento de peso sobre el peso del crisol vacío representa los Sólidos Totales; y el cálculo se realiza con la siguiente ecuación:

$$ST = \frac{(m_3 - m_1)}{V} \cdot 1\,000\,000 \quad (2.1)$$

Dónde:

ST= son los sólidos totales, en mg/L

$m_3$ = es la masa del crisol con el residuo, después de la evaporación, en g;

$m_1$ = es la masa del crisol vacío a masa constante, en g, y

V= es el volumen de muestra, en mL.

### 2.5.3.3 Sólidos Totales Volátiles (STV)

El residuo producido en la determinación de Sólidos Totales según el método descrito anteriormente, se calcina a  $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante dos horas. El peso perdido en el crisol tras la incineración del residuo seco, representa el contenido en Sólidos Volátiles. De la misma forma que los Sólidos Totales, esta técnica analítica se realizó de acuerdo con el método estándar 2540 E de la APHA-AWWA-WPFC (1999), y se calcula utilizando la siguiente ecuación:



$$STV = \frac{(m_3 - m_4)}{V} \cdot 1\,000\,000 \quad (2.2)$$

Dónde:

$STV$ = Son los sólidos totales volátiles, en mg/L;

$m_3$ = es la masa del crisol con el residuo, después de la evaporación, en g;

$m_4$ = es la masa del crisol con el residuo, después de la calcinación, en g, y

$V$ = es el volumen de muestra, en mL.

#### 2.5.3.4 Sólidos Suspendidos Totales (SST)

Los sólidos suspendidos totales o el residuo no filtrable de una muestra de agua natural o residual industrial o doméstica, se define como material constituido por los sólidos sedimentables, los sólidos suspendidos y coloidales que son retenidos por un filtro de fibra de vidrio con poro de 1,5  $\mu\text{m}$  secado y llevado a masa constante a una temperatura de  $105\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ . Es un parámetro utilizado en la calificación de la calidad del agua y en el tratamiento de aguas residuales. Indica la cantidad de sólidos presentes, en suspensión y que pueden ser separados por medios mecánicos, como por ejemplo la filtración en vacío, o la centrifugación del líquido. Algunas veces se asocia a la turbidez del agua. Esta técnica analítica se realizó de acuerdo con el método estándar 2540 D de la APHA-AWWA-WPFC (1999), y se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$$SST = \frac{(m_6 - m_2)}{V} \cdot 1\,000\,000 \quad (2.3)$$

Dónde:

$SST$ = son los sólidos suspendidos totales, en mg/L

$m_2$ = es la masa del soporte de secado con el filtro antes de la filtración, en g;

$m_6$ = es la masa del soporte de secado con el filtro, en g, y

$V$  = es el volumen de muestra, en mL.

### 2.5.3.5 Demanda Química de Oxígeno Total (DQO<sub>T</sub>)

La demanda química de oxígeno es una medida del oxígeno equivalente al contenido de materia orgánica contenida en una muestra que es susceptible a la oxidación por un fuerte oxidante químico. La DQO<sub>T</sub> se llevó a cabo por el Micrométodo Colorimétrico 5220 D Standard Methods, para lo cual se utilizó una placa digestora (COD Reactor) marca Hach para suministrar el calor de reacción, un espectrofotómetro ODYSSEY DR2500 marca Hach para leer la transmitancia de la muestra y pipetas automáticas Eppendorf Research para realizar las determinaciones. Para calcular la concentración de DQO de las muestras, se ajustó la longitud de onda a 620 nm, luego se realiza una curva de calibración con concentraciones de 0 a 1500 mg/L.

### 2.5.3.6 Nitrógeno total

El nitrógeno total se midió siguiendo la técnica analítica del método 4500-Norg B SM, que se basa en digerir la muestra con la temperatura, en medio ácido con un catalizador de selenio de forma que los compuestos orgánicos nitrogenados tomen formas amoniacales. Posteriormente se analiza el contenido total de sales amoniacales mediante la destilación de la muestra digerida.

Para determinar la cantidad de nitrógeno total fue necesario realizar las operaciones correspondientes mediante la siguiente ecuación:

$$mg N = \frac{(A - B) \cdot 280}{ml muestra} \quad (2.4)$$

Dónde:

A= mL gastados de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en la muestra,

B= mL gastados de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en el blanco.

### 2.5.3.7 Fósforo total

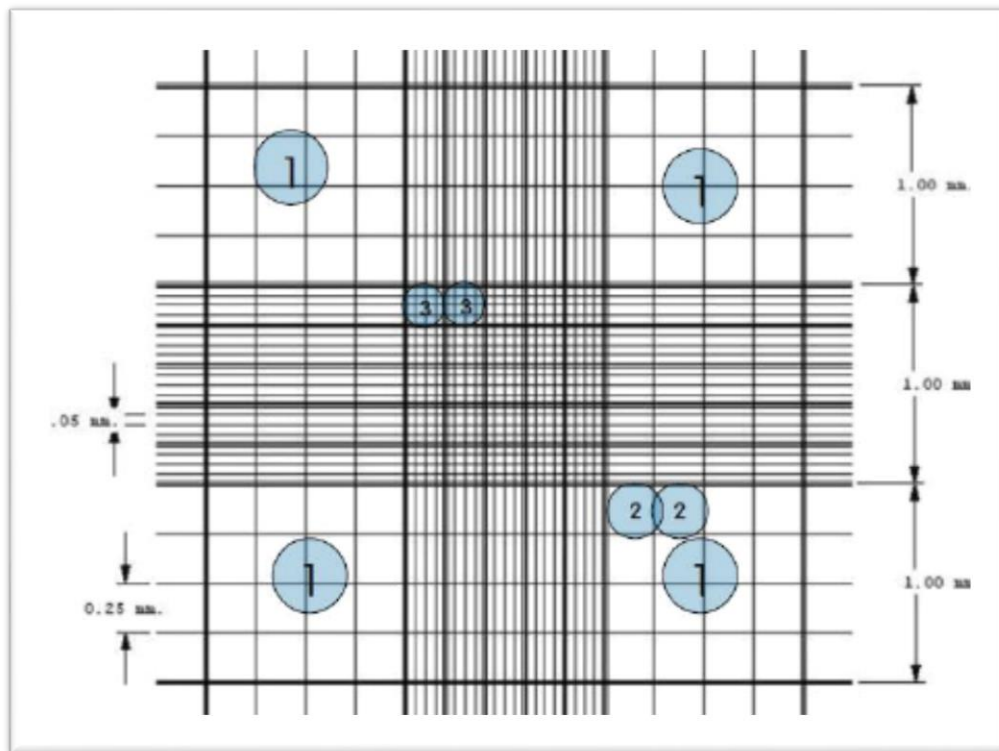
El fósforo total (P) se determina en una muestra sin filtrar y en ella están presentes todas las formas de fósforo. Debido a que el fósforo puede estar presente en combinación con la materia orgánica, es necesario para determinar el fósforo total, preparar la muestra mediante un método de digestión capaz de oxidar la materia orgánica efectivamente, para liberar el fósforo como ortofosfato, para su posterior determinación por el Método del Ácido Ascórbico. La concentración de fósforo total se registra como mg P total /L.

### 2.5.3.8 Coliformes fecales

La norma NMX-AA-042-SCFI-2015 establece un método para la detección y cuantificación de los microorganismos coliformes mediante el cultivo en un medio líquido en varios tubos y el cálculo de su Número Más Probable (NMP).

### 2.5.3.9 Concentración celular: cámara de Neubauer

El conteo directo de células es importante en los cultivos algales ya que es necesario conocer la concentración celular que estos cultivos tienen. Uno de los métodos utilizados para medir la concentración celular es por medio de la cámara Neubauer, la cual presenta dos cámaras. En la cara superior del portaobjetos, se encuentran cuatro canales longitudinales y un canal transversal central, a cuyos lados superior e inferior existen grabados dos cuadros de 9 mm<sup>2</sup> de superficie, subdivididos a su vez en una cuadrícula más fina. En la Figura 2.8 se muestra el detalle de los cuadros que componen a la cámara de Neubauer; para la presente investigación, el conteo celular para la microalga *Chlorella spp.*, se realizó en los cuadros señalados con el número 3, y para la cianobacteria *Spirulina maxima* en los cuadros señalados con el número 1 (Celeromics, 2013 citado en González, 2015).



**Figura 2.10** Detalle de la rejilla de una cámara de Neubauer (Celeromics, 2013 citado en Gonzalez, 2015)

El cálculo de la concentración celular está expresada por el número de células por mililitro (Ecuación 2.5).

$$\text{Concentración} = \frac{\text{número de células}}{\text{Volumen (en ml)}} \quad (2.5)$$

El recuento de cuadros grandes en cámara de Neubauer esta expresada por la Ecuación 2.6, la cual se aplicó para el cálculo de la densidad celular de *Spirulina maxima*.

$$\text{Concentración} = \frac{\text{número de células} * 10\ 000}{\text{número de cuadros}} \quad (2.6)$$

El recuento para el cuadro central de la cámara de Neubauer se expresa en la Ecuación 2.7, la cual se aplicó para el cálculo de la densidad celular en *Chlorella spp.*

$$\text{Concentración} = \frac{\text{número de células} * 250\ 000}{\text{numero de cuadros}} \quad (2.7)$$

### 2.5.3.10 Biomasa: Peso seco

La biomasa de las microalgas se cuantificó filtrando una cantidad conocida de medio de cultivo, a través de un filtro Whatmann GF/C de 1.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, previamente lavado y llevado a peso constante. La muestra se coloca en una estufa a 105 °C durante 24 horas y posteriormente se coloca en un desecador por 20 minutos. Por diferencia de pesos se obtiene el peso seco. Para calcular el peso seco de la muestra se aplica la siguiente ecuación:

$$\text{Peso seco} \left( \frac{g}{L} \right) = (PFM - PF) \cdot R \quad (2.8)$$

Dónde:

PFM= peso seco del filtro más la microalga

PF= peso seco del filtro

R= la razón L/ mL filtrados (1000/x mL)

## 2.6 Determinación de parámetros cinéticos

### 2.6.1 Parámetros cinéticos en la degradación de nutrientes

La relación entre los nutrientes y la tasa de crecimiento de una comunidad o población se puede describir con el modelo de Monod. En este modelo, la tasa de crecimiento específico máxima toma en cuenta los efectos de las limitantes en este caso, de los recursos renovables:

$$\mu = \mu_{\text{máx}} \frac{S}{K_S + S} \quad (2.9)$$

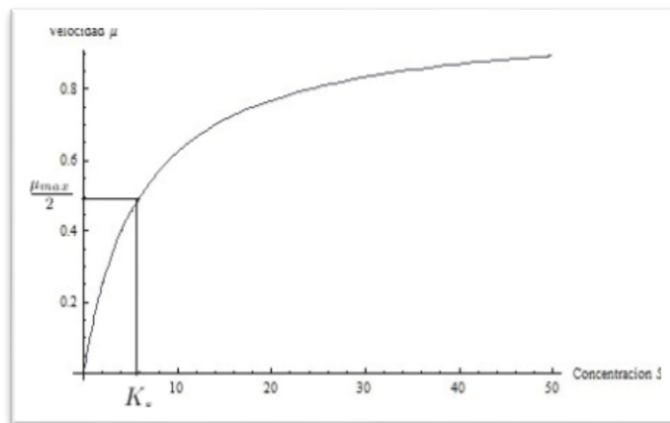
Dónde:

$\mu$  = tasa de crecimiento específico ( $\text{día}^{-1}$ ).

S = nutriente o la concentración del sustrato (mg S/L)

$K_S$  = constante de saturación media (mg S/L)

El sustrato o “comida” en la ecuación 2.9 puede ser un macronutriente o un micronutriente que límite el crecimiento. La constante de saturación media ( $K_S$ ) se define como la concentración del sustrato (S) a la cual la tasa de crecimiento es la mitad de su valor máximo, es decir,  $\mu = \mu_{\text{máx}}/2$ . La grafica de  $\mu$  como función del sustrato aparece en la Figura 2.9:



**Figura 2.11** El efecto de la concentración sustrato (S) sobre la velocidad de crecimiento ( $\mu$ )

Los organismos con un bajo  $K_S$  se aproximan a su tasa de crecimiento específica máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ) a concentraciones de sustrato comparativamente bajas, en tanto que aquellos cuyos altos valores de  $K_S$  requieren de niveles más altos de sustrato para alcanzar el mismo nivel de crecimiento (Mihelcic and Zimmerman, 2012).

### 2.6.1.1 Estimación de los parámetros cinéticos de la ecuación de Monod

Los valores de los parámetros  $\mu_{\text{máx}}$  y  $K_S$  son obtenidos a partir de las siguientes relaciones lineales, donde tenemos que  $\frac{1}{\mu}$  en función de  $\frac{1}{S}$ . Se toman los inversos de ambos miembros de la ecuación de Monod, y se tiene que:

$$\frac{1}{\mu(S)} = \frac{K_S}{\mu_{\text{máx}}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{\text{máx}}} \quad (2.10)$$

Se observa que la ecuación anterior tiene la forma de la ecuación de una línea recta ( $y = mx + b$ ). Obteniendo la ecuación de Lineweaver-Burk con:

$$m = \frac{K_S}{\mu_{\text{máx}}} \quad b = \frac{1}{\mu_{\text{máx}}}$$

Lo cual requiere conocer  $\frac{1}{\mu(S)}$  y  $\frac{1}{S}$  para poder hacer la estimación de la pendiente  $m$  y la ordenada al origen  $b$ , haciendo uso de la metodología de regresión lineal y realizada esto conocer los parámetros  $\mu_{\text{máx}}$  y  $K_S$ . La gráfica que modela la ecuación lineal de Lineweaver-Burk se presenta en la Figura 2.13.

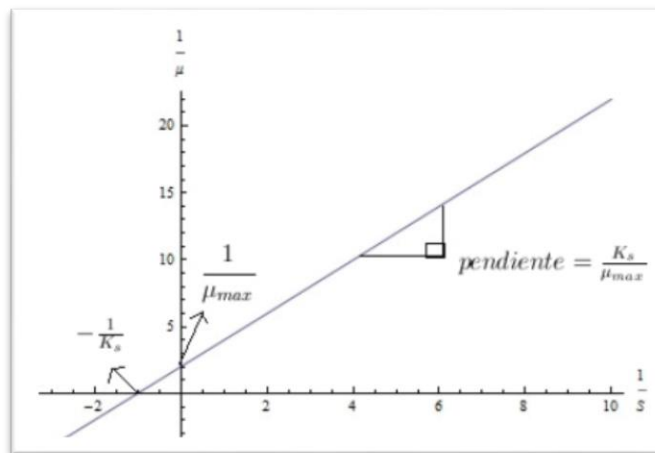


Figura 2.12 Diagrama de Lineweaver-Burk

## 2.6.2 Parámetros cinéticos de desarrollo poblacional

De acuerdo a Band (1997) y Morris (2004) citado en Caballero (2013), con los valores obtenidos de densidad celular en los cultivos, se determinará la velocidad o tasa de crecimiento celular (ecuación 2.11), tiempo de duplicación (ecuación 2.12) y número de generaciones (ecuación 2.13):

### 2.6.2.1 Tasa de crecimiento celular

Número de células o masa celular por unidad de tiempo.

$$\mu = \frac{\ln X_1 - \ln X_0}{\Delta t} \quad (2.11)$$

Dónde:

$\mu$  = velocidad o tasa de crecimiento celular,

$X_1$  = densidad celular al tiempo t.

$X_0$  = densidad celular al tiempo inicial.

### 2.6.2.2 Tiempo de duplicación ( $t_d$ )

Tiempo necesario para que a partir de una célula se formen dos (para que una célula se duplique)

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (2.12)$$

Dónde:

$t_d$  = tiempo de duplicación.

$\mu$  = velocidad ó tasa de crecimiento.



### 2.6.2.3 Número de generaciones (ng):

Numero de divisiones celulares en un determinado tiempo=generaciones.

$$ng = \frac{\log x_1 - \log x_0}{\log 2} \quad (2.13)$$

### 2.6.2.4 Rendimiento de la biomasa

El rendimiento es la biomasa producida por cantidad de sustrato consumida. Para su cálculo se utiliza la siguiente expresión:

$$Y = \frac{X_t - X_0}{S_0 - S_t} \quad (2.14)$$

Donde

$X_t$  es la concentración de células en el tiempo y se calcula en el momento de fase estacionaria en el que el número de células es más elevado (mg/L) la cantidad de sustrato en el tiempo (t) que se obtiene el número de células más elevado  $S_t$

$X_0$  es la concentración inicial de células del inoculo (mg/L) a la cantidad de sustrato al inicio del cultivo  $S_0$

### 2.6.2.5 Productividad de la biomasa

La productividad de biomasa se determinó como productividad máxima ( $P_{\max}$ ) de acuerdo con la siguiente expresión (2.15) (Jacob-Lopes et al., 2007).

$$P_{max} = \frac{X_t - X_0}{t - t_0} \quad (2.15)$$

Donde

$X_0$  es la concentración inicial de biomasa (g/L) al tiempo  $t_0$

$X_t$  es la concentración de biomasa (g/L) en cualquier tiempo t

## **2.7 Análisis estadístico y discusión de resultados obtenidos.**

A los datos obtenidos de la degradación de P, degradación de N y crecimiento celular en los seis días de operación, se les realizó el análisis de varianza (ANOVA) y se comparó con el método de Tukey-Kramer para determinar si existe diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las tres concentraciones propuestas (25%, 50% y 75%) y elegir cual concentración es la idónea para ambas especies, y se realizó la discusión de los resultados obtenidos comparándolos con otros autores.

