

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**”ESTUDIO DEL ACONDICIONAMIENTO Y SEMI-PURIFICACIÓN DE
MICROALGAS NATIVAS PARA LA INDUCCIÓN DE FLOCULACIÓN,
PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y PULIMENTO DE EFLUENTES
MUNICIPALES”**

**POR
JULIO CÉSAR BELTRÁN ROCHA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
MICROBIOLOGÍA APLICADA**

DICIEMBRE, 2017

**“ESTUDIO DEL ACONDICIONAMIENTO Y SEMI-PURIFICACIÓN DE
MICROALGAS NATIVAS PARA LA INDUCCIÓN DE FLOCULACIÓN,
PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y PULIMENTO DE EFLUENTES MUNICIPALES”**

Tesis realizada por el alumno Julio César Beltrán Rocha, matrícula 1139426, como opción al grado de Doctor en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada

Dirección de Tesis:

Dr. Ulrico Javier López Chuken
Director de Tesis

Dra. Icela Dagmar Barceló Quintal
Codirectora

Dr. Juan Francisco Villareal Chiu
Codirector

**“ESTUDIO DEL ACONDICIONAMIENTO Y SEMI-PURIFICACIÓN DE
MICROALGAS NATIVAS PARA LA INDUCCIÓN DE FLOCULACIÓN,
PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y PULIMENTO DE EFLUENTES MUNICIPALES”**

Aprobación de la Tesis:

Dr. Ulrico Javier López Chuken
Director de Tesis
Presidente

Dra. Icela Dagmar Barceló Quintal
Codirectora

Dr. Juan Francisco Villareal Chiu
Codirector

Dra. María Teresa Garza González
Secretario

Dr. Juan Manuel Alfaro Barbosa
Vocal

Dra. Katiushka Arévalo Niño
Vocal

Dr. Luis Humberto Álvarez Valencia
Vocal

Dra. Aracely Hernández Ramírez
Subdirectora de Estudios Posgrado
Facultad de Ciencias Químicas, U.A.N.L.

**“ESTUDIO DEL ACONDICIONAMIENTO Y SEMI-PURIFICACIÓN DE
MICROALGAS NATIVAS PARA LA INDUCCIÓN DE FLOCULACIÓN,
PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y PULIMENTO DE EFLUENTES MUNICIPALES”**

Comité Tutorial:

Dr. Juan Manuel Alfaro Barbosa

Dra. María Teresa Garza González

Dr. Luis Humberto Álvarez Valencia

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Facultad de Ciencias Químicas (FCQ) perteneciente a la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) y la División de Ciencias Básicas e Ingeniería (CBI), correspondiente a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM).

A mi asesor de tesis el Dr. Ulrico Javier López Chuken, por brindarme su amistad y darme grandes ejemplos de practicidad los cuales siempre llevaré en mi memoria.

A mi co-asesora Dra. Icela Dagmar Barceló Quintal, por todo su gran apoyo y mostrarme que la ciencia sirve para aplicarse. Asimismo, a la familia Solis-Barceló por su siempre cordial recepción.

Al comité de tesis Dr. Juan Manuel Alfaro Barbosa, Dra. María Teresa Garza González, Dr. Luis Humberto Álvarez Valencia y Dr. Juan Francisco Villareal Chiu por todas sus valiosas contribuciones.

A Karina Navarro, por su atención profesional y amable durante el papeleo administrativo.

A los compañeros y amigos Mirna Dinorah Rodríguez Lucio, Mariano Francisco Candelario Torres, Daniel Villela Méndez, Raúl Reyna Martínez, Julián Zaragoza Carmona y Servando Cantú Bernal.

A mi amigo y colega en ciencias Claudio Guajardo Barbosa, por ser siempre una fuente de buenas enseñanzas.

A Alejandro Perales Ramírez, por ser siempre como mi amigo y hermano.

A todos mis estimados amigos, que aunque no nos veamos seguido de alguna manera siempre están ahí.

DEDICATORIA

A *Dios* por permitirme seguir

A mi esposa *Melisa Ivonne López Ramírez* por tenerla a mi lado con su apoyo, paciencia y calidez

A mi madre *Bertha Rocha Ortiz* por darme con cariño mi formación e ideales de una buena conciencia

A mi padre *Eulalio Guadalupe Beltrán Flores* por ser siempre mi primer ejemplo de trabajo, constancia e ingenio

A mis hermanas *Bertha Oralía, Laura Bertha, Diana Guadalupe* y hermano *Jorge Alberto* que son mis distintos buenos ejemplos a seguir

Y a todos los que de alguna u otra forma me acompañaron en esta etapa

RESUMEN

Julio César Beltrán Rocha
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas

Fecha de Graduación: Diciembre, 2017

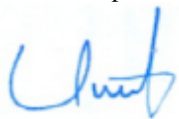
Título del Estudio: “ESTUDIO DEL ACONDICIONAMIENTO Y SEMI-PURIFICACIÓN DE MICROALGAS NATIVAS PARA LA INDUCCIÓN DE FLOCULACIÓN, PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y PULIMENTO DE EFLUENTES MUNICIPALES”

Número de páginas: 71 Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada

Área de Estudio: Biotecnología Ambiental Aplicada

Propósito y Método del Estudio: La eutrofización es una problemática ambiental a escala mundial ocasionada por la contaminación por nutrientes (N y P) que promueve la consecuente degradación de la calidad del agua y función de los sistemas acuáticos. Una de las principales fuentes responsable de la eutrofización son los efluentes secundarios municipales que contienen remanentes de NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+ y PO_4^{3-} . Entre los tratamientos para la depuración de nutrientes en efluentes secundarios, se ha investigado y destacado el uso de microalgas, debido a la alta eficiencia en la eliminación de N y P a la par de no generar contaminación secundaria y producir biomasa potencialmente útil. Cabe destacar que, la biomasa de microalgas ha indicado un gran potencial para la obtención y comercialización de alimentos, biofertilizantes y productos de alto valor (*e.g.* antioxidantes, bio-activos, etc.). Sin embargo, previo a la explotación comercial de las microalgas se debe superar el alto costo de la recuperación de biomasa el cual contribuye con un 20 a 30% o más del costo total de producción. No obstante, previo a la aplicación del cultivo de microalgas para la producción de biomasa de fácil cosecha y pulimento de los efluentes secundarios, la evidencia experimental es esencial para: 1) realizar una adecuada selección de microalgas nativas en base a su capacidad de: adaptación, floculación, producción de biomasa y eliminación de nutrientes y 2) conocer y controlar parámetros críticos como: el pH, la disponibilidad de carbono y composición del medio. Por estas razones, el presente estudio se realizó en tres etapas: 1) selección de consorcios de microalgas nativas en base a la capacidad de floculación y producción de biomasa bajo condiciones que contribuyen a la formación de agregados celulares de fácil cosecha (*i.e.* auto-floculación), 2) selección de un consorcio de microalgas durante su acondicionamiento, semi-purificación y resiembra en efluentes secundarios y 3) evaluación de la capacidad de floculación, producción de biomasa, composición fisicoquímica de la biomasa resultante y pulimento de efluentes secundarios a intemperie durante el cultivo, acondicionamiento, semi-purificación y resiembra de un consorcio de microalgas.

Contribuciones y Conclusiones: En general, los resultados del acondicionamiento y semi-purificación de microalgas en efluentes secundarios durante su cultivo a intemperie, mostraron una mejora en la producción de biomasa (de: 66 a 167%) y capacidad de floculación (de: 75 a 84%) además de una mayor reducción en la conductividad eléctrica (de: 9 a 18%), alcalinidad total (de: 13 a 50%), NO_3^- -N (de: 31 a 54%) y PO_4^{3-} -P (de: 90 a 93%). Es importante destacar, que se obtuvo una alta floculación equivalente al rango (60 a 100%) reportado por el uso de aditivos químicos que en general son responsables de incrementar costos de operación. De igual forma, el pulimento de los efluentes secundarios sobrepasa al dar cumplimiento de la Directiva 91/271/EEC ($< 1 \text{ mg/L}$ de fósforo total y $< 10 \text{ mg/L}$ de nitrógeno total) la cual es la legislación más estricta a nivel mundial. Por otra parte, el uso de los efluentes secundarios como medio de cultivo y el bajo contenido de lípidos (0.35%) de la biomasa obtenida indicaron no ser convenientes para la producción de biodiésel. Asimismo, la alta concentración de materia inorgánica (46.5%) sugiere que la biomasa podría reciclarse como biofertilizante debido al suministro de minerales y constituyentes orgánicos formados por C, N y P (*e.g.* carbohidratos, proteínas y lípidos).



Asesor: Dr. Ulrico J. López Chuken



Candidato a Doctor: MSc. Julio C. Beltrán Rocha

ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS USADOS

BS	base seca
CE	conductividad eléctrica
CI	carbono inorgánico
CO ₂	dióxido de carbono
CO ₃ ²⁻	carbonato
DBO	demanda bioquímica de oxígeno
DQO	demanda química de oxígeno
EE	error estándar
ESPTAR	efluentes secundarios de plantas de tratamiento de aguas residuales municipales
H ⁺	ión hidronio
H ₂ CO ₃	ácido carbónico
H ₂ PO ₄ ⁻	fosfato diácido
HCO ₃ ⁻	bicarbonato
HPO ₄ ⁻	fosfato monoácido
L:O	fotoperiodo luz: oscuridad
LMP	límite máximo permisible
N	nitrógeno
NH ₃	amoníaco
NH ₃ -N	nitrógeno de amoníaco
NH ₄ ⁺	amonio
NH ₄ ⁺ -N	nitrógeno de amonio
NMP/100 mL	número más probable por 100mL
NO ₂ ⁻	nitrito
NO ₂ ⁻ -N	nitrógeno de nitrito
NO ₃ ⁻	nitrato
NO ₃ ⁻ -N	nitrógeno de nitrato
N-orgánico	nitrógeno orgánico
NT	nitrógeno total
OH ⁻	ión hidroxilo
P	fósforo
PO ₄ ³⁻	fosfato
PO ₄ ³⁻ -P	fósforo de fosfato
PT	fósforo total
PTAR	planta de tratamiento de aguas residuales municipales
SDT	sólidos disueltos totales
SST	sólidos suspendidos totales
SSV	sólidos suspendidos volátiles
VVM	volumen de aire por volumen de medio por minuto