# **CAPÍTULO 3**

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente capítulo se presentan los resultados obtenidos en las etapas experimentales planteadas en la metodología de esta investigación, para el cumplimiento del objetivo general y objetivos específicos con la finalidad de obtener la mejor concentración que ofrezca la mayor remoción de nitrógeno y fósforo para ambas especies.

### 3.1 Etapa 1 Caracterización del efluente porcícola

#### 3.1.1 Caracterización del efluente porcícola crudo

Las características físico-químicas y microbiológicas presentes en el efluente porcícola se presentan en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1** Caracterización fisicoquímica y microbiológica del efluente porcícola crudo

<b>Físicos</b>	<b>Unidad</b>	<b>Valor promedio (<math>\bar{X}</math>)</b>	<b>Desviación estándar (s)</b>
pH	-	7.30	0.01
Temperatura	°C	20	-
Sólidos totales	mg ST/L	5453.33	712.834
Sólidos totales volátiles	mg STV/L	3193.33	480.555
Sólidos suspendidos totales	mg SST/L	551.33	174.706
<b>Químicos</b>	<b>Unidad</b>	<b>Valor promedio (<math>\bar{X}</math>)</b>	<b>Desviación estándar (s)</b>
Demanda química de oxígeno total	mg O <sub>2</sub> /L	1198.13	16.017
Fósforo total	mg P/L	11.91	0.095
Nitrógeno total	mg N-NTK/L	1002.40	2.8
N/P	-	84.16	-
<b>Microbiológico</b>	<b>Unidad</b>	<b>Valor promedio (<math>\bar{X}</math>)</b>	<b>Desviación estándar (s)</b>
Coliformes fecales	NMP/100 mL	4.60x10 <sup>08</sup>	0

Los resultados de la caracterización fisicoquímica del efluente porcícola crudo se utilizaron como indicadores de la calidad del sustrato alimentado a los fotobiorreactores, y se consideraron para establecer las condiciones de arranque y operación del proceso. De acuerdo al PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017, que establece los límites permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en cuerpos receptores propiedad de la nación, y a la Tabla 2.1 se puede observar que el pH, SST, DQO, P<sub>T</sub> y N<sub>T</sub> son los únicos parámetros que son indicadores de contaminación, por lo que se va a requerir disminuir los valores de estos parámetros antes y durante la operación de las pruebas experimentales.

### 3.1.2 Caracterización del efluente porcícola acondicionado

Se realizó tratamiento físico para disminuir la contaminación del agua, en la Tabla 3.2 se presenta la caracterización del efluente acondicionado.

**Tabla 3.2** Caracterización fisicoquímica y microbiológica del efluente porcícola acondicionado.

<b>Físicos</b>	<b>Unidad</b>	<b>Valor promedio (<math>\bar{X}</math>)</b>	<b>Desviación estándar (s)</b>
pH	-	7.82	0.01
Temperatura	°C	20	-
Sólidos totales	mg ST/L	4680	610.245
Sólidos totales volátiles	mg STV/L	3079.33	441.00
Sólidos suspendidos totales	mg SST/L	159.33	50.9640
<b>Químicos</b>	<b>Unidad</b>	<b>Valor promedio (<math>\bar{X}</math>)</b>	<b>Desviación estándar (s)</b>
Demanda química de oxígeno total	mg O <sub>2</sub> /L	934.04	5.010
Fósforo total	mg P/L	8.52	1.046
Nitrógeno total	mg N-NTK/L	940.80	1.979
N/P	-	110.42	-
<b>Microbiológico</b>	<b>Unidad</b>	<b>Valor promedio (<math>\bar{X}</math>)</b>	<b>Desviación estándar (s)</b>
Coliformes fecales	NMP/100 mL	2.4x10 <sup>07</sup>	0

Comparando la Tabla 3.1 y la Tabla 3.2, se observa que los procesos físicos de tamizado y sedimentación, influyeron en la disminución de los SST, logrando una remoción del 71.10%, la DQO presentó una remoción del 22.04%, y para los ST y SV la remoción fue de 14.18% y 3.56% respectivamente, para  $P_T$  se obtuvo una remoción del 28.46%, para  $N_T$  se obtuvo una mínima remoción del 6.14% y para Coliformes fecales se logró una remoción del 94.78%. A pesar de la gran remoción de SST y de la disminución de DQO que se obtuvo por medio del tratamiento físico, se observa que el agua residual acondicionada sigue presentando turbidez y el valor  $N_T$  es alto, por lo que se procedió a montar pruebas previas a las cinéticas para observar el comportamiento de las especies en el agua residual como medio.

### 3.1.3 Caracterización del efluente porcícola diluido de la mejor prueba previa

Antes de realizar la etapa 3 de pruebas experimentales, se procedió a realizar pruebas previas para observar si el efluente porcícola acondicionado es el adecuado para ser el medio de las especies *Spirulina maxima* y *Chlorella spp.* Como primera prueba previa a la Etapa 3, se llevó a cabo las condiciones de operación de pruebas experimentales presentadas en el apartado 2.5.2, y las concentraciones propuestas para la propagación, propuestas en la Tabla 2.5.

La primera prueba no fue la adecuada como medio para las especies, ya que después de unas horas los fotobiorreactores presentaron un color más oscuro (verde olivo), espuma en la superficie del medio, un olor desagradable y bajo el microscopio se observaron algas fragmentadas, en el caso de la concentración más alta no se encontró ninguna célula de ambas especies, se logró observar que el medio estaba lleno de otros microorganismos, en su caso al tratarse de efluente crudo de microorganismos patógenos.

Para las siguientes pruebas previas se procedió a realizarles diluciones, comenzando primero con una dilución v/v: agua destilada/agua residual del 50%, 75% y 80%, las cuales presentaron el mismo problema, la muerte celular de estas especies por fragmentación se debe a la alta toxicidad del efluente porcícola, por lo que se logró

encontrar la adecuada dilución que fue del 85% v/v: agua destilada/agua residual. En la Tabla 3.3 se presenta la caracterización del efluente acondicionado + diluido.

**Tabla 3.3** Caracterización del efluente porcícola diluido de la mejor prueba previa.

<b>Físicos</b>	<b>Unidad</b>	<b>Valor promedio (<math>\bar{X}</math>)</b>	<b>Desviación estándar (s)</b>
pH	-	7.95	0.01
Temperatura	°C	20	-
Sólidos totales	mg ST/L	1830	527.762
Sólidos totales volátiles	mg STV/L	1281	369.433
Sólidos suspendidos totales	mg SST/L	132	25.455
<b>Químicos</b>	<b>Unidad</b>	<b>Valor promedio (<math>\bar{X}</math>)</b>	<b>Desviación estándar (s)</b>
Demanda química de oxígeno total	mg O <sub>2</sub> /L	178.96	13.799
Fósforo total	mg P/L	2.35	0.183
Nitrógeno total	mg N-NTK/L	246.4	2.8
N/P	-	104.85	-
<b>Microbiológico</b>	<b>Unidad</b>	<b>Valor promedio (<math>\bar{X}</math>)</b>	<b>Desviación estándar (s)</b>
Coliformes fecales	NMP/100 mL	2.4x10 <sup>06</sup>	0

En la dilución del 85% v/v: agua destilada/agua residual, se pudo observar que las especies no presentaron muerte celular, y que esta dilución fue la adecuada como medio de cultivo, en comparación con el efluente crudo se logró mayor remoción para cada parámetro fisicoquímico y microbiológico, para SST la remoción fue de 76.05%, para DQO la remoción fue del 85.06%, para P<sub>T</sub> del 80.22%, para N<sub>T</sub> de 75.41% y por último para coliformes fecales una remoción del 99.47%.

En la Tabla 3.4 se presenta el resumen de la caracterización de los efluentes porcícola (efluente crudo, efluente acondicionado y efluente diluido) en comparación con los valores de límites permisibles de acuerdo al proyecto en modificación de la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996, que establece los límites

máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales para quedar como proyecto de modificación de la Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017, que establece los límites permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en cuerpos receptores propiedad de la nación.

**Tabla 3.4** Resumen de la caracterización de los efluentes porcícolas en comparación con los valores de límites permisibles de acuerdo a PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017.

Parámetro	Unidad	Valor promedio			Límite Permissible			
		EPC.	EPA.	EPA+D.	*	**	***	****
pH	-	7.30	7.82	7.95	6.5 – 8.5			
T	°C	20	20	20	35			
ST	mg ST/L	5453.33	4680	1830	NA			
STV	mg STV/L	3193.33	3079.33	1281	NA			
SST	mg SST/L	551.33	159.33	132	72	24	36	120
DQO <sub>T</sub>	mg O <sub>2</sub> /L	1198.13	934.04	178.96	180	120	72	180
P <sub>T</sub>	mg P/L	11.91	8.52	2.355	18	15	NA	NA
N <sub>T</sub>	mg N-NTK/L	1002.40	940.80	246.4	30	25	NA	NA
Coliformes fecales	NMP/100 MI	4.60x10 <sup>8</sup>	2.4x10 <sup>07</sup>	2.4x10 <sup>6</sup>	-			

EPC. Efluente Porcícola Crudo, EPA. Efluente Porcícola Acondicionado, EPD. Efluente Porcícola Acondicionado+Diluido, NA. No Aplica.

\* Ríos, arroyos, canales y drenes

\*\*Embalses, lagos y lagunas

\*\*\* Suelo: Riego de áreas verdes

\*\*\*\* Suelo: Infiltración y otros riego

En la Tabla 3.4 se observa que los parámetros de ST, STV y Coliformes fecales no presentan valor en el límite permisible de acuerdo al PROY- NOM-001-SEMARNAT-2017, debido a que estos no son parámetros de contaminación dado que ST y STV son parámetros para biosólidos o lodos, y Coliformes fecales es un indicador bacteriológico de contaminación para lodos de acuerdo a la NOM-004-SEMARNAT-2002, sin embargo este indicador nos proporciona la información necesaria para saber que a pesar de la separación previa que se hace de la excreta sólida a la limpieza de los corrales, los patógenos presentes en el grupo de coliformes fecales



nos indica que el agua de lavado durante la limpieza de los corrales arrastra partículas o fracciones sólidas de excremento.

El valor promedio de pH para los tres efluentes (Crudo, acondicionado y diluido) están dentro de los límites permisibles, para el caso de SST ninguno de los tres efluentes cae dentro de ningún límite permisible de los cuatro tipos de cuerpos receptores, para la DQO<sub>T</sub> el valor de efluente diluido fue el único que logró llegar a los límites permisibles de los cuatro tipos de cuerpos receptores presentados en la Tabla 3.4, se puede observar que el P<sub>T</sub> fue el único parámetro que en los valores promedios de los tres tipos de efluentes logró llegar al límite permisible de los dos tipos de cuerpos receptores presentados en la tabla, para el caso de los dos tipos de suelo, no aplica el límite permisible, sin embargo lo idóneo en el montaje de cinéticas es disminuir lo más posible el valor de P<sub>T</sub>. Para el N<sub>T</sub> se observa que al igual que el P<sub>T</sub>, los límites permisibles para los dos tipos de suelo, no aplica, sin embargo ninguno de los tres tipos de efluentes cae en el límite permisible de los dos tipos de cuerpos receptores, por lo que es necesario enfocarnos en este parámetro para bajar lo más que se pueda su valor.

### **3.2 Etapa 2 Propagación de las especies *Spirulina maxima* y *Chlorella spp* en fotobiorreactores con nutrientes sintéticos**

Adaptar las especies *Spirulina maxima* y *Chlorella spp*. a un medio de cultivo artificial necesario para su crecimiento de acuerdo a las recomendaciones dadas de los centros de investigación de donde se adquirieron, para su posterior experimentación. En la Figura 3.1 se muestra la propagación de ambas especies en el laboratorio de ambiental II del Instituto Tecnológico de Orizaba, en la parte superior del estante se aprecia los fotobiorreactores que contienen el cultivo de *Spirulina maxima*, y en la parte inferior los fotobiorreactores con el cultivo de *Chlorella spp*.



Figura 3.1 Propagación de *Spirulina maxima* (superior) y *Chlorella spp* (inferior)

### 3.2.1 Cianobacteria: *Spirulina maxima*

De acuerdo con las recomendaciones sugeridas por la universidad de Texas y el CINVESTAV para el correcto crecimiento de la cepa de *Spirulina maxima* se utilizó el medio de cultivo alcalino UTEX. En la Figura 3.2 se presentan las células de la cianobacteria *Spirulina maxima* vistas desde microscopio del Laboratorio de Ambiental II del Instituto Tecnológico de Orizaba.

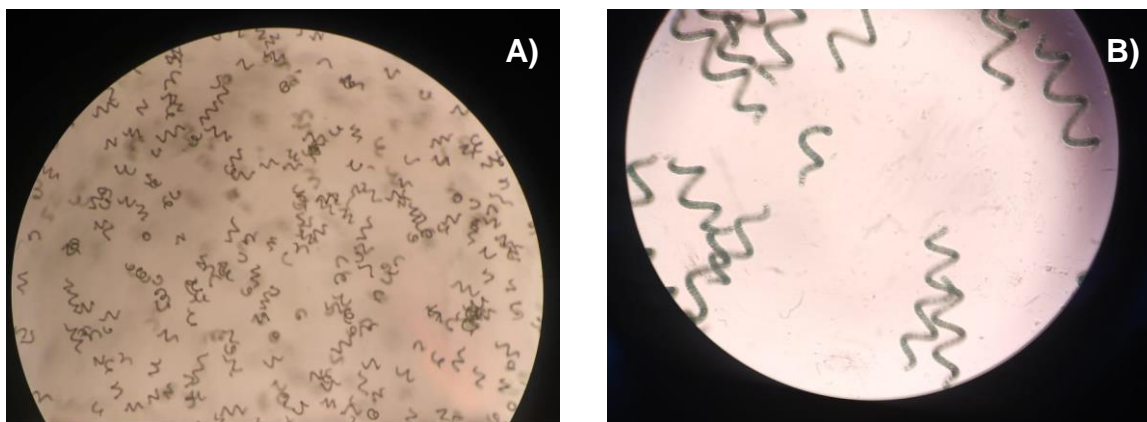


Figura 3.2 Células de *Spirulina maxima* vistas desde microscopio. A) 40x B) 100x

### 3.2.2 Microalga: *Chlorella spp*

El Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, recomendó para el correcto crecimiento de la cepa de *Chlorella spp*. El medio de cultivo alcalino 3N-BBM+V (CCAP) (medio Bold-Basal con Nitrógeno y Vitaminas triples; modificado). Se recibió 30 mL de la cepa *Chlorella spp*. Y para su propagación se procedió a sembrar 5 mL de la cepa en 6 matraces Erlenmeyer con 250 mL de medio de cultivo. En la Figura 3.3 se observan células de la microalga *Chlorella spp* vistas desde microscopio del laboratorio de ambiental II del Instituto Tecnológico de Orizaba.

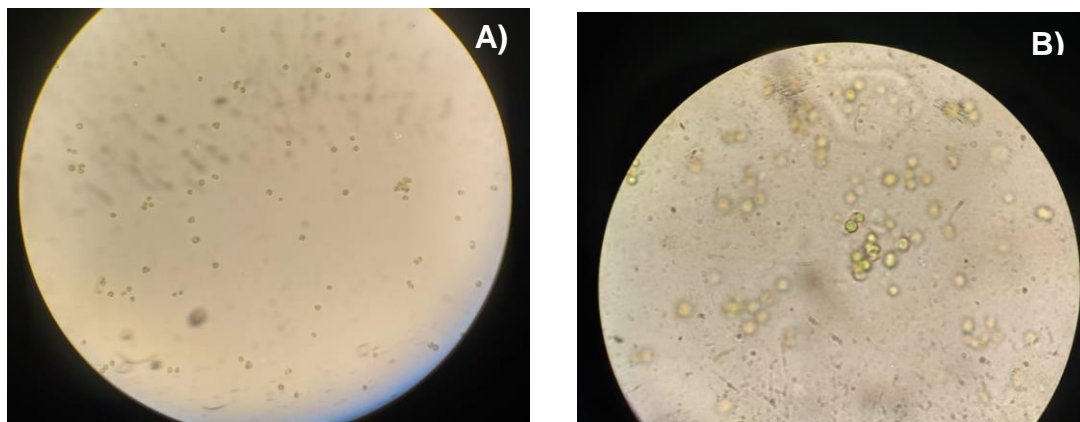


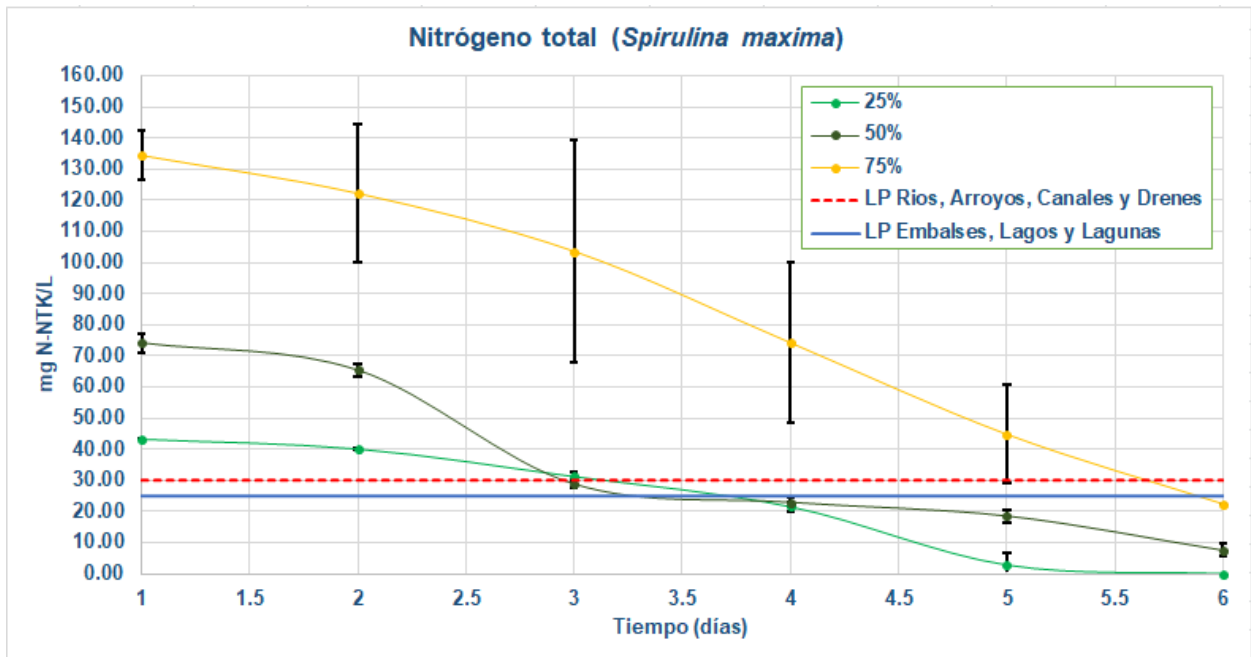
Figura 3.3 Células de *Chlorella spp* vistas desde microscopio. A) 40x B) 100x

### 3.3 Etapa 3 Pruebas experimentales para la remoción simultanea de nitrógeno y fósforo en efluentes de origen porcícola, empleando las especies *Spirulina maxima* y *Chlorella spp*.

#### 3.3.1 Degradación de nitrógeno durante el desarrollo de *Spirulina maxima*

En la figura 3.4 se presenta la disminución o remoción de  $N_T$  durante los seis días de operación experimental, los valores presentados en la gráfica de cada uno de los seis días corresponden al valor promedio para cada concentración con su respectiva replica. De acuerdo al PROY-NOM-001-SEMARNAT-1996, establece el valor límite permisible de 30 mg N-/L de promedio diario para descargas en cuerpos receptores como ríos, arroyos, canales y drenes, y un valor límite permisible de 25 mg P/L de promedio diario para embalses, lagos y lagunas. Se puede observar que para el

cuarto día de operación experimental la concentración del 25% llegó al límite permisible de promedio diario para los dos tipos de cuerpos receptores y para el sexto día logró la remoción del 100%, para la concentración del 50% requirió de tres días de operación para poder cumplir con el límite permisible para ríos, arroyos, canales y drenes, y de cuatro días para embalses, lagos y lagunas, sin embargo para el último día de operación logró una remoción del 89.87%. Se observó que la concentración del 75% seguía siendo un medio de cultivo tóxico debido a que pasando 24 horas, se notó un cambio de color en el cultivo y bajo el microscopio a comparación de las otra concentraciones se observó una disminución de células de *Spirulina maxima* así como fragmentación o ruptura de las células, cabe mencionar que esta situación se dio tanto en la réplica como en la muestra original del 75%, aunque se presentó mayormente en la muestra original, motivo por el que la desviación estándar presentados en las barras de error son muy altos. A pesar de haber sido un medio tóxico, logró cumplir con el límite permisible de ambos receptores hasta el día seis, con una remoción del 83.33%.



**Figura 3.4** Remoción de nitrógeno por *Spirulina maxima*

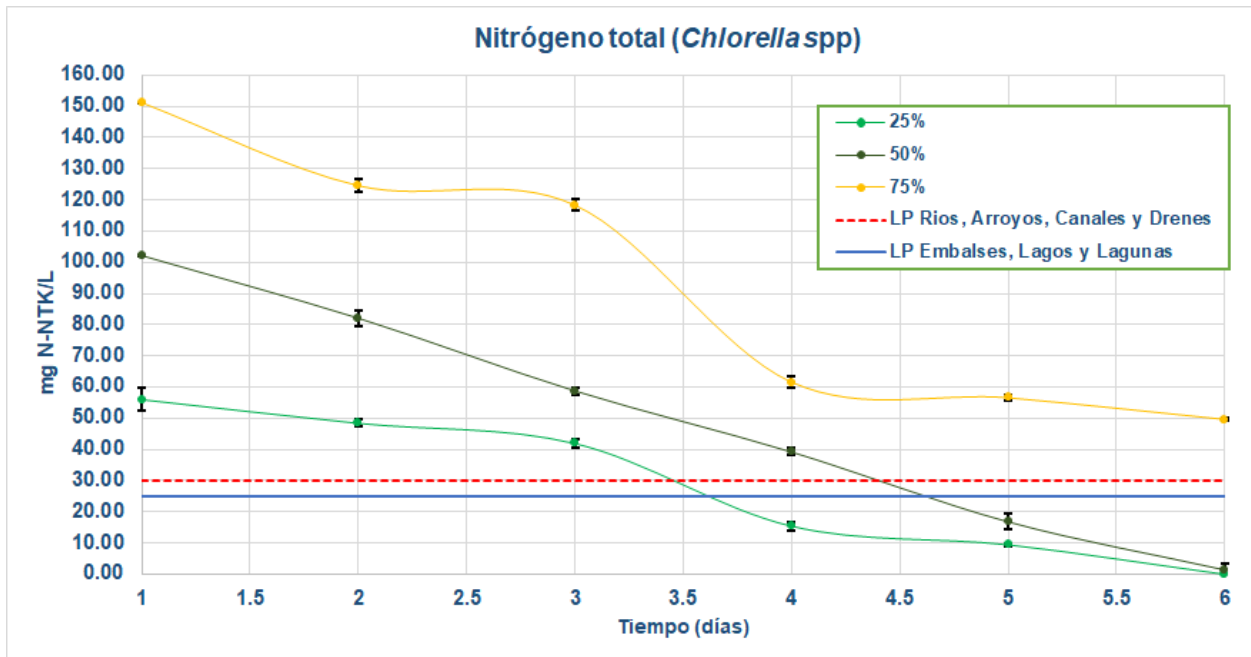
Olguín et al. (2003) citado en Cai et al. (2013), reportaron una remoción de nitrógeno amoniacal de 84-96% en aguas residuales de porqueriza mediante un proceso semicontinuo y Phang et al. (2000) citado en Cai et al. (2013) reportan una remoción de 96-100% de nitrógeno amoniacal presente en aguas residuales empleando *Spirulina platensis* en un tiempo de 15 días en un proceso batch. El tiempo que se empleó en este proyecto fue menos de la mitad presentado por Phang et al. (2000) y la concentración del 25% logró la remoción del 100% cayendo dentro de este intervalo reportado. La concentración de 25% logró sobrepasar el intervalo reportado por Olguín et al. (2003) lo que resulta favorable, la concentración de 50% cae dentro de este intervalo y la concentración de 75% no quedó muy lejos de este intervalo y logró entrar dentro de los límites permisibles, lo cual es favorable.

### 3.3.2 Degradación de nitrógeno durante el desarrollo de *Chlorella spp.*

Una observación que se debe tomar en cuenta en esta etapa, es que los valores del día uno de  $N_T$  son diferentes en ambas especies si las comparamos con su respectiva concentración, es decir los valores son muy distantes, esto pudo ocurrir al momento de montar las cinéticas debido a que ambas especies usan distintos medios de cultivo artificial y el 30% del volumen algal que se adicionó a los fotobiorreactores de ambos medios artificiales pudo variar en los nutrientes de N y P, esa sería la razón del porque los valores de  $N_T$  en los fotobiorreactores de *Chlorella spp* son más altos ligeramente que los de *Spirulina maxima*.

La Figura 3.5 presenta la degradación de  $N_T$  a lo largo de seis días mediante la microalga *Chlorella spp*, como se puede observar, el experimento de la concentración del 25%, para el día cuatro el valor de  $N_T$  ya se encontraba dentro de ambos límites permisibles de promedio diario de acuerdo a la PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017, y para el último día de operación logró una remoción del 100%, la concentración del 50% para el día cinco ya había logrado pasar por los límites permisibles de ambos cuerpos receptores, el cual para el último día de operación logró una remoción del 98.63%. A diferencia de las pruebas con *Spirulina maxima*, se

observa que este medio en la concentración de 75% no fue tóxico para esta alga ya que no presentó las características de la *Spirulina maxima* ya mencionadas en el apartado 3.3.1. Para la concentración del 75%, se observa que en estos seis días de operación a pesar que no logró llegar a los límites permisibles, obtuvo una remoción del 67.15%.



**Figura 3.5** Remoción de nitrógeno por *Chlorella spp.*

Gonzales et al. (1997) citado en Cai et al. (2013), reportaron una remoción de nitrógeno amoniacal de 30-95% en aguas residuales industriales empleando la especie *Chlorella vulgaris* en un tiempo de remoción de 5-9 días en proceso batch, Wang et al. (2010) citado en Cai et al. (2013) emplearon *Chlorella spp* en lodos diluidos procedentes de la digestión anaerobia de estiércol de ganado en proceso batch por un tiempo de 21 días reportando una remoción 76-83% de  $N_T$  y Li et al. (2011) citado en Hernández-Pérez et al. (2014) utilizaron *Chlorella spp* para el tratamiento de aguas residuales municipales altamente concentradas removiendo 93,9% para amonio y 89,1% para nitrógeno total. La concentración del 25% logró una remoción del 100% y logró estar por encima de los reportados, lo cual es excelente para nuestro proyecto, la concentración del 50% logró una remoción del 98.63% en

solo seis días sobrepasando lo reportado, lo que es favorable. La concentración del 75% cae dentro de los valores reportados por Gonzales et al. (1997) y no esta tan lejos de los valores reportados por Wang et al. (2010). Tam and Wong (1996) citado en Hernández-Pérez et al. (2014) menciona que es importante considerar que altas concentraciones de nitrógeno en forma de amonio, no afectan significativamente el crecimiento de *C. vulgaris*.

### **3.3.3 Degradación de fósforo durante el desarrollo de *Spirulina maxima***

En la Figura 3.6 se presenta la disminución de  $P_T$ , durante los seis días de operación experimental, de acuerdo al PROY-NOM-001-SEMARNAT-1996, establece el valor límite permisible de 18 mg P/L de promedio diario para descargas en cuerpos receptores como ríos, arroyos, canales y drenes, y un valor límite permisible de 15 mg P/L de promedio diario para embalses, lagos y lagunas.

De acuerdo a la Tabla 3.3 el valor del  $P_T$  del efluente porcícola acondicionado + diluido es de 2.355 mg P/L, cuyo valor ya está dentro de ambos límites permisibles, pero se puede observar en la Figura 3.6 que los valores iniciales de  $P_T$  en las distintas concentraciones aumentaron ligeramente, esto como ya se mencionó en el apartado 3.3.2 se debe al medio de cultivo artificial que aumento la concentración del nutriente del efluente porcícola acondicionado+diluido en sus distintas concentraciones, sin embargo este aumento sigue estando dentro de los límites permisibles, aun así se prosiguió con la remoción en la cual en el día seis la concentración de 25% logro una remoción de 50.16%, la concentración del 50% una remoción del 23.07% y la concentración del 75% no presentó disminución en la concentración del nutriente, esto debido a que el medio fue tóxico para la alga lo que ocasionó la muerte y fragmentación celular, la fragmentación es difícil separarla del medio por lo que al hacer la determinación, esta no solo determinó el  $P_T$  del medio, si no de las células fragmentadas, dando valores altos y distintos, por lo que no presentó porcentaje de remoción.

Olguín et al. (2003) citado en Cai et al. (2013), reportaron una remoción de ortofosfato total de 72-87% en aguas residuales de porqueriza mediante un proceso semicontinuo y Phang et al. (2000) citado en Cai et al. (2013) reportan una remoción ortofosfato total de 87-99% presente en aguas residuales empleando *Spirulina platensis* en un tiempo de 15 días en un proceso batch. Ninguna de las tres concentraciones quedó dentro de los intervalos de remoción de ambos autores, sin embargo se logró llegar a los límites permisibles y se logró para las concentraciones de 25% y 50% una mínima reducción del  $P_T$ .

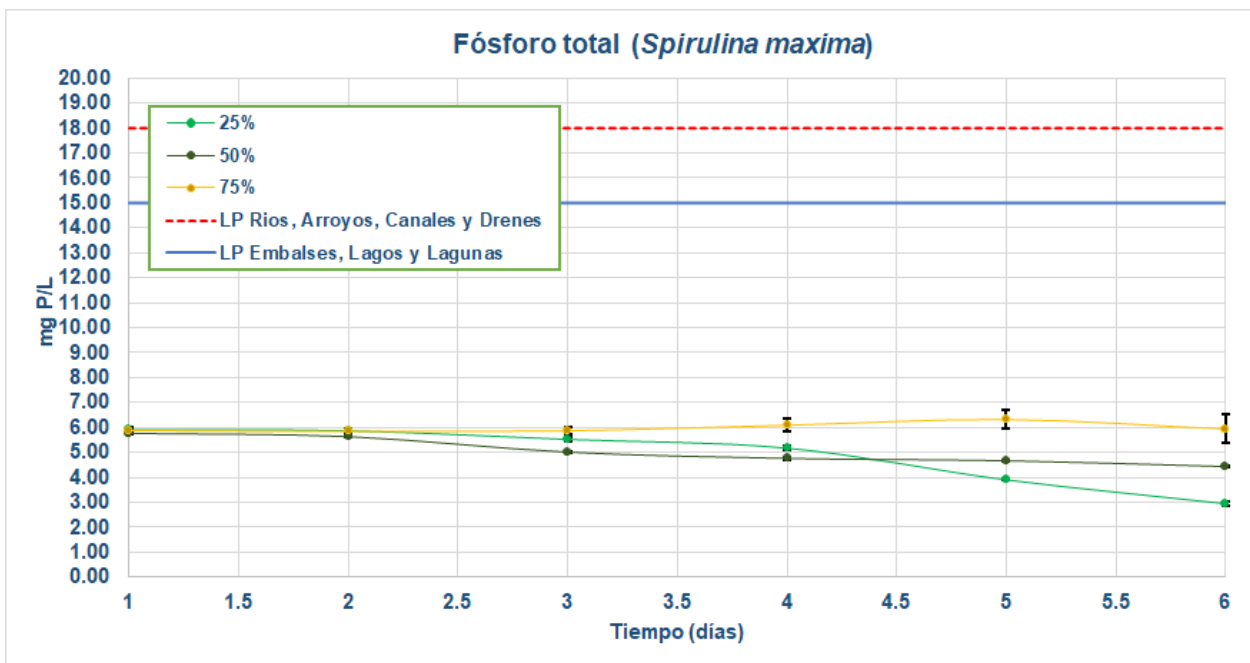


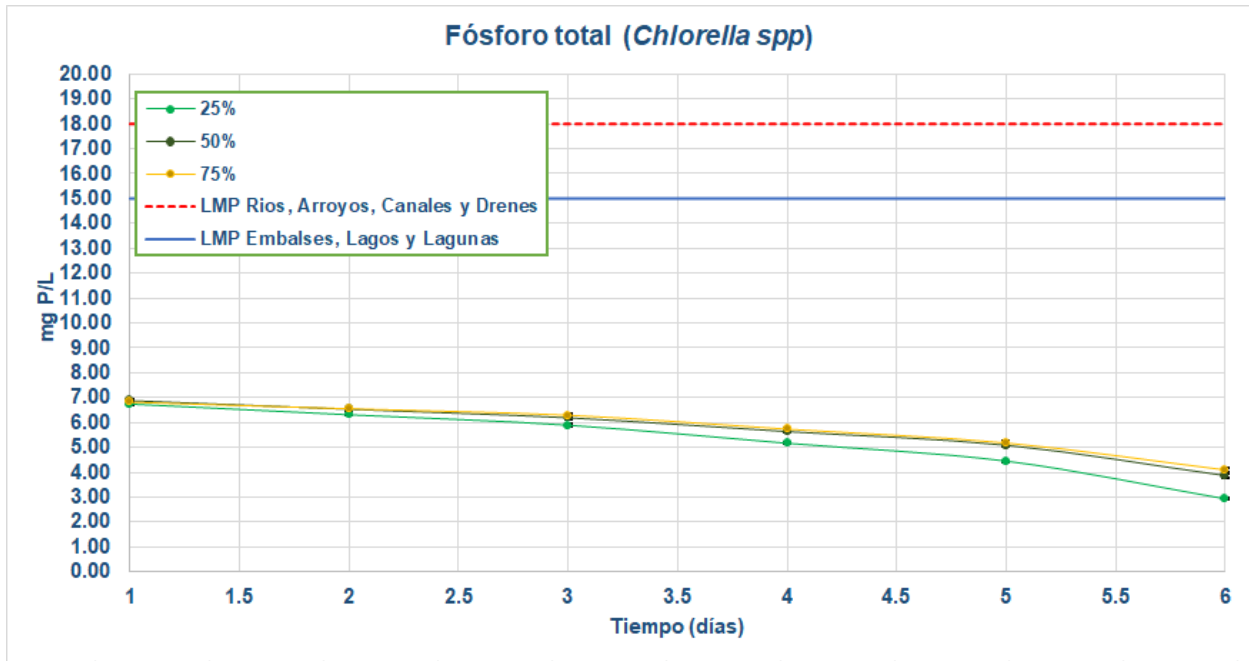
Figura 3.6 Remoción de fósforo por *Spirulina maxima*

### 3.3.4 Degradación de fósforo durante el desarrollo de *Chlorella spp*

Se puede observar en las gráficas que la toxicidad de la concentración del 75%, solo afecto a la *Spirulina maxima*, ya que se puede apreciar en la Figura 3.7 así como en la 3.5 que tiene un buen comportamiento al mostrar la reducción de la concentración de los nutrientes en los seis días de operación experimental. Al igual que las pruebas de  $P_T$  por medio de *Spirulina maxima*, los valores del primer día de operación están dentro de los dos límites permisibles de ambos cuerpos receptores cumpliendo con



la PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017, sin embargo para el día seis la concentración de 25% removi6 el 56.48%, la concentración del 50% el 43.75% y la concentración del 75% de 39.95%.