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS USADOS	II
ÍNDICE	III
LISTA DE TABLAS	V
LISTA DE FIGURAS	VI
<hr/>	
Capítulo 1	
INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN	1
1.1 Introducción.....	1
1.2 Justificación.....	4
<hr/>	
Capítulo 2	
ANTECEDENTES	5
2.1 Contaminación por nutrientes y eutrofización de cuerpos de agua.....	5
2.1.1 Eutrofización y distribución en zonas costeras.....	5
2.1.2 Normativa internacional de descarga de efluentes a cuerpos receptores.....	7
2.1.3 Normativa mexicana de descarga de efluentes a cuerpos receptores.....	7
2.2 Tratamiento de aguas residuales municipales.....	9
2.2.1 Etapas y objetivos del tratamiento de aguas residuales.....	9
2.2.2 Tratamiento para la eliminación de N y P a base de microalgas.....	11
2.3 Consideraciones en el cultivo de microalgas.....	14
2.3.1 Asimilación de nutrientes con microalgas.....	14
2.3.2 Incremento de pH por actividad fotosintética en el cultivo de microalgas.....	15
2.3.3 pH y su efecto en la disponibilidad de N y P en el cultivo de microalgas.....	15
2.3.4 Sistemas de cultivo de microalgas y recuperación de biomasa de microalgas.....	17
2.4 Aprovechamiento y aplicaciones de la biomasa de microalgas.....	21
2.4.1 Panorama de generación de productos de interés a partir de microalgas.....	21
2.4.2 Situación comercial y económica de las microalgas.....	23
<hr/>	
Capítulo 3	
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	25
3.1 Hipótesis.....	25
3.2 Objetivos.....	25
3.2.1 Objetivo General.....	25
3.2.2 Objetivos Específicos.....	26
<hr/>	
Capítulo 4	
MATERIALES Y MÉTODOS	27
4.1 Área de trabajo.....	27
4.2 Disposición de residuos.....	27
4.3 Estrategia general del proyecto.....	28
4.4 Análisis de datos.....	29
4.5 Consorcios de microalgas nativas y su propagación bajo condiciones que contribuyen a la auto-floculación.....	29
4.6 Metodologías para la determinación de la concentración de biomasa y capacidad de floculación en microalgas.....	31
4.7 Evaluación y selección de consorcios de microalgas con base en la capacidad de floculación y producción de biomasa cultivada en condiciones que contribuyen a la auto-floculación.....	32

4.8	Muestreo de ESPTAR.....	33
4.9	Evaluación de la capacidad de floculación y producción de biomasa durante el acondicionamiento, semi-purificación y selección de un consorcio de microalgas cultivado en lotes sucesivos de ESPTAR.....	35
4.10	Evaluación del pulimento de ESPTAR y producción de biomasa de fácil cosecha durante el acondicionamiento, semi-purificación y cultivo en lotes consecutivos de un consorcio de microalgas.....	36
Capítulo 5		
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		40
5.1	Evaluación y selección de consorcios de microalgas durante su cultivo en condiciones que contribuyen a la auto-floculación.....	40
5.1.1	Selección de consorcios de microalgas en base a su capacidad de floculación y producción de biomasa.....	40
5.1.2	Implicaciones del pH durante la auto-floculación y el cultivo de microalgas.....	42
5.1.3	Efecto del pH alcalino y composición de la solución nutritiva en la auto-floculación de microalgas.....	44
5.2	Acondicionamiento, semi-purificación y selección de un consorcio de microalgas de acuerdo a su capacidad de floculación y producción de biomasa durante su cultivo y resiembra en ESPTAR.....	47
5.3	Acondicionamiento, semi-purificación y evaluación de un consorcio de microalgas durante la producción de biomasa y pulimento de ESPTAR a intemperie.....	49
5.3.1	Capacidad de floculación y producción de biomasa de microalgas durante su cultivo a intemperie en lotes sucesivos utilizando ESPTAR.....	49
5.3.2	Efecto del aumento del pH en ESPTAR durante el cultivo de microalgas.....	51
5.3.3	Evaluación del pulimento en ESPTAR durante el cultivo de microalgas.....	54
5.3.4	Caracterización fisicoquímica parcial de la biomasa de microalgas generada de ESPTAR para su valorización y determinación de uso potencial.....	55
Capítulo 6		
CONCLUSIONES		57
REFERENCIAS		60
APÉNDICE		68
A1.	Divulgación de la investigación.....	68

LISTA DE TABLAS

ANTECEDENTES

2.1	Clasificación del estado trófico por la OCDE (modificado por Vollenweider y Kerekes, OECD, 1982).....	6
2.2	LMP de efluentes en sistemas receptores aplicados en la Unión Europea (Jacobsen y Warn 1999).....	7
2.3	LMP de contaminantes en la descarga de agua residual tratada en aguas y bienes nacionales de México (NOM-001-SEMARNAT-1996).....	8
2.4	Eliminación de N y P por diversos géneros de microalgas y cianobacterias en procesos por lotes axénicos de diferentes flujos de residuos reales y sintéticos (adaptado de: Cai <i>et al.</i> , 2013).....	12
2.5	Comparación de cultivo de microalgas en fotobiorreactor y sistema abierto (Rashid <i>et al.</i> , 2014).....	18
2.6	Características que dificultan y generan altos costos en la recuperación de biomasa de microalgas (Rashid <i>et al.</i> , 2014).....	18
2.7	Guía básica para cosechar microalgas (Rashid <i>et al.</i> , 2014).....	19
2.8	Precios de mercado y el volumen del mercado mundial de productos de microalgas seleccionados (Koller <i>et al.</i> , 2014).....	24

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1	Composición elemental de la solución nutritiva LC (López-Chuken y Young 2010).....	30
4.2	Condiciones de propagación de los consorcios de microalgas.....	30
4.3	Resultados promedio del año 2011 a 2012 de la calidad de descarga de ESPTAR “Dulces Nombres” del Estado de Nuevo León, México.....	34
4.4	Composición fisicoquímica de ESPTAR del Estado de Nuevo León (Beltrán-Rocha 2014)	35
4.5	Parámetros en el cultivo de microalgas en lote utilizando ESPTAR bajo condiciones a intemperie.....	39
4.6	Análisis fisicoquímico realizados en la biomasa de microalgas cosechada.....	39

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1	Capacidad de floculación, concentración (g (BS) / L) y aumento de biomasa (%) del consorcio 10 de microalgas cultivado en lotes con ESPTAR.....	50
5.2	Resultados de la alcalinidad total posterior al cultivo en lotes del consorcio de microalgas 10 en ESPTAR.....	52
5.3	Resultados de la calidad microbiológica (coliformes totales, coliformes fecales y <i>E. coli</i>) inicial y posterior al cultivo en lotes del consorcio de microalgas 10 en ESPTAR.....	54
5.4	Resultados del pulimento de NO ₃ ⁻ -N y PO ₄ ³⁻ -P posterior al cultivo en lotes del consorcio de microalgas 10 en ESPTAR.....	55
5.5	Composición fisicoquímica de la biomasa generada en ESPTAR.....	56

LISTA DE FIGURAS

ANTECEDENTES

2.1	Distribución mundial de zonas costeras eutróficas e hipóxicas (Selman <i>et al.</i> , 2008).....	6
2.2	Proceso típico de tratamiento de aguas residuales (Razzak <i>et al.</i> , 2013).....	10
2.3	Mecanismo de asimilación de C, N y P en efluentes secundarios municipales durante el cultivo de microalgas (adaptado de: Abinandan y Shanthakumar 2015).....	14
2.4	Formación de especies $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ en función del pH (adaptado de: Markou y Georgakakis 2011).....	16
2.5	Formación de especies de PO_4^{3-} en función del pH (adaptado de: Markou y Georgakakis 2011).....	16
2.6	Formación de especies de carbono inorgánico en función del pH (H_2CO_3^* , se refiere a CO_2 (aq) + H_2CO_3) (adaptado de: Markou y Georgakakis 2011).....	17
2.7	Panorámica general de productos sintetizados y áreas de aplicación a partir de microalgas (Koller <i>et al.</i> , 2014).....	22
2.8	Distribución mundial de empresas privadas que producen productos derivados de microalgas (Vigani <i>et al.</i> , 2015).....	23

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1	Diagrama de flujo del procedimiento experimental general del proyecto.....	28
4.2	Cultivo de consorcios de microalgas en solución nutritiva LC. a) Vista frontal. b) Vista lateral.....	32
4.3	Cisterna perteneciente a la red de riego de ESPTAR de la UANL. a) Lugar de muestreo. b) Vista general de la cisterna de la UANL.....	33
4.4	Montaje del cultivo de microalgas en ESPTAR. a) Fotobiorreactores. b) Cultivo del consorcio de microalgas 9. c) Cultivo del consorcio de microalgas 10.....	36
4.5	Cultivo de consorcios de microalgas en ESPTAR. a) Vista panorámica del sistema de cultivo. b) Conjunto de reactores fast ferment.....	37
4.6	Temperatura ambiental durante el cultivo del consorcio de microalgas 10 a intemperie.....	38

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1	Concentración de biomasa (g (BS) / L) de los 16 consorcios de microalgas cultivados en solución nutritiva LC durante los días: 5, 10, 15, 20, 25 y 30.....	41
5.2	Capacidad de floculación (%) a 10, 20 y 30 días de los 16 consorcios de microalgas cultivados en solución nutritiva LC.....	41
5.3	Valores de pH durante el cultivo de consorcios de microalgas en solución nutritiva LC.....	42
5.4	Concentración de CI inicial y posterior a 30 días de cultivo de los 16 consorcios de microalgas evaluados en solución nutritiva LC.....	44
5.5	Concentración de CE inicial y posterior a 30 días de cultivo de los 16 consorcios de microalgas evaluados en solución nutritiva LC.....	46
5.6	Concentración de materia inorgánica en biomasa de los 16 consorcios de microalgas evaluados en solución nutritiva LC.....	46
5.7	Capacidad de floculación (%) de los consorcios de microalgas 9 y 10 durante su cultivo en cinco lotes sucesivos en ESPTAR.....	48
5.8	Concentración de biomasa de los consorcios de microalgas 9 y 10 durante su cultivo en lotes sucesivos en ESPTAR. Promedio (n = 3) ± EE. La ausencia de la barra de error indica EE no apreciable.....	49
5.9	Valores de CE durante el cultivo en lotes sucesivos del consorcio de microalgas 10 en ESPTAR. Promedio (n = 3) ± EE. La ausencia de la barra de error indica EE no apreciable.....	51
5.10	Valores de pH durante el cultivo en lotes sucesivos del consorcio de microalgas 10 en ESPTAR. Promedio (n = 3) ± EE. La ausencia de la barra de error indica EE no apreciable.....	53