**Figura 3.7** Remoci6n de f6sforo por *Chlorella spp.*

Gonzales et al. (1997) citado en Cai et al. (2013), reportaron una remoci6n de  $P_T$  del 20-55% en aguas residuales industriales empleando la especie *Chlorella vulgaris* en un tiempo de remoci6n de 5-9 d6as en proceso batch, Wang et al. (2010) citado en Cai et al. (2013) emplearon *Chlorella spp* en lodos diluidos procedentes de la digesti6n anaer6bica de esti6rcol de ganado en proceso batch por un tiempo de 21 d6as reportando una remoci6n 63-75% de  $P_T$  y Li et al. (2011) citado en Hern6ndez-P6rez et al. (2014) utilizaron *Chlorella spp* para el tratamiento de aguas residuales municipales altamente concentradas removiendo 80,9% de  $P_T$ . Los valores de remoci6n de las concentraciones del 50% y 75% solo se encuentran dentro de los valores reportados por Gonzales et al. (1997) citado en Cai et al. (2013), para el caso de la concentraci6n del 25% este se pas6 del intervalo, sin embargo el resultado obtenido fue bueno. A pesar de que los valores ya estaban dentro de los l6mites

permisibles, se logró disminuir ligeramente la concentración de  $P_T$  presente en los tres medios.

### 3.4 Etapa 4 Caracterización del efluente tratado y evaluación de la calidad.

#### 3.4.1 Monitoreo de pH durante el desarrollo de *Spirulina maxima*.

El comportamiento del pH se mantuvo dentro de los valores aceptables para su propagación de acuerdo a Quintero-Rodríguez et al. (2016) de pH 8.5 y 11.5. En la Figura 3.8 se presentan los resultados del monitoreo de pH para la cianobacteria *Spirulina maxima* en los seis días de operación.

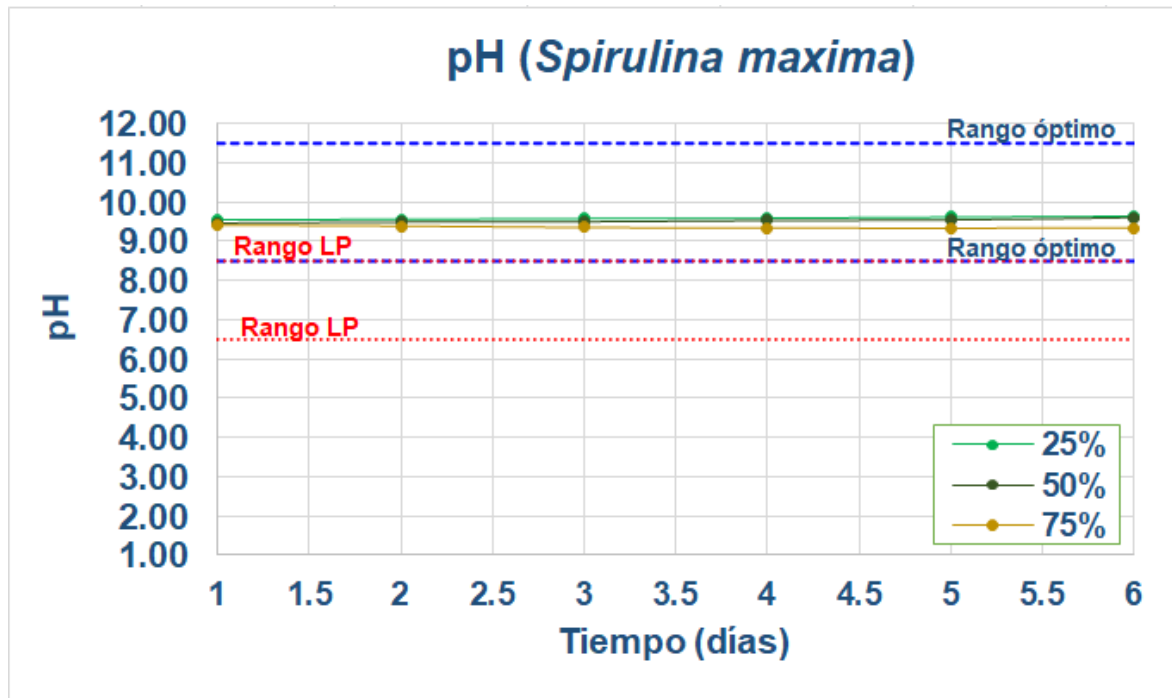


Figura 3.8 Monitoreo de pH con *Spirulina maxima*

Se puede observar en la gráfica, los valores de pH del primer día para las tres concentraciones son muy altos en comparación con el pH de 7.95 del efluente porcícola acondicionado + diluido que se reporta en la Tabla 3.3, este pH alto se debe al 30% medio de cultivo algal que se adicionó a los fotobiorreactores en el montaje de las cinéticas, el cual ya presentaba un pH de 9.47. Los valores de pH

para las tres concentraciones se mantuvieron constantes, al tratarse de un alga que se propaga en un medio alcalino, los valores no se encuentran dentro del rango de límite permisible de la PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017

### 3.4.2 Monitoreo de pH durante el desarrollo de *Chlorella spp.*

En la Figura 3.9 se presentan el monitoreo de pH para la microalga *Chlorella spp* en los seis días de operación, de acuerdo a Benavente- Valdés, et al. (2012) el rango de pH para la mayoría de los cultivos de microalgas está entre 7 y 9. Se puede observar que el medio de cultivo algal del 30% no afecto al pH del día uno de las tres concentraciones, los valores de las tres concentraciones a lo largo de las pruebas experimentales se mantuvieron constantes, y dentro del rango óptimo de crecimiento y del rango límite permisible de la PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017.

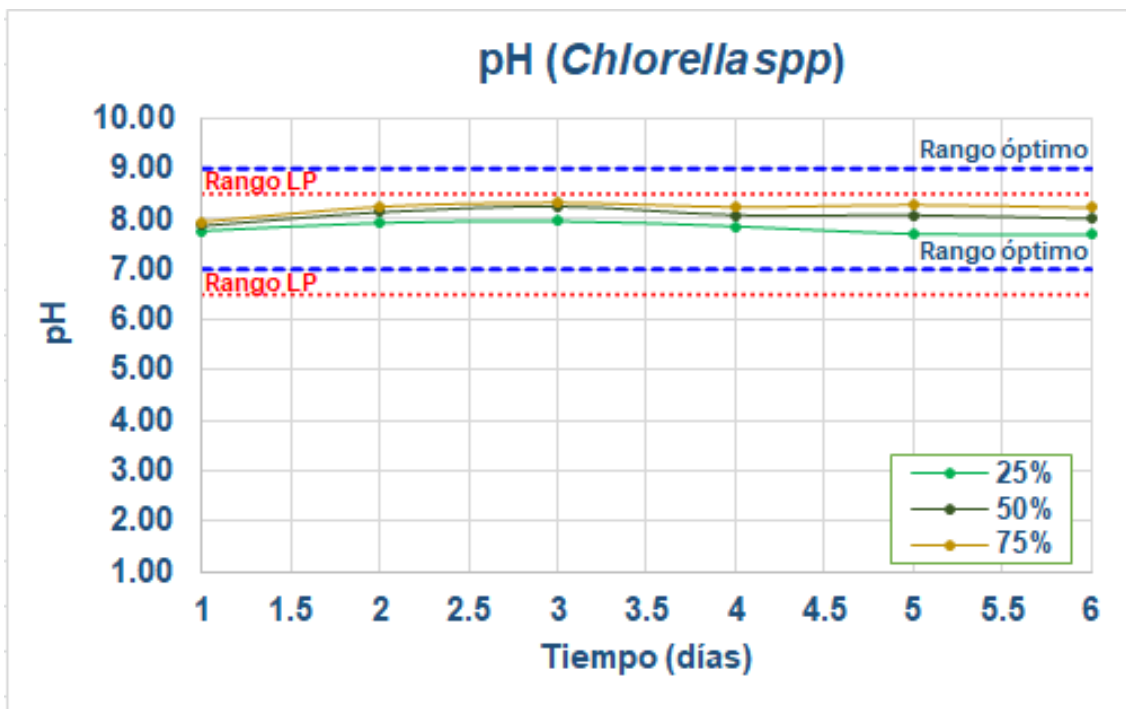
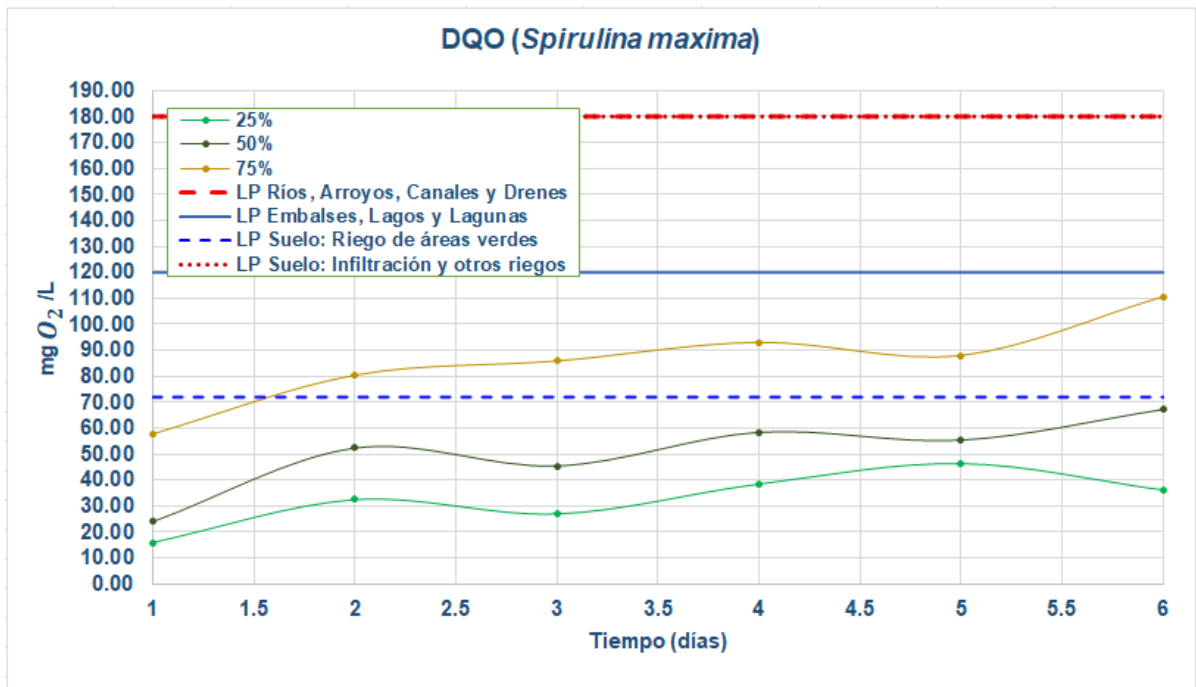


Figura 3.9 Monitoreo de pH con *Chlorella spp.*

### 3.4.3 Monitoreo de DQO durante el desarrollo de *Spirulina maxima*

En la Figura 3.10 se presenta el monitoreo de DQO, en el que se graficó el promedio total de las tres concentraciones en los seis días de prueba experimental empleando *Spirulina maxima*. De acuerdo a la Tabla 3.3 se reportó una  $DQO_T$  de 178.96 de  $mg O_2/L$  en el efluente porcícola acondicionado + diluido, el cual con las concentraciones de los fotobiorreactores lograron bajar un poco más los valores de DQO como se aprecia en la Figura 3.10 para el día uno, el cual como se puede observar los valores son distintos para todos, esto se debe a la concentración de alimentación de cada prueba, entre mayor es su dilución con agua, menor es su DQO.



**Figura 3.10** Monitoreo de DQO con *Spirulina máxima*

Las concentraciones del 25 y 50% desde el día uno se encuentran dentro de los cuatro límites permisibles que se presentan en el PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017, para el día dos aumentan ligeramente los valores de la  $DQO_T$ , esto pudo ocurrir debido a la homogeneización de los fotobiorreactores, los valores de  $DQO_T$  se mantuvieron constantes hasta el día seis, no se presentó remoción en ninguna concentración pero cumplieron con los cuatro límites permisibles, siendo la

concentración del 25% que obtuvo una  $DQO_T$  muy baja con un valor de 36.22 mg  $O_2/L$ . La concentración del 75% se vio afectada por la toxicidad del medio, ya que al sufrir fragmentación o ruptura las células de *Spirulina maxima*, estos fragmentos ya no son fáciles de separar del medio de cultivo, y al determinar  $DQO_T$  adquiere otro valor más alto por la presencia de fragmentos de la cianobacteria, es por esta razón que va incrementando con el tiempo el valor de su  $DQO_T$ , aún así logró mantenerse solo dentro de tres límites permisibles: ríos, arroyos, canales y drenes, embalses, lagos y lagunas, y por ultimo infiltración y otros riegos.

#### 3.4.4 Monitoreo de DQO durante el desarrollo de *Chlorella spp.*

En la Figura 3.11 se presenta el monitoreo de  $DQO_T$  de las tres concentraciones en los seis días de experimentación empleando *Chlorella spp.*

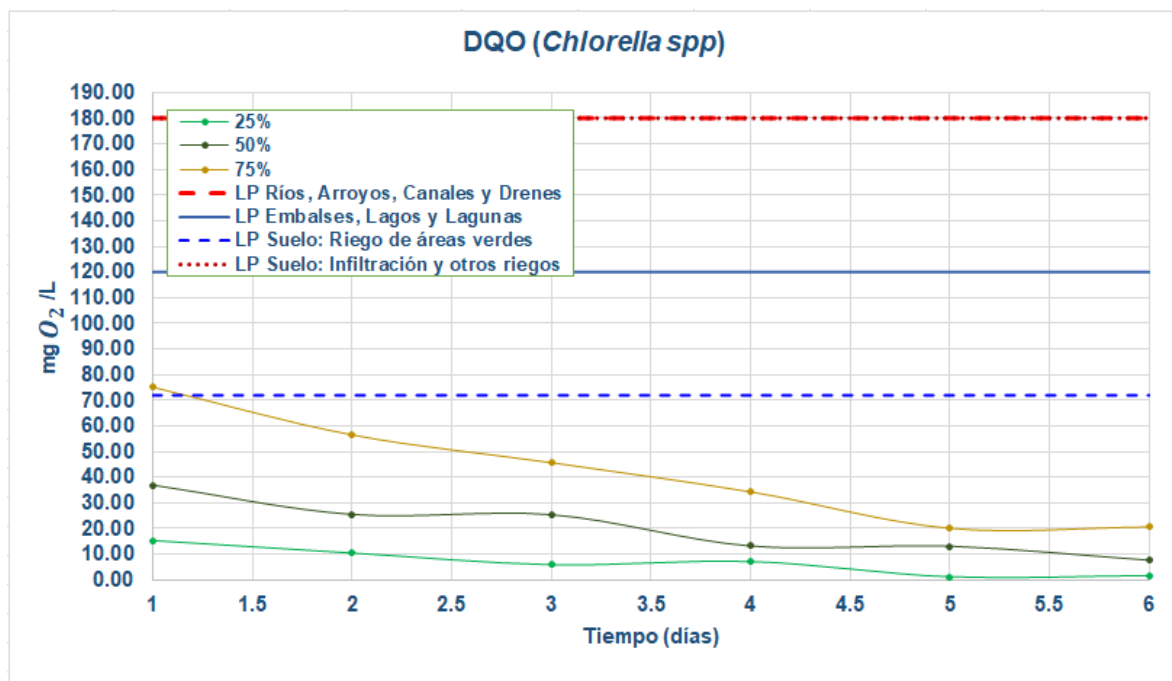


Figura 3.11 Monitoreo de DQO con *Chlorella spp.*

Podemos observar que los valores de  $DQO_T$  en el tiempo de experimentación en comparación con las pruebas con *Spirulina maxima* estos presentan una disminución con el tiempo y se logró obtener porcentajes de remoción, para la concentración del

25% se obtuvo una remoción de 88.74%, para la concentración del 50% una remoción de 79.18% y la concentración del 75% una remoción de 72.51%, del día dos al último día de experimentación, las tres concentraciones se lograron mantener dentro de los cuatros límites permisibles de acuerdo a la PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017.

Sin embargo Mezzomo et al. (2010) mencionan que se observó remoción de DQO durante las corridas experimentales así como también en aquellas pruebas que presentaron muerte celular, esto se puede explicar por el hecho de que la eliminación de la DQO podría no haber sido realizada exclusivamente por la microalga *Spirulina*, sino también por otros microorganismos en las agua residuales. Mencionan también que según Metcalf y Eddy (1993) y Ramalho (1980) la oxidación química causada por la aireación del sistema, que en este caso fue la bomba de aire para acuario también puede promover la reducción de la DQO de los medios.

Godos et al. (2009) citado en Hernández-Pérez et al. (2014) reporta que al tratar aguas residuales desde porquerizas en HRAP, obtuvieron una remoción de  $76 \pm 11\%$ . Por otro lado, Wang et al. (2010) citado en Hernández-Pérez et al. (2014) obtuvieron las más bajas con 27,4 a 38,4% de remoción para aguas residuales desde lodos de digestión anaerobia de estiércol de vacunos. Por último, Li et al. (2011) citado en Hernández-Pérez et al. (2014) registran valores de DQO de 90,3 y 90,8% en sus experimentos con *Chlorella spp*, concluyendo que las microalgas utilizaban rápidamente diferentes compuestos orgánicos como fuente de carbono, además del CO<sub>2</sub>.

#### **3.4.5 Caracterización del efluente tratado biológicamente por medio de la *Spirulina maxima***

En la Tabla 3.5 se presenta la caracterización de las tres concentraciones de efluentes porcícola después de su tratamiento biológico de seis días por medio de *Spirulina maxima*, comparándolos con sus valores límites permisibles de la PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017.

**Tabla 3.5** Caracterización de los efluente porcícola tratados biológicamente por medio de *Spirulina maxima* en comparación con los valores de límites permisibles de acuerdo a PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017.

Parámetro	Unidad	Valor promedio de EPTB			Límite Permissible			
		25%	50%	75%	*	**	***	****
pH	-	9.64	9.61	9.35	6.5 – 8.5			
T	°C	23	23	23	35			
ST	mg ST/L	160.12	320.25	480.375	NA			
STV	mg STV/L	112.08	224.17	336.26	NA			
SST	mg SST/L	11.55	23.10	34.65	72	24	36	120
DQO <sub>T</sub>	mg O <sub>2</sub> /L	36.22	67.21	110.66	180	120	72	180
P <sub>T</sub>	mg P/L	2.95	4.44	5.94	18	15	NA	NA
N <sub>T</sub>	mg N-NTK/L	0	7.52	22.40	30	25	NA	NA
N/P	-	0	1.69	3.77	NA	NA	NA	NA

EPTB. Efluente Porcícola Tratado Biológicamente, NA. No aplica

\* Ríos, arroyos, canales y drenes

\*\*Embalses, lagos y lagunas

\*\*\* Suelo: Riego de áreas verdes

\*\*\*\* Suelo: Infiltración y otros riego

Se observa que para el pH ninguna concentración logró cumplir con el límite permisible, por lo que para poder descargar ese efluente alcalino en algún cuerpo receptor se debe neutralizar para poder disminuir el pH. Las determinaciones de ST y STV no aplican para el PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017, sin embargo se reportan los resultados para observar que aun en diluciones, el efluente porcícola presenta materia orgánica e inorgánica. Los valores reportados de SST para las concentraciones del 25% y 50% cumplen con los cuatro límites permisibles para descarga en cada uno de los diferentes tipos de grupos de cuerpos receptores, sin embargo la concentración del 75% solo cumple con tres límites, no cumpliendo el límite permisible para descarga en embalses, lagos y lagunas. Para la DQO<sub>T</sub>, se observa que la concentración del 25% y 50% cumplen con los cuatro límites permisibles, sin embargo la concentración del 75% solo cumple con tres límites, no logrando el límite permisible para descarga en suelo: riego de áreas verdes. Para la determinación de P<sub>T</sub> Y N<sub>T</sub>, se observa que los límites permisibles no aplican para

suelos, aun así para ambas determinaciones, las tres concentraciones lograron cumplir con los otros dos límites permisibles.

En la Tabla 3.6 se presentan las determinaciones que son considerados como indicadores de contaminación por la PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017, con sus respectivos valores promedios iniciales de efluente porcícola crudo, y los valores promedios finales de efluente porcícola tratado biológicamente para cada una de las tres concentraciones de experimentación con su porcentaje de remoción R%. Se observa que la mayor remoción en cada una de las determinaciones se la llevó la concentración del 25%, seguido del 50% y por último el 75% el cual presentó un medio tóxico.

**Tabla 3.6** Porcentaje de remoción de los valores promedios de la caracterización de EPC con los valores promedio de EPTB por medio de *Spirulina maxima* de las tres concentraciones de experimentación.

Parámetro	Unidad	Valor EPC.	Valor promedio de EPTB			R%		
			25%	50%	75%	25%	50%	75%
SST	mg SST/L	551.33	11.55	23.10	34.65	97.91	95.81	93.72
DQO <sub>T</sub>	mg O <sub>2</sub> /L	1198.13	36.22	67.21	110.66	96.98	94.39	90.76
P <sub>T</sub>	mg P/L	11.91	2.95	4.44	5.94	75.23	62.72	50.13
N <sub>T</sub>	mg N-NTK/L	1002.40	0	7.52	22.40	100.0	99.25	97.77

EPC. Efluente Porcícola Crudo. EPTB. Efluente Porcícola Tratado Biológicamente. R% Porcentaje de remoción.

En la Tabla 3.6 se presentan las determinaciones que son considerados como indicadores de contaminación por la PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017, con sus respectivos valores promedios iniciales de efluente porcícola crudo, y los valores promedios finales de efluente porcícola tratado biológicamente para cada una de las tres concentraciones de experimentación con su porcentaje de remoción R%. Se observa que la mayor remoción en cada una de las determinaciones se la llevó la concentración del 25%, seguido del 50% y por último el 75% el cual presentó un medio tóxico.



### 3.4.6 Caracterización del efluente tratado biológicamente por medio de *Chlorella spp*

En la Tabla 3.7 se presenta la caracterización de las tres concentraciones de efluentes porcícola después de su tratamiento biológico de seis días por medio de *Chlorella spp*, comparándolos con sus valores límites permisibles de la PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017.

**Tabla 3.7** Caracterización de los efluente porcícola tratados biológicamente por medio de *Chlorella spp* en comparación con los valores de límites permisibles de acuerdo a PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017.

Parámetro	Unidad	Valor promedio de EPTB			Límite Permissible			
		25%	50%	75%	*	**	***	****
pH	-	7.69	8.01	8.23	6.5 – 8.5			
T	°C	27	27	27	35			
ST	mg ST/L	140.52	300.50	460.57	NA			
STV	mg STV/L	92.80	204.71	316.62	NA			
SST	mg SST/L	8.55	20.94	29.91	72	24	36	120
DQO <sub>T</sub>	mg O <sub>2</sub> /L	1.73	7.70	20.65	180	120	72	180
P <sub>T</sub>	mg P/L	2.94	3.87	4.10	18	15	NA	NA
N <sub>T</sub>	mg N-NTK/L	0	1.40	49.67	30	25	NA	NA
N/P	-	0	0.25	12.11	NA	NA	NA	NA

EPTB. Efluente Porcícola Tratado Biológicamente, NA. No aplica

\* Ríos, arroyos, canales y drenes

\*\*Embalses, lagos y lagunas

\*\*\* Suelo: Riego de áreas verdes

\*\*\*\* Suelo: Infiltración y otros riego

Se observa que para el pH las tres concentraciones cumplieron con el límite permisible. Los valores reportados de SST para las concentraciones de 25% y 50% cumplen con los cuatro límites permisibles para descarga en cada uno de los diferentes tipos de grupos de cuerpos receptores, sin embargo la concentración del 75% solo cumple con tres límites, no cumpliendo el límite permisible para descarga en embalses, lagos y lagunas. Para la DQO<sub>T</sub>, se observa que las tres concentraciones cumplen con el límite permisible para cada uno de los cuatro grupos receptores. Para la determinación de P<sub>T</sub> y N<sub>T</sub>, se observa que los límites permisibles

no aplican para suelos, aun así para P<sub>T</sub> las tres concentraciones logran cumplir con el límite permisible de los dos grupos y para N<sub>T</sub> se observa que solo las concentraciones de 25 y 50% logran cumplir con el límite permisible, pero el 75% no logró llegar a los límites permisibles para los dos grupos de cuerpos receptores reportados por el PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017.

**Tabla 3.8** Porcentaje de remoción de los valores promedios de la caracterización de EPC con los valores promedio de EPTB por medio de *Chlorella spp* de las tres concentraciones de experimentación.

Parámetro	Unidad	Valor EPC.	Valor promedio de EPTB			R%		
			25%	50%	75%	25%	50%	75%
SST	mg SST/L	551.33	8.55	20.94	29.91	98.45	96.20	94.57
DQO <sub>T</sub>	mg O <sub>2</sub> /L	1198.13	1.73	7.70	20.65	99.86	99.36	98.28
P <sub>T</sub>	mg P/L	11.91	2.94	3.87	4.10	75.31	67.51	65.58
N <sub>T</sub>	mg N-NTK/L	1002.40	0	1.40	49.67	100.0	99.86	95.04

EPC. Efluente Porcícola Crudo. EPTB. Efluente Porcícola Tratado Biológicamente. R% Porcentaje de remoción.

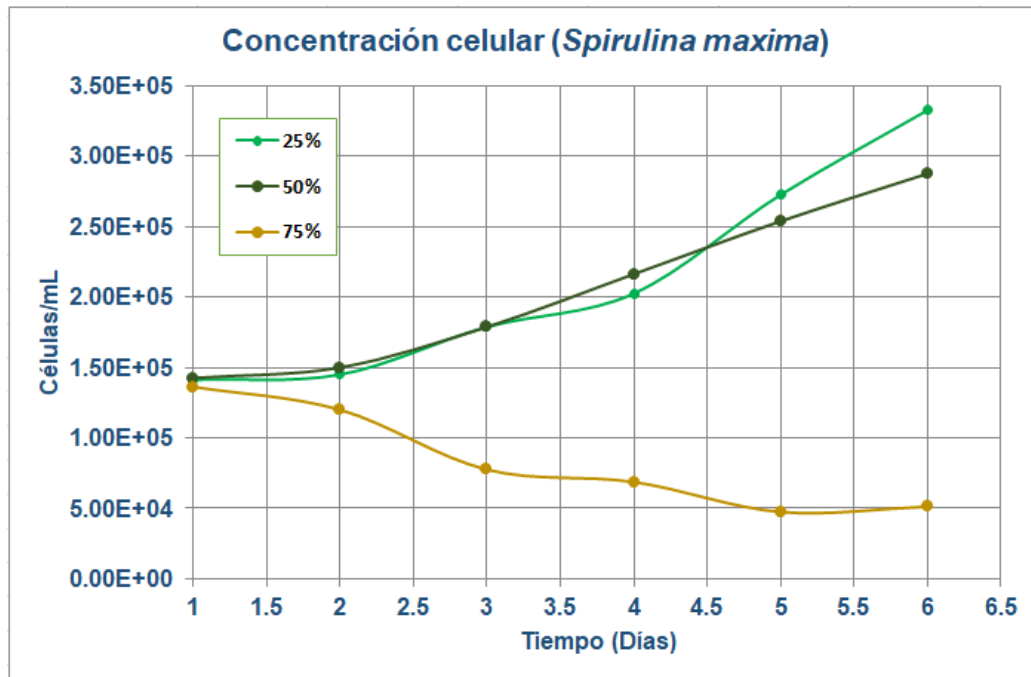
En la Tabla 3.8 se presentan las determinaciones que son considerados como indicadores de contaminación de acuerdo al PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017, con el porcentaje de remoción que va de los valores iniciales del efluente porcícola crudo a los valores promedios finales de efluente porcícola tratado biológicamente por medio de *Chlorella spp*. Se observa que la mayor remoción en cada una de las determinaciones se las lleva la concentración del 25%, seguido del 50% y por último el 75% el cual presentó un medio tóxico.

### 3.5 Etapa 5 Evaluación del desarrollo poblacional de las especies *Spirulina maxima* y *Chlorella spp*

#### 3.5.1 Crecimiento celular durante el desarrollo de *Spirulina maxima*

En la Figura 3.12 se presenta el incremento de la densidad celular de la microalga *Spirulina maxima* durante los seis días de operación, de acuerdo a la Figura 1.4, el experimento de la concentración del 25% logró la mayor concentración celular de los

experimentos con una concentración de 332,500 células de *Spirulina maxima*/mL. La concentración del 75% presento durante el tiempo de experimentación la disminución en su concentración celular esto debido a la muerte celular llegando a una concentración celular de 51,250 células de *Spirulina maxima*/L.



**Figura 3.12** Concentración celular durante el desarrollo de *Spirulina maxima*

De acuerdo a estudios realizados por Ayala y Vargas (1987) citados en Mezzomo et al. (2010) sobre el uso de aguas residuales porcinas para el cultivo de *Spirulina*, concluyeron que el agua residual porcina era tóxica para las microalgas cuando se usaba sin dilución, porque la coloración de las aguas residuales causa problemas de penetración de luz solar en el medio de cultivo, y Canizares-Villanueva et al. (1995) citados en Mezzomo et al. (2010) Informaron que la dilución de aguas residuales es necesaria para reducir el efecto tóxico del amoníaco que inhibe el crecimiento de las microalgas.

Con los valores obtenidos de densidad celular, se pudo determinar la tasa de crecimiento celular ( $\mu$ ), el tiempo de duplicación ( $t_d$ ) y el número de generaciones ( $ng$ ). Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 3.9:

**Tabla 3.9** Parámetros cinéticos de crecimiento de *Spirulina maxima* para cada concentración.

Parámetros	25%	50%	75%
$\mu$ (día <sup>-1</sup> )	0.21	0.17	NA
$t_d$ (día)	3.33	4.20	NA
ng	1.20	0.95	NA

NA. No aplica

Los parámetros cinéticos para la concentración del 75% no aplican debido a que no hubo crecimiento celular por la toxicidad de la concentración. En los cinco días de fase exponencial, la que presentó mejores resultados fue la concentración del 25%, obtuvo la mejor tasa específica de crecimiento de 0.21 día<sup>-1</sup>, tan solo una célula de *Spirulina maxima* tarda en duplicarse 3.33 días, y en esta fase exponencial se presentó 1.20 generaciones. Estos valores son bajos (no tan lejanos) comparados con los de Domínguez (2014) quien evaluó el desempeño de la *Spirulina maxima* en el proceso de bioconversión de CO<sub>2</sub> contenido en biogás, a O<sub>2</sub> y biomasa, que obtuvo mejores valores para crecimiento celular ( $\mu$ ) de 0.25 día<sup>-1</sup>, tiempo de duplicación ( $t_d$ ) de 2.75 días y 2.18 generaciones.

### 3.5.2 Crecimiento celular durante el desarrollo de *Chlorella spp.*

En la Figura 3.13 se presenta el crecimiento celular de *Chlorella spp* durante el desarrollo experimental. Se observa que el comportamiento en el crecimiento celular de la microalga *Chlorella spp* en esta experimentación es diferente al de la *Spirulina maxima*, ya que las tres concentraciones presentan solo fase de crecimiento exponencial en los seis días de operación, presentando el experimento de la concentración del 25% la mayor concentración celular de 10,725,000 células de *Chlorella spp*/mL.

En la Tabla 3.10 se presenta la tasa de crecimiento celular ( $\mu$ ), el tiempo de duplicación ( $t_d$ ) y el número de generaciones (ng) de las tres concentraciones distintas:

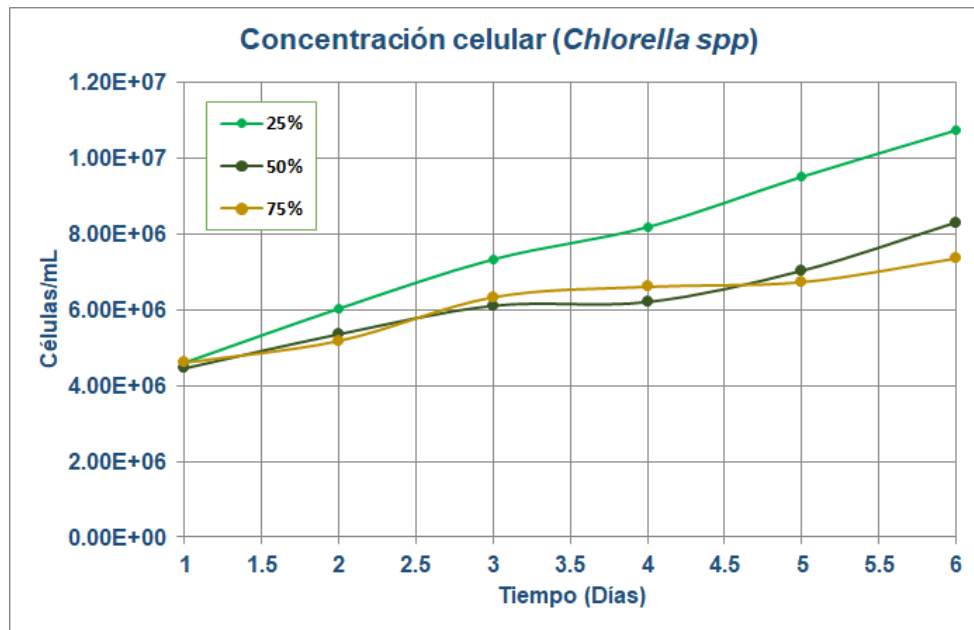


Figura 3.13 Concentración celular durante el desarrollo de *Chlorella spp.*

Tabla 3.10 Parámetros cinéticos de crecimiento de *Chlorella spp.* para cada concentración.