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

1.1.- Introducción

La descarga en exceso de nitrógeno (N) y fósforo (P) proveniente de las aguas residuales hacia los cuerpos de agua superficiales provoca la eutrofización, el cual es un problema ambiental a escala mundial que reduce la calidad del agua y altera la estructura y función de los ecosistemas (Correll 1998; Dodds *et al.*, 2009). Como medida de mitigación, se ha adoptado la eliminación de los nutrientes de las aguas residuales previo a su descarga en el medio acuático (Dodds *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2000; Rasoul-Amini *et al.*, 2014; Morris *et al.*, 2017). Dentro de los tratamientos de depuración se ha propuesto el uso de microalgas debido a que han indicado ser eficientes en la eliminación de N y P (principalmente NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- y PO_4^{3-}), proporcionando un proceso de tratamiento rentable en comparación a los procedimientos químicos y físicos, con la ventaja de ser una tecnología ambientalmente amigable y sostenible ya que no genera contaminantes secundarios (Pittman *et al.*, 2011; Gouveia *et al.*, 2016). Esta importante característica ha llevado a investigar el uso de microalgas para tratar los efluentes de aguas residuales municipales, los cuales son una de las principales fuentes de contaminación de nutrientes (Wang *et al.*, 2010; Pittman *et al.*, 2011; Cai *et al.*, 2013). Como resultado, no sólo la concentración de N y P podría ser controlada, sino que también se conseguiría generar biomasa de las microalgas que representa la materia prima para obtener productos de alto valor, como ácidos grasos, pigmentos y antioxidantes (Vigani *et al.*, 2015) a partir del uso de una solución nutritiva prácticamente libre de costo (*i.e.* agua tratada) (Guldhe *et al.*, 2017). Por otra parte, la biomasa completa podría ser procesada para aplicaciones tales como nutrición humana, piensos, productos químicos finos, biocombustibles y biofertilizantes (Barsanti y Gualtieri, 2006; Rashid *et al.*, 2014; Garcia-Gonzalez y Sommerfeld, 2016).

Aunque la biomasa de las microalgas posee un gran potencial para la comercialización de productos y aplicaciones derivadas, previamente se debe de superar el alto costo de la

recuperación de está durante la cosecha (Wan *et al.*, 2015). Cabe señalar que hasta la fecha no se ha desarrollado ningún proceso general y rentable para realizar la cosecha de la biomasa de las microalgas, representando así una etapa limitante que contribuye con un 20-30% o incluso más de los costos de la producción total de biomasa (Grima *et al.*, 2003; Rashid *et al.*, 2014). Para la recolección de microalgas usualmente se emplean varios métodos como centrifugación, filtración o sedimentación, lo cual puede ser un desafío técnico y económico para un gran volumen de operación, debido al tamaño celular (diámetro de 2-20 μ m), baja densidad (0.5-5.0 g/L de peso seco) y alta estabilidad coloidal en la solución nutritiva (Cai *et al.*, 2013; Vandamme *et al.*, 2012, 2013). Por lo tanto, es necesario desarrollar estrategias viables para cosechar microalgas en cultivos a gran escala, una de ellas es el uso de tecnologías de floculación que recientemente se han considerado factibles a nivel económico y operativo, ya que inducen a la formación de agregados celulares (*i.e.* flóculos de microalgas) de fácil sedimentación y recuperación (Grima *et al.*, 2003; Vandamme *et al.*, 2013; Wan *et al.*, 2015).

Entre los diferentes métodos de floculación desarrollados para la recolección de microalgas la floculación química con adición de floculantes como polímeros orgánicos/polielectrolito (*e.g.* almidón catiónico y quitosano) muestra una alta eficiencia sin contaminar la biomasa, pero su aplicación resulta costosa (Vandamme *et al.* 2010; Rashid *et al.* 2014). Para el caso de la floculación química utilizando sales metálicas inorgánicas multivalentes y la biofloculación con microorganismos como bacterias, hongos y levaduras, la principal desventaja es que se contamina la biomasa cosechada (Vandamme *et al.*, 2013; Rashid *et al.*, 2014; Wan *et al.* 2015). Por otro lado, recientemente ha llamado la atención el proceso de auto-floculación que se produce cuando el pH aumenta por encima de 9 durante el cultivo de microalgas como resultado de la actividad fotosintética, el agotamiento de carbono en forma de bicarbonato y el uso de nitrato como fuente de nitrógeno (Pittman *et al.*, 2011; Spilling *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2014). Cabe mencionar que la auto-floculación puede ir acompañada de la co-precipitación de calcio, magnesio y fósforo, ya presentes en la solución nutritiva (Sukenic y Shelef 1984; Nguyen *et al.*, 2014). De igual modo, otros factores influyen en la agregación celular durante la auto-floculación, tales como: la biodiversidad en tamaño y estructura de la pared celular de las microalgas

(Eldridge *et al.*, 2012), la interacción entre diferentes especies de microalgas (Salim *et al.*, 2014), el efecto de la intensidad de la luz y altas temperaturas, que inducen la producción de exopolisacáridos que contribuyen al proceso natural de biofloculación en las microalgas (Christenson y Sims 2011; Zhang *et al.*, 2012).

Antes de aplicar una tecnología basada en el cultivo de microalgas en efluentes secundarios municipales con la doble función de producción de biomasa de fácil recuperación y pulimento de efluentes a gran escala, es esencial: (1) realizar una adecuada selección de especies nativas con base en su capacidad de: adaptación, floculación, producción de biomasa y potencialidad en la eliminación de nutrientes, (2) conocer y controlar los parámetros críticos del proceso tales como el pH y factores operativos (*e.g.* aireación, disponibilidad de carbono y composición del medio) para favorecer la auto-floculación, la óptima generación de la biomasa de microalgas y eliminación de nutrientes (Heubeck *et al.*, 2007; Park y Craggs 2010; Rashid *et al.*, 2014; Rasoul-Amini *et al.*, 2014; Sutherland *et al.*, 2015; Gonçalves *et al.*, 2017).

1.2.- Justificación

Una fuente constante de nutrientes no aprovechados que contribuye a la eutrofización de manera regional y nacional, pese a cumplir con la norma NOM-001-SEMARNAT-1996, son los Efluentes Secundarios de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Municipales (ESPTAR), los cuales exhiben una composición adecuada (físicoquímica y microbiológica) para el cultivo de microalgas, este proceso presenta destacadas ventajas tales como: 1) no requerir modificación del efluente, ni adición de reactivos o catalizadores químicos; 2) la generación potencial de productos de alto valor agregado a partir de la biomasa de microalgas, aprovechada de manera completa o componente *e.g.* alimento para animales y humanos, biofertilizantes, ácidos grasos, pigmentos, bioactivos u otras especialidades; 3) uso de la capacidad natural de las microalgas para la eliminación y recuperación de nutrientes requiriendo prácticamente el uso de la luz solar y 4) aptitud para generar un tratamiento de pulimento de alta calidad (*i.e.* reducción de N y P) en los efluentes secundarios municipales, sin conducir a una contaminación secundaria. Debido a los beneficios del cultivo de las microalgas el presente proyecto plantea la selección, semi-purificación y acondicionamiento de un consorcio de microalgas nativas, para la producción de biomasa de fácil cosecha y pulimento de ESPTAR bajo condiciones reales de operación. Dando así, seguimiento y repuesta al marco de los Objetivos de Desarrollo del Milenio de la Organización de las Naciones Unidas (PNUD, 2014), el Plan Nacional de Desarrollo 2013-2018 (PND, 2013) los cuales incluyen como aspectos prioritarios promover la sustentabilidad en el desarrollo a nivel local, regional y global. Todo esto con el valor agregado de ser un proceso natural, solar, sustentable y económicamente viable, que utilice especies nativas.

Capítulo 2

ANTECEDENTES

2.1.- Contaminación por nutrientes y eutrofización de cuerpos de agua

2.1.1.- Eutrofización y distribución en zonas costeras

La eutrofización es la causa principal del deterioro de la calidad del agua en todo el planeta, ocasionada por el enriquecimiento excesivo de nutrientes, tales como nitrógeno y fósforo en sistemas de agua superficial. Durante la eutrofización se generan aumentos en la producción y acumulación de carbono orgánico, los cuales llegan a sobrepasar la capacidad de adaptación del ecosistema (Nixon 1995; Rabalais 2004), provocando efectos adversos tanto para ecosistemas marinos como de agua dulce, en tres aspectos generales (Dodds *et al.*, 2009):

- 1) Reducción de la biodiversidad y sustitución de las especies dominantes
- 2) Aumento de la toxicidad del agua
- 3) Aumento de la turbidez del agua y disminución de la vida útil de los sistemas acuáticos

La eutrofización depende de múltiples variables que incluyen características de la cuenca hidrológica, así como aspectos químicos y biológicos de los cuerpos de agua receptores (EPA, 2000). La relación entre la concentración de nutrientes y eutrofización es la base comúnmente utilizada para la clasificación del estado trófico de un cuerpo de agua (Brown *et al.*, 2000). Un criterio de estado trófico comúnmente aceptado por una gran cantidad de países para determinar la calidad de los cuerpos de aguas superficiales, es la clasificación propuesta en 1982 por la OCDE que se fundamenta principalmente en la concentración de nutrientes (N y P) (Tabla 2.1).

Tabla 2.1.- Clasificación del estado trófico por la OCDE (modificado por Vollenweider y Kerekes, OECD, 1982)

Parámetro	Estado Trófico		
	Oligotrófico	Mesotrófico	Eutrófico
Clorofila <i>a</i> (µg/L)	1.7	4.7	14.3
Fósforo total (µg/L)	8.0	26.7	84.4
Nitrógeno total (µg/L)	661	753	1875
Transparencia* (m)	9.9	4.2	2.45

* Transparencia por profundidad de disco Secchi

La Figura 2.1 identifica 415 zonas eutróficas e hipóxicas distribuidas alrededor del planeta, de las cuales 169 son áreas hipóxicas, 233 son áreas eutrofizadas y 13 son sistemas en estado de recuperación.