Parámetros	25%	50%	75%
$\mu$ (día <sup>-1</sup> )	0.16	0.11	0.09
$t_d$ (día)	4.25	6.16	7.65
$N_g$	1.18	0.81	0.65

El experimento que presentó mejores resultados fue el de la concentración del 25%, obtuvo una tasa específica de crecimiento de 0.16 día<sup>-1</sup>, con un tiempo de duplicación de 4.25 días, y en su fase exponencial presentó 1.18 generaciones. Estos valores son bajos pero no tan distantes, comparados a los reportados por González (2015) con una tasa de crecimiento celular de 0.3486 día<sup>-1</sup> y con 1.98 generaciones, quien trabajo en encontrar las condiciones ambientales que permitan obtener el mayor contenido de pigmentos en la microalga *Chlorella spp.*

### 3.5.3 Producción de biomasa de *Spirulina maxima*

En la Figura 3.14 se presenta el promedio de la biomasa total producida en las corridas de las tres concentraciones al sexto y último día de operación, la mayor

biomasa promedio se reporta para el fotobiorreactor de la concentración de 25% con un valor de 6302.5 mg de biomasa/L. Se muestra la barra de error de desviación estándar para cada concentración, en la que podemos observar que la del valor más alto corresponde a la concentración del 75% con un valor de 1523.81, ocasionado por los distintos valores que se obtuvieron por la muerte celular. La productividad para cada concentración se presenta en la Tabla 3.11. El fotobiorreactor de la concentración del 25% fue el que mayor productividad presentó.

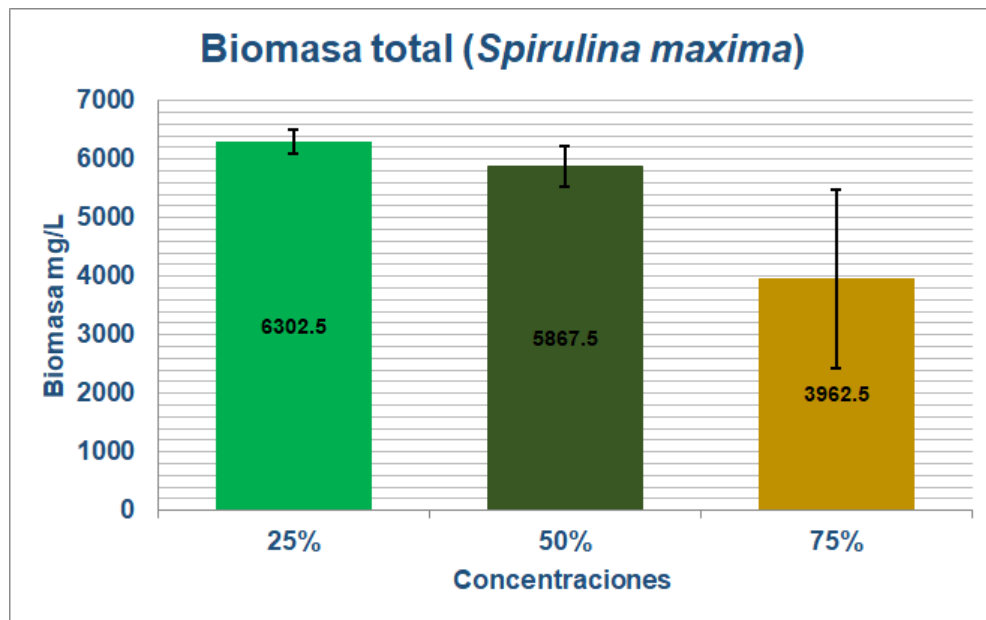


Figura 3.14 Biomasa *Spirulina maxima*

Tabla 3.11 Productividad obtenida por *Spirulina maxima*

	25%	50%	75%
<b>Productividad mg · L<sup>-1</sup> · dia<sup>-1</sup></b>	725.02	591.85	-

Feng and Wu (2005) citado en Huarachi et al. (2013), presentaron una productividad de 0.17 g/L/día en 14 días de un cultivo de *Spirulina platensis* en fotobiorreactor de columna de burbujas con un volumen útil total de 1200 mL utilizando como medio de cultivo orina humana. Converti et al. (2006) citado en Huarachi et al. (2013)

produjeron *Spirulina platensis* en sistema combinado de reactor tubular con una productividad de 0.71 g/L/día al cabo de 15 días de cultivo. Podemos observar que los valores presentados en la Tabla 3.11 se encuentran cerca de los reportados por otros autores.

### 3.5.4 Producción de biomasa de *Chlorella spp*

En la Figura 3.15 se muestra el promedio de la biomasa total producida en las corridas de las tres concentraciones al sexto y último día de operación. La mayor biomasa promedio se reporta para el fotobiorreactor de la concentración de 25% con un valor de 1680 mg de biomasa/L.

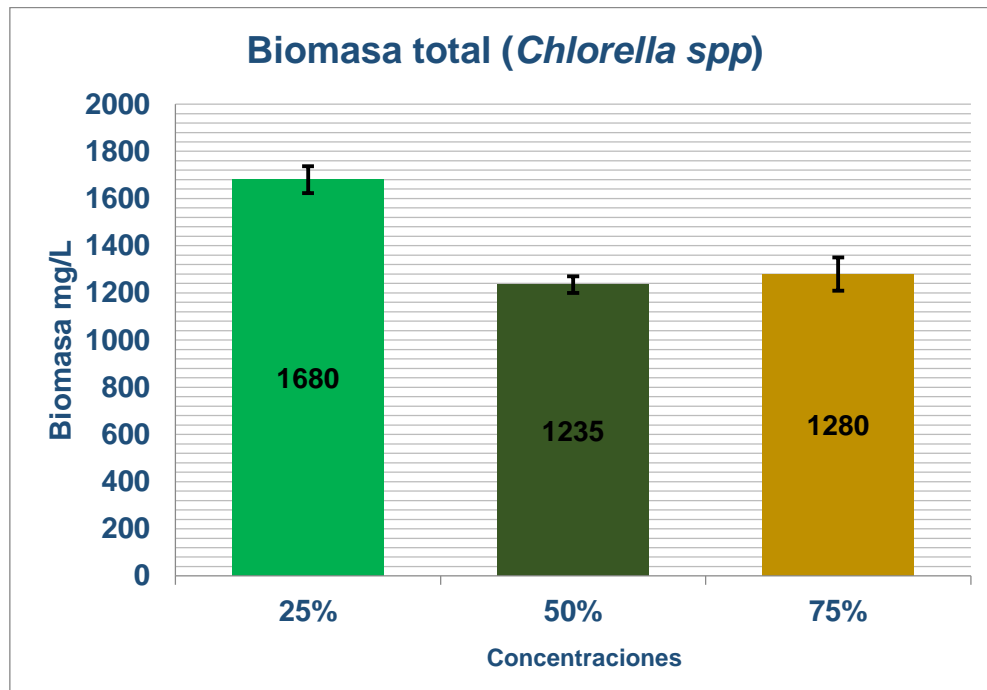


Figura 3.15 Biomasa *Chlorella spp*.

En la Tabla 3.12 se presenta la productividad obtenida por la microalga *Chlorella spp* para cada concentración, el cual el fotobiorreactor de la concentración del 25% fue el que mayor productividad presentó. Estos valores obtenidos se encuentran dentro

del intervalo de 25-250 mg·L<sup>-1</sup>·día<sup>-1</sup> reportado como adecuado para la microalga, que presento González (2015).

Algunos autores como Ruiz et al. (2011) evaluaron la viabilidad de la eliminación de nutrientes por parte de la microalga *Chlorella vulgaris*, utilizando aguas residuales urbanas como medio de cultivo, es decir, el efluente sometido a tratamiento biológico secundario en una planta de tratamiento de aguas residuales, en el cual se obtuvo una productividad máxima de 0.95 g SS·L<sup>-1</sup>·día<sup>-1</sup>. Woertz et al. (2009) citado en Byung-Gon et al. (2014) removieron nutrientes empleando la microalga *Chlorella spp* en aguas residuales municipales con tratamiento secundario, obteniendo una productividad de biomasa de 74.44 mg·L<sup>-1</sup>·día<sup>-1</sup>.

**Tabla 3.12** Productividad obtenida por *Chlorella spp*

	25%	50%	75%
<b>Productividad mg ·L<sup>-1</sup> ·día<sup>-1</sup></b>	191.89	114.57	95.78

### 3.6 Determinación de parámetros cinéticos en la degradación de nutrientes

#### 3.6.1 Parámetros cinéticos en la degradación de nitrógeno por medio de *Spirulina maxima*

En la Tabla 3.13 se presentan los parámetros cinéticos  $K_s$  y  $\mu_{m\acute{a}x}$  en la degradación de nitrógeno durante el desarrollo de *Spirulina maxima*.

El experimento de la concentración del 25% indica que es la ideal para la remoción de nitrógeno por medio de *Spirulina maxima*, ya que obtuvo una  $K_s$  baja, lo que sugiere que es la concentración que se encuentra más cerca de su tasa de crecimiento y un rendimiento de 83.91 mg células · mg nitrógeno<sup>-1</sup>. El sustrato limitante para el experimento de la concentración del 25% en *Spirulina maxima* fue el N.



**Tabla 3.13** Parámetros cinéticos de degradación de nitrógeno en las pruebas experimentales con *Spirulina maxima*

Parámetro	25%	50%	75%
$\mu_{\text{máx}}$ (día <sup>-1</sup> )	0.10	0.10	NA
$K_s$ (mg/L)	4.66	7.24	NA
Y (mg células · mg nitrógeno <sup>-1</sup> )	83.91	44.38	NA
$R^2$	0.98	0.96	NA

NA. No Aplica

### 3.6.2 Parámetros cinéticos en la degradación de nitrógeno por medio de *Chlorella spp*

En la Tabla 3.14 se puede observar que la concentración del 25% es ideal para la remoción de nitrógeno por medio de *Chlorella spp*, ya que obtuvo la  $K_s$  más baja lo que indica que esta se encuentra cerca de su tasa de crecimiento y obtuvo un rendimiento de 17.13 mg células · mg nitrógeno<sup>-1</sup>

**Tabla 3.14** Parámetros cinéticos de degradación de nitrógeno en las pruebas experimentales con *Chlorella spp*

Parámetro	25%	50%	75%
$\mu_{\text{máx}}$ (día <sup>-1</sup> )	0.19	0.11	0.21
$K_s$ (mg/L)	0.72	1.19	67.88
Y (mg células · mg nitrógeno <sup>-1</sup> )	17.13	5.68	4.71
$R^2$	0.96	0.99	0.99

### 3.6.3 Parámetros cinéticos en la degradación de fósforo por medio de *Spirulina maxima*

En la Tabla 3.15 se presentan los parámetros cinéticos  $K_s$  y  $\mu_{\text{máx}}$  en la degradación de fósforo durante el desarrollo de *Spirulina maxima*:

**Tabla 3.15** Parámetros cinéticos de degradación de fósforo en las pruebas experimentales con *Spirulina maxima*

Parámetro	25%	50%	75%
$\mu_{\text{máx}}$ (día <sup>-1</sup> )	0.05	0.04	NA
$K_s$ (mg/L)	3.04	3.37	NA
Y (mg células · mg fósforo <sup>-1</sup> )	1224.70	2225.01	NA
$R^2$	0.96	0.96	NA

NA. No Aplica

A pesar de que los valores de  $\mu_{\text{máx}}$  y  $K_s$  se encuentran cercanos, la concentración del 25% es la ideal para la remoción de fósforo por medio de *Spirulina maxima*, ya que obtuvo una  $K_s$  baja y un rendimiento de 1224.70 mg células · mg nitrógeno<sup>-1</sup>.

### 3.6.4 Parámetros cinéticos en la degradación de fósforo por medio de *Chlorella spp*

En la Tabla 3.16 se puede observar que la concentración del 25% y 50% presentan valores similares, sin embargo la concentración del 50% nos indica que es la ideal para la remoción de fósforo por medio de *Chlorella spp*, ya que obtuvo la  $K_s$  más baja de las tres concentraciones lo que indica que esta se encuentra cerca de su tasa de crecimiento.

**Tabla 3.16** Parámetros cinéticos de degradación de fósforo en las pruebas experimentales con *Chlorella spp*

Parámetro	25%	50%	75%
$\mu_{\text{máx}}$ (día <sup>-1</sup> )	0.26	0.08	0.06
$K_s$ (mg/L)	1.89	1.55	8.83
Y (mg células · mg fósforo <sup>-1</sup> )	252.15	190.32	176.07
$R^2$	0.98	0.99	0.99

Sin embargo para la degradación de nutrientes por medio de la microalga *Chlorella spp.*, se tomara como el mejor experimento la de la concentración del 25% en el que el sustrato limitante es el fósforo.

Los valores obtenidos no están tan distantes comparándolos con Jinsoo et al. (2013) Que emplearon *Chlorella vulgaris* para la eliminación de N y F del efluente secundario de aguas residuales recolectado de una planta de tratamiento de aguas residuales municipal, usaron dos densidades de células de algas iniciales, en la densidad baja se reportó que el nitrógeno fue el sustrato limitante con una  $\mu_{m\acute{a}x}$  de  $0.01245\text{ h}^{-1}$  y una  $K_S$  de  $0.0696\text{ mg/L}$ . Para la densidad alta, el fósforo se convirtió claramente en un sustrato limitante para el crecimiento con una  $\mu_{m\acute{a}x}$  de  $32.85\text{ h}^{-1}$  y una  $K_S$  de  $0.99\text{ mg/L}$

### **3.7 Análisis estadístico de los resultados obtenidos**

En este apartado se presentan los análisis de varianza de los resultados obtenidos en la degradación de nitrógeno, degradación de fósforo y crecimiento celular de las tres concentraciones para ambas especies, el cual nos sirve para poder identificar si existe o no diferencia estadística significativa entre las concentraciones y se comparó con el método de Tukey-Kramer, estos análisis se llevaron a cabo mediante el software NCSS 2007.

#### **3.7.1 Degradación de nitrógeno total por medio de *Spirulina maxima***

Se utilizó como variable de respuesta la degradación o remoción de  $N_T$  empleando *Spirulina maxima*, se tuvo como resultado que existe diferencia estadística significativa entre las tres concentraciones de experimentación ( $F_C > F_\alpha$ :  $6.17 > 3.68$ , el valor de F calculada se muestra en la Figura 3.16). De acuerdo a las medias presentadas en la Figura 3.16 y 3.17, la media más baja la presentó el experimento de la concentración 25%, lo que indica que es el experimento que obtuvo la mejor remoción de las pruebas experimentales. En la comparación de grupos presentado en la Figura 3.17 por el método de Tukey-Kramer, nos muestra que el experimento

de la concentración del 75% es diferente de los otros dos, lo que significa que es el que presenta la diferencia estadística significativa.

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0.05)
A: Concentración	2	12287.24	6143.619	6.17	0.011063*	0.816953
S	15	14927.45	995.1633			
Total (Adjusted)	17	27214.69				
Total	18					

\* Term significant at alpha = 0.05

Means and Effects Section					
Term		Count	Mean	Standard Error	Effect
All		18	47.76944		47.76944
A: Concentración					
0.25		6	23.125	12.87869	-24.64444
0.5		6	36.25	12.87869	-11.51944
0.75		6	83.93333	12.87869	36.16389

**Figura 3.16** ANOVA de cinéticas al 25%, 50% y 75% de agua residual porcícola/ *Spirulina maxima*. (Degradación de  $N_T$ )

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test			
Response: Degradación_N			
Term A: Concentración			
Alpha=0.050 Error Term=S DF=15 MSE=995.1633 Critical Value=3.6734			
Group	Count	Mean	Different From Groups
0.25	6	23.125	0.75
0.5	6	36.25	0.75
0.75	6	83.93333	0.25, 0.5

**Figura 3.17** Método de Tukey-Kramer de cinéticas al 25%, 50% y 75% de agua residual porcícola/ *Spirulina maxima*. (Degradación de N)

### 3.7.2 Degradación de nitrógeno por medio de *Chlorella spp*

Se tuvo como resultado que existe diferencia estadística significativa entre las tres concentraciones de experimentación ( $F_C > F_\alpha$ :  $5.12 > 3.68$ , el valor de F calculada se

muestra en la Figura 3.18). En la Figura 3.18 y 3.19, se presentan las medias de los experimentos, de las cuales la media más baja corresponde al experimento con la concentración del 25%, lo que indica que es el que tuvo mejor remoción de las pruebas. En la comparación de grupos presentado en la Figura 3.19 por el método de Tukey-Kramer, nos muestra que entre los experimentos de la concentración del 25% y 75% existe diferencia estadística significativa.