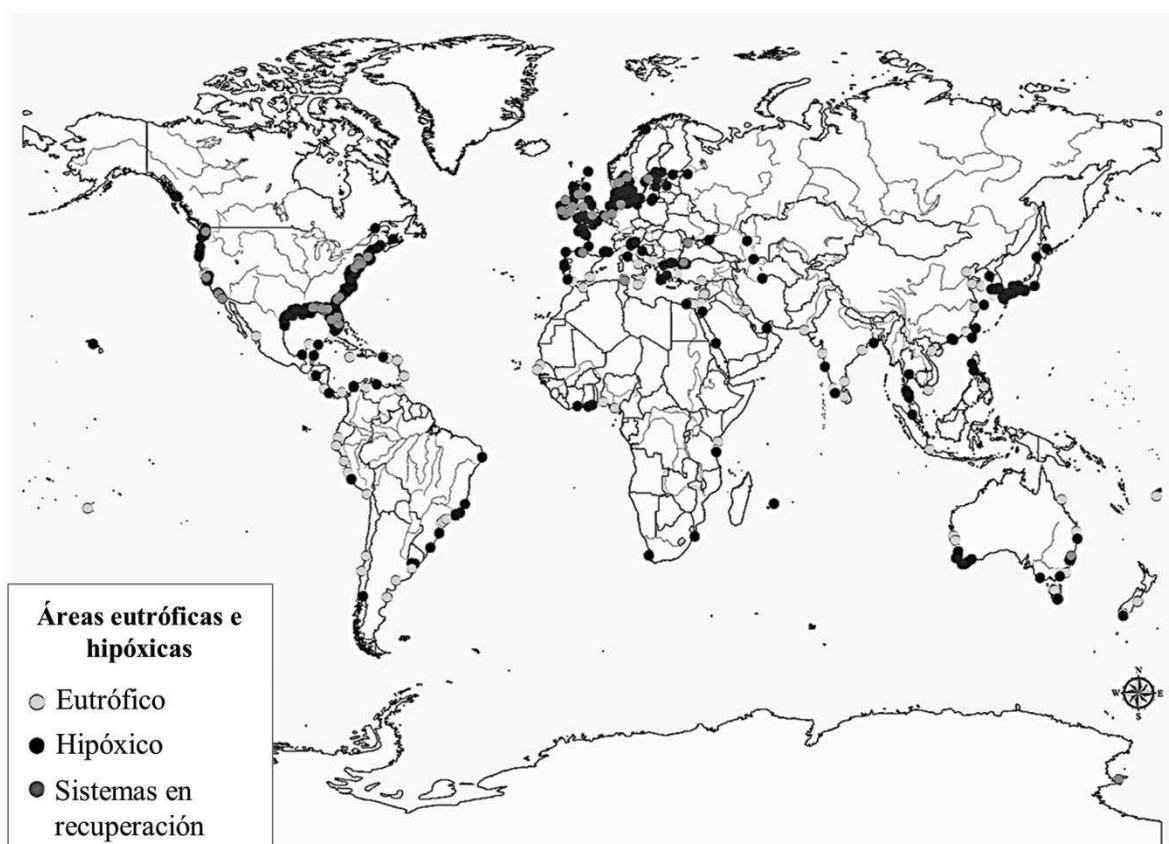


Figura 2.1.- Distribución mundial de zonas costeras eutróficas e hipóxicas (Selman *et al.*, 2008)

2.1.2.- Normativa internacional de descarga de efluentes a cuerpos receptores

Dada la creciente preocupación a zonas sensibles cuyas aguas sean eutróficas o tengan tendencia a serlo en un futuro próximo, se han fijado normativas estrictas para el control de las descargas donde se especifican los Límites Máximos Permisibles (LMP) para la descarga de efluentes en países desarrollados. Tal es el caso de la Directiva 91/271/CEE de la Unión Europea (Consejo CE, 1991), que establece las medidas necesarias que los Estados miembros han de adoptar para garantizar que las aguas residuales urbanas reciban un tratamiento adecuado antes de su vertido. Fijando las normas de depuración y concentración para la demanda química de oxígeno (DQO), demanda bioquímica de oxígeno (DBO), sólidos suspendidos totales (SST), nitrógeno total (NT) y fósforo total (PT) que se han adoptado de manera similar en distintos países europeos (*e.g.* Austria, Suiza, Francia, Italia, Países Bajos, Eslovaquia) (Tabla 2.2).

Tabla 2.2.- LMP de efluentes en sistemas receptores aplicados en la Unión Europea

(Jacobsen y Warn 1999)

País	Habitantes en miles	Concentración (mg/L)					Tipo de tratamiento o comentario
		DQO	DBO	SST	NT	PT	
Unión Europea	> 2	125	25	35	–	–	Secundario
	10 – 100	125	25	35	15	2	Terciario
	> 100	125	25	35	10	1	Terciario

– No especificado

2.1.3.- Normativa mexicana de descarga de efluentes a cuerpos receptores

En México, la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996, establece los LMP de contaminantes básicos, patógenos y tóxicos en las descargas de agua residual tratada en cuerpos receptores (Tabla 2.3).

Tabla 2.3.- LMP de contaminantes en la descarga de agua residual tratada en aguas y bienes nacionales de México (NOM-001-SEMARNAT-1996)