Analysis of Variance Table						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Concentración	2	13204.34	6602.169	5.12	0.020171*	0.736558
S	15	19338.19	1289.213			
Total (Adjusted)	17	32542.53				
Total	18					

\* Term significant at alpha = 0.05

Means and Effects Section					
Term	Count	Mean	Standard Error	Effect	
All	18	57.45889		57.45889	
A: Concentración					
0.25	6	28.54	14.6584	-28.91889	
0.5	6	50.16667	14.6584	-7.292222	
0.75	6	93.67	14.6584	36.21111	

Figura 3.18 ANOVA de cinéticas al 25%, 50% y 75% de agua residual porcícola/ *Chlorella spp.* (Degradación de N)

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test			
Response: Degradación_N			
Term A: Concentración			
Alpha=0.050 Error Term=S DF=15 MSE=1289.213 Critical Value=3.6734			
Group	Count	Mean	Different From Groups
0.25	6	28.54	0.75
0.5	6	50.16667	
0.75	6	93.67	0.25

Figura 3.19 Método de Tukey-Kramer de cinéticas al 25%, 50% y 75% de agua residual porcícola/ *Chlorella spp.* (Degradación de N)

### 3.7.3 Degradación de fósforo por medio de *Spirulina maxima*

Se utilizó como variable de respuesta la degradación o remoción de  $P_T$  empleando *Spirulina maxima*, como resultado se obtuvo que entre las tres concentraciones de experimentación no existe diferencia estadística significativa ( $F_C > F_{\alpha}$ :  $3.61 > 3.68$ , el valor de F calculada se muestra en la Figura 3.20).

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0.05)
A: Concentración	2	4.264053	2.132026	3.61	0.052441	0.576035
S	15	8.855205	0.5903469			
Total (Adjusted)	17	13.11926				
Total	18					

\* Term significant at alpha = 0.05

Means and Effects Section					
Term		Count	Mean	Standard Error	Effect
All		18	5.306944		5.306944
A: Concentración					
0.25		6	4.886667	0.3136736	-0.4202778
0.5		6	5.045	0.3136736	-0.2619444
0.75		6	5.989167	0.3136736	0.6822222

**Figura 3.20** ANOVA de cinéticas al 25%, 50% y 75% de agua residual porcícola/ *Spirulina maxima*. (Degradación de P)

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test			
Response: Degradación_P			
Term A: Concentración			
Alpha=0.050 Error Term=S DF=15 MSE=0.5903469 Critical Value=3.6734			
Group	Count	Mean	Different From Groups
0.25	6	4.886667	
0.5	6	5.045	
0.75	6	5.989167	

**Figura 3.21** Método de Tukery-Kramer de cinéticas al 25%, 50% y 75% de agua residual porcícola/ *Spirulina maxima*. (Degradación de P)

En la Figura 3.20 y 3.21, se presentan las medias de los experimentos, de las cuales la media más baja corresponde al experimento con la concentración del 25%, lo que indica que es el que tuvo la mejor remoción de las pruebas. El método de Tukey-Kramer (Figura 3.21) nos muestra que entre los experimentos no hay diferencia estadística significativa.

### 3.7.4 Degradación de fósforo por medio de *Chlorella spp.*

Se tuvo como resultado que no existe diferencia estadística significativa entre las tres concentraciones de experimentación ( $F_C > F_\alpha$ :  $0.34 > 3.68$ , el valor de F calculada se muestra en la Figura 3.22). En la Figura 3.22 y 3.23, se presentan las medias de los experimentos, de las cuales la media más baja corresponde al experimento con la concentración del 25%, lo que indica que es el que tuvo mejor remoción de las pruebas. En la comparación de grupos presentado en la Figura 3.23 por el método de Tukey-Kramer, nos muestra que entre los experimentos no hay diferencia estadística significativa.

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0.05)
A: Concentración	2	0.9633361	0.4816681	0.34	0.714187	0.095159
S	15	20.98594	1.399063			
Total (Adjusted)	17	21.94928				
Total	18					
* Term significant at alpha = 0.05						
Means and Effects Section						
Term		Count	Mean	Standard	Effect	
All		18	5.578889			
A: Concentración						
0.25		6	5.255	0.4828842	-0.3238889	
0.5		6	5.700833	0.4828842	0.1219444	
0.75		6	5.780833	0.4828842	0.2019444	

**Figura 3.22** ANOVA de cinéticas al 25%, 50% y 75% de agua residual porcícola/ *Chlorella spp.* (Degradación de P)

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test			
Response: Degradación_P			
Term A: Concentración			
Alpha=0.050 Error Term=S DF=15 MSE=1.399063 Critical Value=3.6734			
Group	Count	Mean	Different From Groups
0.25	6	5.255	
0.5	6	5.700833	
0.75	6	5.780833	

**Figura 3.23** Método de Tukey-Kramer de cinéticas al 25%, 50% y 75% de agua residual porcícola/ *Chlorella spp.* (Degradación de P)

### 3.7.5 Crecimiento celular de *Spirulina maxima*

Se utilizó como variable de respuesta el crecimiento celular de la especie *Spirulina maxima*, como resultado se obtuvo que entre las tres concentraciones de experimentación existe diferencia estadística significativa ( $FC > F_{\alpha}$ :  $8.94 > 3.68$ , el valor de F calculada se muestra en la Figura 3.24).

Analysis of Variance Table						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Concentración	2	6.255538E+103	1.27769E+10	8.94	0.002783*	0.936146
S	15	5.250469E+103	5.00313E+09			
Total (Adjusted)	17	1.150601E+11				
Total	18					
* Term significant at alpha = 0.05						
Means and Effects Section						
Term	Count	Mean	Standard Error	Effect		
All	18	166805.6		166805.6		
A: Concentración						
0.25	6	212083.3	24153.37	45277.78		
0.5	6	204791.7	24153.37	37986.11		
0.75	6	83541.66	24153.37	-83263.89		

**Figura 3.24** ANOVA de cinéticas al 25%, 50% y 75% de agua residual porcícola/ *Spirulina maxima*. (Crecimiento celular)



En la Figura 3.24 y 3.25, se presentan las medias de los experimentos, de las cuales la media más alta corresponde al experimento con la concentración del 25%, lo que indica que es el que tuvo el mayor crecimiento celular. El método de Tukey-Kramer (Figura 3.25) nos muestra que el experimento de la concentración del 75% es diferente de los otros dos, lo que significa que es el que presenta la diferencia estadística significativa.

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test			
Response: Crecimiento_celular			
Term A: Concentración			
Alpha=0.050 Error Term=S DF=15 MSE=3.500313E+09 Critical Value=3.6734			
Group	Count	Mean	Different From Groups
0.75	6	83541.66	0.5, 0.25
0.5	6	204791.7	0.75
0.25	6	212083.3	0.75

**Figura 3.25** Método de Tukey-Kramer de cinéticas al 25%, 50% y 75% de agua residual porcícola/ *Spirulina maxima*. (Crecimiento celular)

### 3.7.6 Crecimiento celular de *Chlorella spp*

Se tuvo como resultado que no existe diferencia estadística significativa entre las tres concentraciones de experimentación ( $F_C < F_\alpha$ :  $1.82 < 3.68$ , el valor de F calculada se muestra en la Figura 3.26). En la Figura 3.26 y 3.27, se presentan las medias de los experimentos, de las cuales la media más alta corresponde al experimento con la concentración del 25%, lo que indica que es el que tuvo el mayor crecimiento celular. En la comparación de grupos presentado en la Figura 3.27 por el método de Tukey-Kramer, nos muestra que entre los experimentos no hay diferencia estadística significativa.

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0.05)
A: Concentración	2	9.542153E+12	4.771076E+12	1.82	0.196608	0.319236
S	15	3.940021E+13	2.626681E+12			
Total (Adjusted)	17	4.894236E+13				
Total	18					
* Term significant at alpha = 0.05						
Means and Effects Section						
Term		Count	Mean	Standard Error		Effect
All		18	6697222			6697222
A: Concentración						
0.25		6	7725000	661649.5		1027778
0.5		6	6237500	661649.5		-459722.2
0.75		6	6129167	661649.5		-568055.6

**Figura 3.26** ANOVA de cinéticas al 25%, 50% y 75% de agua residual porcícola/ *Chlorella* spp. (Crecimiento celular)

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test			
Response: Crecimiento_celular			
Term A: Concentración			
Alpha=0.050 Error Term=S DF=15 MSE=2.626681E+12 Critical Value=3.6734			
Group	Count	Mean	Different From Groups
0.75	6	6129167	
0.5	6	6237500	
0.25	6	7725000	

**Figura 3.27** Método de Tukey- Kramer de cinéticas al 25%, 50% y 75% de agua residual porcícola/ *Chlorella* spp. (Crecimiento celular)

## **CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación, se concluye lo siguiente:

El uso de cianobacterias o microalgas para la eliminación parcial o total de nutrientes presentes en efluentes porcícolas como “único tratamiento biológico” para el tratamiento de aguas residuales, no es factible. Se requiere necesariamente de acondicionar previamente el efluente con un tratamiento físico. Los procesos físicos (tamizado y centrifugación) usados en el tratamiento físico fueron seleccionados por su disponibilidad y rapidez en la disminución de contaminación. Estos procesos removieron el 71.10% de SST, 22.04% DQO<sub>T</sub>, 28.46% de P<sub>T</sub> y 6.14% de N<sub>T</sub>.

El agua residual porcícola resulta ser un medio toxico para las microalgas, sobre todo para la Spirulina, debido a la cantidad de nitrógeno (amoniaco) presente en la orina, la cual se encuentra en mayor composición en el efluente porcícola. Por tal motivo es necesaria la dilución del efluente porcícola, para reducir el efecto tóxico. En pruebas experimentales previas se encontró que para evitar muerte celular la mejor dilución corresponde a un valor  $\geq 85\%$  v/v: agua destilada/efluente porcícola. El valor para N<sub>T</sub> del efluente acondicionado + diluido debe ser de  $\leq 246.4$  mg de NTK/L

La dilución del efluente acondicionado disminuyó los valores de este mismo, removiendo un 76.05% los SST, 85.06% la DQO<sub>T</sub>, 80.22% el P<sub>T</sub> y 75.41% el N<sub>T</sub>. Se debe considerar que entre más se diluya el efluente, mas bajan los valores de SST, DQOT, N<sub>T</sub> y P<sub>T</sub> (no desaparecen), y más grande se hace el volumen del efluente a tratar

En las concentraciones propuestas para la propagación de las especies durante la etapa experimental, se recurre a una segunda dilución. A pesar de haber encontrado la mejor dilución, no quiere decir que esta nos dé el mejor rendimiento y la mayor productividad, se descubrió que con una segunda dilución propuesta y más si esta

era mayor (25%) se obtiene buenos resultados, estableciendo lo mismo que Caballero (2013) que el crecimiento microalgal se basa en la ley del mínimo, es decir, el crecimiento será limitado por aquella sustancia que se presente en menor cantidad a la mínima requerida.

Se usó el mismo efluente porcícola acondicionado + diluido en las pruebas experimentales de *Spirulina maxima* y *Chlorella spp*, de acuerdo a los primeros resultados de crecimiento celular, se determinó que las concentraciones de N de las pruebas experimentales no afectan el crecimiento y desarrollo de la microalga *Chlorella spp*, a diferencia de la *Spirulina maxima* que resultó vulnerable a una concentración de 134.40 mg de NTK/L

Se logró determinar que de las concentraciones propuestas, la ideal para *Spirulina maxima* fue la del 25% v/v: efluente porcícola acondicionado + diluido/agua destilada, la cual al último día de la parte experimental logro una remoción del 100% para NT, una remoción del 50.16% para P<sub>T</sub>, un pH constante pero fuera de los límites permisibles de acuerdo a la NOM, y una DQO<sub>T</sub> con valor de 36.22 mg O<sub>2</sub>/L, estos valores cumplieron con los límites permisibles del proyecto de modificación de la Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017.

La concentración propuesta ideal para la microalga *Chlorella spp* fue la del 25% v/v: efluente porcícola acondicionado + diluido/agua destilada, la cual al último día de la parte experimental logró una remoción del 100% para N<sub>T</sub>, una remoción del 56.48% para P<sub>T</sub>, un pH constante y una remoción de 88.74% para DQO<sub>T</sub>, estos valores cumplieron con los límites permisibles del proyecto de modificación de la Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017.

De las tres pruebas experimentales con *Spirulina maxima*, la que mayor crecimiento celular presentó al final de las pruebas, fue el experimento de la concentración del 25%, con una concentración celular de 332,500 células de *Spirulina maxima*/mL, con una tasa específica de crecimiento de 0.21 día<sup>-1</sup>, tan solo una célula de *Spirulina maxima* tardo en duplicarse 3.33 días, y en esta fase exponencial se presentó 1.20

generaciones. Igual presento al final de la experimentación la mayor biomasa producida, produciendo 6302.50 mg de biomasa/L, con una productividad de 725.02  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ , lo que la hace la concentración ideal si se desea obtener una alta concentración celular y biomasa.

De las pruebas experimentales con *Chlorella spp*, la que mayor crecimiento celular presentó al final de las pruebas, fue el experimento de la concentración del 25%, con una concentración celular de 10,725,000 células de *Chlorella spp*/mL, con una tasa específica de crecimiento de  $0.16 \text{ dia}^{-1}$ , con un tiempo de duplicación de 4.25 días, y en su fase exponencial presentó 1.18 generaciones. Igual presentó la mayor biomasa producida de la experimentación, produciendo 1680 mg de biomasa/L, con una productividad de  $191.89 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ .

De acuerdo a los parámetros cinéticos de degradación de nutrientes empleando la cianobacteria *Spirulina maxima*, el experimento de la concentración del 25% es la ideal para la remoción de  $\text{N}_T$  y  $\text{P}_T$ , ya que obtuvo las  $K_S$  lo más cercanas a las  $\mu_{\text{máx}}$ , lo que indica que se encuentran más cerca de sus tasas de crecimiento, con una  $\mu_{\text{máx}}$  de  $0.10 \text{ día}^{-1}$ ,  $K_S$  de 4.66 mg/L y un rendimiento de  $83.91 \text{ mg células} \cdot \text{mg nitrógeno}^{-1}$ . Para la remoción de P se obtuvo una  $\mu_{\text{máx}}$  de  $0.05 \text{ día}^{-1}$ ,  $K_S$  de 3.04 mg/L y un rendimiento de  $1224.70 \text{ mg células} \cdot \text{mg nitrógeno}^{-1}$ . Con los resultados obtenidos se determinó que el sustrato limitante para este experimento fue el  $\text{N}_T$ .

De acuerdo a los parámetros cinéticos de degradación de nutrientes empleando la microalga *Chlorella spp*, el experimento de la concentración del 25% es la ideal para la remoción de  $\text{N}_T$  y  $\text{P}_T$ , ya que obtuvo las  $K_S$  lo más cercanas a las  $\mu_{\text{máx}}$ , lo que indica que se encuentran más cerca de sus tasas de crecimiento, con una  $\mu_{\text{máx}}$  de  $0.19 \text{ día}^{-1}$ ,  $K_S$  de 0.72 mg/L y un rendimiento de  $17.13 \text{ mg células} \cdot \text{mg nitrógeno}^{-1}$ . Para la remoción de P se obtuvo una  $\mu_{\text{máx}}$  de  $0.26 \text{ día}^{-1}$ ,  $K_S$  de 1.89 mg/L y un rendimiento de  $252.15 \text{ mg células} \cdot \text{mg fósforo}^{-1}$ . Con los resultados obtenidos se determinó que el sustrato limitante para este experimento fue el  $\text{P}_T$ .

## RECOMENDACIONES



## RECOMENDACIONES

- Realizar una caracterización microbiológica detallada del efluente porcícola.
- Realizar un pretratamiento térmico para la eliminación de microorganismos patógenos.
- Cambiar a otro método de determinación de  $P_T$ , que sea preciso, más rápido, que no genere residuos y que no gaste mucha agua.
- Realizar la remoción de nitrógeno amoniacal y orgánico.
- Realizar una caracterización fisicoquímica y microbiológica detallada de la biomasa obtenida a partir de estos residuos y así poder determinar el uso (uso directo o indirecto hacia los humanos).
- Estudiar diferentes geometrías de fotobioreactores para eliminar zonas muertas del residuo y por consiguiente obtener una mejor homogenización de los nutrientes con las microalgas.
- Evaluar cultivos en modo semi-continuo para estudiar la rentabilidad de la generación de biomasa a largo plazo.
- Evaluar métodos de cosecha de la microalga como pueden ser la electrofloculación, centrifugación, filtración, floculación, etc.



## **ANEXO A**



## ANEXO A

Formulación para la preparación del medio de cultivo UTEX.

Con la finalidad de evitar la formación de precipitados durante la esterilización en autoclave se prepararon dos soluciones por separado cada una de 500 mL. y después de esterilizarlas por autoclave se mezclaron y almacenaron temperatura de 5°C.

### Solución 1 para el medio de cultivo UTEX.

Sustancia	Cantidad
NaHCO <sub>3</sub>	13.61 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	4.03 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
Agua destilada	500 mL

Se agregaron a 450 mL de agua destilada los componentes en el orden listado en agitación continua, posteriormente se aforó con agua destilada a 500 mL y se esterilizó por autoclave.

### Solución 2 para el medio de cultivo UTEX.

Sustancia	Cantidad
NaNO <sub>3</sub>	2.5 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g
NaCl	1 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.2 g
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.04 g
Solución de metales P-IV	6 mL
Solución de micronutrientes Chu	1 mL
Vitamina B12	1 mL

Se agregaron a 450 mL de agua destilada cada uno de los componentes en el orden listado, exceptuando las vitaminas. Se aforó en un volumen de 500 mL con agua destilada y se esterilizó por autoclave, posteriormente se agregó la vitamina B12.

**Solución micronutrientes Chu** incluida en solución 2 para el medio de cultivo Utex.

Sustancia	Cantidad
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.02 g/L
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.044 g/L
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.02 g/L
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	0.012 g/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.012 g/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.62 g/L
Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O	0.05 g/L

A 900 mL de agua destilada se agregó cada uno de los componentes en el orden listado y en agitación continua, se aforó a 1000 mL con agua destilada y se almacenó en refrigeración.

**Solución de metales P-IV** para el medio de cultivo UTEX.

Sustancia	Cantidad
Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O	0.75 g/L
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.097 g/L
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	0.041 g/L
ZnCl <sub>2</sub>	0.005 g/L
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.002 g/L
Na <sub>2</sub> MoCO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.004 g/L

A 950 mL de agua destilada se agregaron los componentes en el orden listado en agitación continua, esperando que la Na<sub>2</sub>EDTA 2H<sub>2</sub>O, se disolviera en su totalidad antes de agregar el resto de los componentes, se aforó a 1000 mL con agua destilada y se almacenó en refrigeración.

## **ANEXO B**



## ANEXO B

### MEDIO 3N-BBM+V (CCAP)

- A aproximadamente 800 ml de agua destilada, adicionar los siguientes componentes en el orden especificado, agitando continuamente.
- Ajustar el volumen a 1 litro.
- Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos.
- pH final:

Componente/Sol. Stock	Cantidad para 1 Lt de solución stock	Cantidad por litro de medio de cultivo	Concentración final en el medio
<b>NaNO<sub>3</sub></b>	25 gr.	30 ml	8.82 mM
<b>CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O</b>	2.5 gr.	10 ml	0.17 mM
<b>MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	7.5 gr.	10 ml	0.3 mM
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3 H<sub>2</sub>O</b>	7.5 gr.	10 ml	0.43 mM
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	17.5 gr.	10 ml	1.29 mM
<b>NaCl</b>	2.5 gr.	10 ml	0.43 mM
<b>Solución stock de metales o solución P-IV (UTEX)</b>	(Ver preparación abajo)	6 ml	
<b>Vitamina B<sub>1</sub> (Tiamina)</b>	(Ver preparación abajo)	1 ml	
<b>Vitamina B<sub>12</sub> (Cianocobalamina)</b>	(Ver preparación abajo)	1 ml	

**Nota:** Las soluciones Stock tienen vigencia de 18 meses. Las vitaminas pueden conservarse congeladas por 2 a 3 años.

**Solución stock de metales traza P-IV:**

- Disolver 0.75 gramos de Na<sub>2</sub>EDTA en aproximadamente 800 ml de agua destilada y después adicionar los siguientes componentes en el orden especificado agitando constantemente.
- Ajustar el volumen a 1 litro.
- Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos.
- Almacenar en frasco de plástico estéril y en refrigeración.

Componente	Cantidad para 1 Lt	Concentración final en el medio
Na <sub>2</sub> EDTA	0.75 gr.	2 mM
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	97.0 mg.	0.36 mM
MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	41.0 mg.	0.21 mM
ZnCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	5.0 mg	0.037 mM
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	2.0 mg	0.0084 mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	4.0 mg	0.017 mM

**Solución de vitamina B<sub>1</sub> (Tiamina):**

Componente/Sol. Stock	Cantidad para 100 ml
Tiamina (HCl)	0.12 gr.

Esterilizar por filtración y almacenar a -20°C.

**Solución de vitamina B<sub>12</sub> (Cianocobalamina):**

Componente/Sol. Stock	Cantidad para 100 ml
Cianocobalamina	0.1 gr.

Esterilizar por filtración y almacenar a -20°C.

**REFERENCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS**



---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Raouf, N., A. A. Al-Homaidan, and I. B. M. Ibraheem. 2012. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **19**(3): 257-275.

Affan, M. A., D. W. Lee, S. M. Al-Harbi, H. J. Kim, N. I. Abdulwassi, S. J. Heo, C. Oh, H. S. Park, C. W. Ma, H. Y. Lee, and D. H. Kang. 2015. Variation of *Spirulina maxima* biomass production in different depths of urea-used culture medium. *Brazilian Journal of Microbiology*, **46**(4): 991-1000.

Angulo-Mercado, E. R., G. Castellar Ortega, E. Morales Avendaño, y M. Barrios Solano. 2012. Remoción de azul de metileno por la microalga *Chlorella sp.* *Viva. Prospectiva*, **10**(1): 53-60.

Arias M., A. Martínez, y R. Cañizares 2013. Producción de biodiesel a partir de microalgas: Parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. *Acta Biológica Colombiana*. **18**(1): 43-68.

Arias-Martínez, S. A., F. Betancur-Toro, G. Gómez-Rojas, J. Salazar-Giraldo, y M. Hernández-Ángel. 2010. Fitorremediación con humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales porcinas. *Informador Técnico*, **74**: 12-22.

Benavente-Valdés, J., Aguilar, C., Méndez-Zavala, A. y Valdibia, B., 2012. Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores. *Revista Científica de la Universidad Coahuila*, **4**(7):23-27.

Blanken, W., P. R. Postma, L. de Winter, R. H. Wijffels, and M. Janssen. 2016. Predicting microalgae growth. *Algal Research*, **14**: 28-38.

Bojorge-García, M., y E. A. Cantoral-Uriza. 2016. La importancia ecológica de las algas en los ríos. *Hidrobiológica*, **26**(1): 1-8.



Brennan, L., and Owende, P. 2010. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 557-577.

Byung-Gon, R., K. Eun-Jung, K. Hee-Sik, K. Jugmin, C. Yoon-E and Y. Ji-Won. 2014. Simultaneous treatment of municipal wastewater and biodiesel production by cultivation of *Chlorella vulgaris* with indigenous wastewater bacteria. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 19: 201-210.

Caballero G. M. 2013. Desarrollo del proceso de bioconversión del CO<sub>2</sub> contenido en biogás a O<sub>2</sub> y biomasa a partir de microalgas. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Orizaba, México.

Calderón B.M.P. 2017. Producción de *Chlorella spp.* y *Spirulina maxima* en el tratamiento de residuos de las industrias: avícola, porcícola y azucarera. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Orizaba, México.

Cirés-Gómez, S., y A. Quesada de Corral. 2011. Catálogo de cianobacterias planctónicas potencialmente tóxicas de las aguas continentales españolas. Ministerio de medio ambiente y medio rural y marino. España.

Chao-Espinosa, R., R. Sosas-Caceres, y Y. Díaz-Capdesuñer. 2012. Gasto de agua de limpieza y tratamiento del residual en naves de ceba porcina. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, **21**(3): 69-72.

Da Cruz-Coelho, A. A., H. Damasceno-Maia, J. W. Alves da Silva, J. H. Cavalcante-Bezerra, R. Teixeira-Moreira, y W. R. Lobo-Farias. 2014. Biorremediação do efluente de cultivo de tilápia do nilo pela microalga *Spirulina platensis*. *Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: Investigación, desarrollo y práctica*, **7**(1): 11-18.

De la Mora-Orozco, C., R. A. Saucedo-Terán, E. Barrientos-Juárez, S. Gómez-Rosales, I. J. González-Acuña, y G. Domínguez-Araujo. 2014. Humedales artificiales

para el tratamiento de aguas residuales provenientes de granjas porcícolas. Folleto Técnico Num. 7 Campo Experimental Centro-Altos de Jalisco, México.

Delgadillo-Mirquez, L., F. Lopes, B. Taidi, and D. Pareau. 2016. Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture. *Biotechnology Reports*, **11**: 18-26.

Dominguez-Araujo, G., A.J. Galindo-Barboza, G. Salazar-Gutiérrez, G. Barrera-Camacho, y F.J. Sanchez-Garcia. 2014. Las excretas porcinas como materia prima para procesos de reciclaje utilizados en actividades agropecuarias. Folleto Técnico Núm. 6. Campo Experimental Centro-Altos de Jalisco, Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México.

Domínguez, S. V. 2014. Evaluación del desempeño de *Chlorella* spp. y *Spirulina maxima* en el proceso de bioconversión de dióxido de carbono contenido en biogás a oxígeno y biomasa. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Orizaba, México.

Escalante-Estrada, V., M. Garzón-Zúñiga, y S. Valle-Cervantes. 2012. Remoción de macronutrientes en el tratamiento de aguas residuales porcícolas. *Ra Ximhai*, **8**(3): 75-82.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2016. “Cerdos y...”. <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/pigs/home.html> (Consultado agosto, 2017)

FIRA (Fideicomisos Instituidos en Relacion con la Agricultura). 2012. Panorama Agroalimentario. Carne de porcino 2012. Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial., 1-22.

FIRA (Fideicomisos Instituidos en Relacion con la Agricultura). 2017. Panorama Agroalimentario. Carne de cerdo 2017. Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial., 1-27.

García-Gozalbes, C. C., Z. Arbib, y J. Perales-Vargas-Machuca. 2015. Cinéticas de crecimiento y consumo de nutrientes de microalgas en aguas residuales urbanas con diferentes niveles de tratamiento. *Tecnología y Ciencias del Agua*, **6**(1): 49-68.

Garzón-Zúñiga, M. A., y G. Buelna. 2014. Caracterización de aguas residuales porcinas y su tratamiento por diferentes procesos en México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, **30**(1): 65-79.

González, B., G. Torrealba, E. Lameda, M. G. Pire, L. Molina-Quintero, y M. C. Pire-Sierra. 2016. Evaluación de un humedal artificial como tratamiento para efluentes sintéticos de tenería. *Novum Scientiarum*, **2**(4): 10-20.

González-Falfán, K. 2015. Efecto de las condiciones ambientales en el contenido de pigmentos en la microalga *Chlorella spp.* Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Orizaba, México.

Gutiérrez-Salmeán, G., L. Fabila-Castillo, and G. Chamorro-Cevallos. 2015. Nutritional and toxicological aspects of *Spirulina (Arthrospira)*. *Nutrición Hospitalaria*, **32**(1): 34-40.

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

Hernández-Reyes, B. M. 2010. Remoción de ortofosfato y amonio de agua residual municipal por tres cultivos libres e inmovilizados de microalgas. Tesis de especialidad. Universidad Autónoma Metropolitana, México.D.F.

Hernández-Reyes, B., M. Rodríguez-Palacio, C. Lozano-Ramírez, y P. Castilla-Hernández. 2012. Remoción de nutrientes por tres cultivos de microalgas libres e inmovilizados. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, **3**(1): 80-94.

Huarachi O.R., U. Yapo, A. Dueñas, J. Soto y R. González. 2013. Producción de *Spirulina platensis* (cyanophyta) en fotobioreactor tubular cónico bajo condiciones de laboratorio. *The Biologist* (Lima), **11**(2): 217-227

Infante, C., A. Edgardo, A. Zarate, J. Florez, F. Barrios, y C. Zapata. 2012. Propagación de la microalga *Chlorella sp.* en cultivo por lote: cinética del crecimiento celular. *Avances en Ciencias en Ingeniería*, **3**(2): 159-164.

Jacob-Lopes, E., Ferreira-Lacerda, L. y Teixeira-Franco, T. 2007. Biomass production and carbon dioxide fixation by *Aphanothece microscopica* Nägeli in a bubble column photobioreactor. *Biochemical Engineering Journal* **40**: 27–34.

Jinsoo Kim, Zhouyang Liu, Joo-Youp Lee and Ting Lu. 2013. Removal of nitrogen and phosphorus from municipal wastewater effluent using *Chlorella vulgaris* and its growth kinetics. *Desalination and Water Treatment*, 51: 7800-7806.

López-Hernández, I., J. Vásquez-Arroyo, y V. Álvarez-Reyna. 2016. Remoción biológica de nutrientes en aguas residuales urbanas con fotobiorreactores utilizando microalgas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, (17): 3569-3580.

Madigan, M.T., J.M. Martinko y J. Parker. 2004. Brock Biología de los microorganismos. Pearson Prentice Hall. Madrid.

Mezzomo, N., A. Galon-Saggiorato, R. Siebert, P. Oliveira-Tatsch, M. C. Lago, M. Hemkemeier, J. A. Vieira-Costa, T. Elita-Bertolin, and L. M. Colla. 2010. Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **30**(1): 173-178.

Mihelcic, J.R. and J.B Zimmerman. 2012. Ingeniería ambiental: fundamentos, sustentabilidad y diseño. Alfaomega Grupo Editor, S.A. de C.V., México

Mobin, S., y F. Alam. 2017. Some promising microalgal species for commercial applications: A review. *Energy Procedia*, **110**: 510-517.

Oliveira, O., S. Giancesella, V. Silva, T. Mata, y N. Caetano. 2017. Lipid and carbohydrate profile of a microalga isolated from wastewater. *Energy Procedia*, **136**: 468-473.

Pérez-Espejo, R. 2006. Granjas porcinas y medio ambiente. Contaminación del agua en La Piedad, Michoacán. México: Plaza y Valdés.

Pérez-García , R. O. 2009. Eliminación de nutrientes para el tratamiento biológico de agua residual usando un sistema inmovilizados microalga-bacteria en crecimiento autotrófico, heterotrófico y mixotrófico. Tesis de maestría. Centro de investigaciones biológicas del noroeste, S.C. La Paz, B.C.S., México

Pérez-Gutiérrez, A., C. Dzul-Mukul, L. Borges-Gómez, L. Latournerie-Moreno, E. Ruiz-Sánchez, y G. Ayora-Ricalde. 2015. Uso potencial de aguas residuales de criaderos de cerdo en la producción de *Capsicum Chinense*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, **38**(4): 383-387.

Pineda-Mendoza, R., F. Martínez-Jerónimo, G. Garduño-Solórzano, y R. Olvera-Ramírez. 2011. Caracterización morfológica y molecular de cianobacterias filamentosas aisladas de florecimientos de tres lagos urbanos eutróficos de la Ciudad de México. *Polibotánica*, (31): 31-50.

Plasencia, A. J. 2012. Cultivo de microalgas (*Chlorella sorokiniana*) con iluminación mediante LEDs. Tesis de licenciatura. Universidad Politécnica de Madrid. España.

PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017. 2018. PROYECTO de Modificación de la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales para quedar como proyecto de modificación de la Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017, Que establece los límites permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en cuerpos receptores propiedad de la nación. Ciudad de México, Mexico.

Quintero-Rodríguez, E., B. Arredondo-Vega, B., E. Flores-Tavizón, M. Virgen-Félix, E. Barrera-Domínguez, M. Carballo-Verduzco, y A. Maldonado-Macías. 2016. Selección de un medio de cultivo a nivel laboratorio para el cultivo de la cianobacteria *Spirulina (arthrospira maxima)* y cuantificación de los nutraceuticos. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos, **1**(1): 532-537.

Ramírez-Mérida, L. G., L. Queiroz-Zepka, y E. Jacob-Lopes. 2013. Fotobiorreactor: herramienta para cultivo de cianobacterias. Ciencia y Tecnología, **6**(2): 9-19.

Roa-Parra, A. L., y R. O. Cañizares-Villanueva. 2012. Bioremediación de aguas con fosfatos y nitratos utilizando *Scenedesmus incrassatulus* inmovilizado. Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias, **10**(1), 71-79.

Romo, P. A. K. 2002. Manual para el cultivo de microalgas. Memoria técnica profesional. UABCS.

Ruiz-Martínez, A. 2011. Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. Tesis de maestría. Universidad Politécnica de Valencia. España.

SAGARPA. 2016. 4to Informe de labores 2015-2016. *Informe de labores*, 16-17.

Sánchez-García, L. 2013. Cultivo a la intemperie de *Scenedesmus obtusiusculus* en un fotobiorreactor solar "air-lift". Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. México.

Santos A., Y. González y C. Sastre. 2014. Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas. Anales de mecánica y electricidad. 20-28.

Trejo-Lizama, W., L. B. Vázquez-González, A. J. Uicab, J. Castillo-Caamal, A. Caamal-Maldonado, R. Belmar-Casso, y R. Santos-Ricalde. 2014. Eficiencia de remoción de materia orgánica de aguas residuales porcinas con biodigestores en el

estado de Yucatán, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, **17**(2): 321-323.

Tórtora, G. J., B. R. Funke y C. L. Case. 2007. Introducción a la microbiología. Ed. Médica Panamericana. España.

Zaballa , I., M. Zanon, C. Cuello, J. Gori, R. Vaccaro, y C. Ribaudó. 2016. Remoción biológica de nitrógeno y fósforo en aguas residuales por parte de microalgas y bacterias co-inmovilizadas. *Investigadores en Formación en Recursos Hídricos*, Ezeiza, Buenos Aires. 1-6.