Parámetros (mg/L, excepto cuando se especifique)	Ríos		Embalses naturales y artificiales		Aguas costeras			Suelo		
	Uso en riego agrícola (A)	Uso público urbano (B)	Protección de vida acuática (C)	Uso en riego agrícola (B)	Uso público urbano (C)	Explotación pesquera, navegación y otros usos (A)	Recreación (B)	Estuario (B)	Uso en riego agrícola (A)	Humedales naturales (B)
pH (sin unidades)	PM / PD	PM / PD	PM / PD	PM / PD	PM / PD	PM / PD	PM / PD	PM / PD	PM / PD	PM / PD
Temperatura (°C) ⁽¹⁾	5 – 10	5 – 10	5 – 10	5 – 10	5 – 10	5 – 10	5 – 10	5 – 10	5 – 10	5 – 10
Grasas y aceites ⁽²⁾	NA / NA	40 / 40	40 / 40	40 / 40	40 / 40	40 / 40	40 / 40	40 / 40	NA / NA	40 / 40
Materia flotante ⁽³⁾	15 / 25	15 / 25	15 / 25	15 / 25	15 / 25	15 / 25	15 / 25	15 / 25	15 / 25	15 / 25
Sólidos sedimentables (mL/L)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
SST	1 / 2	1 / 2	1 / 2	1 / 2	1 / 2	1 / 2	1 / 2	1 / 2	NA / NA	1 / 2
DBO	150 / 200	75 / 125	40 / 60	75 / 125	40 / 60	150 / 200	75 / 125	75 / 125	NA / NA	75 / 125
Nitrógeno*	150 / 200	75 / 150	30 / 60	75 / 150	30 / 60	150 / 200	75 / 150	75 / 150	NA / NA	75 / 150
Fósforo*	40 / 60	40 / 60	15 / 25	40 / 60	15 / 25	NA / NA	NA / NA	15 / 25	NA / NA	NA / NA
Arsénico*	20 / 30	20 / 30	5 / 10	20 / 30	5 / 10	NA / NA	NA / NA	5 / 10	NA / NA	NA / NA
Cadmio*	0.2 / 0.4	0.1 / 0.2	0.1 / 0.2	0.2 / 0.4	0.1 / 0.2	0.1 / 0.2	0.2 / 0.4	0.1 / 0.2	0.2 / 0.4	0.1 / 0.2
Cianuro*	0.2 / 0.4	0.1 / 0.2	0.1 / 0.2	0.2 / 0.4	0.1 / 0.2	0.1 / 0.2	0.2 / 0.4	0.1 / 0.2	0.05 / 0.1	0.1 / 0.2
Cobre*	1 / 3	1 / 2	1 / 2	2 / 3	1 / 2	1 / 1	1 / 3	1 / 2	2 / 3	1 / 2
Cromo*	4 / 6	4 / 6	4 / 6	4 / 6	4 / 6	4 / 6	4 / 6	4 / 6	4 / 6	4 / 6
Mercurio*	1.0 / 1.5	0.5 / 1.0	0.5 / 1.0	1.0 / 1.5	0.5 / 1.0	0.5 / 1.0	1.0 / 1.5	0.5 / 1.0	0.5 / 1.0	0.5 / 1.0
Níquel*	0.01 / 0.02	0.005 / 0.01	0.005 / 0.01	0.01 / 0.02	0.005 / 0.01	0.01 / 0.02	0.01 / 0.02	0.01 / 0.02	0.005 / 0.01	0.005 / 0.01
Plomo*	2 / 4	2 / 4	2 / 4	2 / 4	2 / 4	2 / 4	2 / 4	2 / 4	2 / 4	2 / 4
Zinc*	0.5 / 1.0	0.2 / 0.4	0.2 / 0.4	0.5 / 1.0	0.2 / 0.4	0.2 / 0.4	0.5 / 1.0	0.2 / 0.4	5 / 10	0.2 / 0.4
Coliformes fecales NMP/100mL	10 / 20	10 / 20	10 / 20	10 / 20	10 / 20	10 / 20	10 / 20	10 / 20	10 / 20	10 / 20
Huevos de helminto (huevos por litro)	1000 / 2000	1000 / 2000	1000 / 2000	1000 / 2000	1000 / 2000	1000 / 2000	1000 / 2000	1000 / 2000	1000 / 2000	1000 / 2000
	–	–	–	–	–	–	–	–	1 ^{RNR} , 5 ^{RR}	–

⁽¹⁾ Instantáneo; ⁽²⁾ Muestra simple promedio ponderado; ⁽³⁾ Ausente según el método de prueba definido en la NMX-AA-006-SCFI-2010; (*) Medidos de manera total; – No especificado; NA= No es aplicable; PD= Promedio Diario; PM= Promedio Mensual; RR Riego restringido; RNR Riego no restringido; NMP/100 mL (Número más probable por 100 mL); (A), (B) y (C): Tipo de Cuerpo Receptor según la Ley Federal de Derechos

2.2.- Tratamiento de aguas residuales

2.2.1.- Etapas y objetivos del tratamiento de aguas residuales

El objetivo principal de las PTAR es la remoción de DBO, sólidos suspendidos, nutrientes (N y P), bacterias patógenas y toxicidad de las aguas residuales domésticas, agrícolas e industriales (Abdel-Raouf *et al.*, 2012). De manera general, según la CONAGUA (2007), el proceso de depuración consiste en:

1. Tratamientos de tipo fisicoquímico o primarios diseñados para remover sólidos sedimentables y en suspensión
2. Tratamientos de tipo biológico o secundarios encargados de la remoción de sólidos en estado coloidal que no sedimentan en los tratamientos primarios y de la estabilización de la materia orgánica (biodegradación) y nutrientes, en algunos casos
3. Tratamientos terciarios o avanzados diseñados para la remoción de contaminantes específicos que generalmente se encuentran en solución, tales como los metales y nutrientes (N y P) causantes de la eutrofización

La Figura 2.2 indica el esquema del tratamiento de aguas residuales considerando 4 procesos que consisten en los tratamientos: primario, secundario, de lodos y terciario.

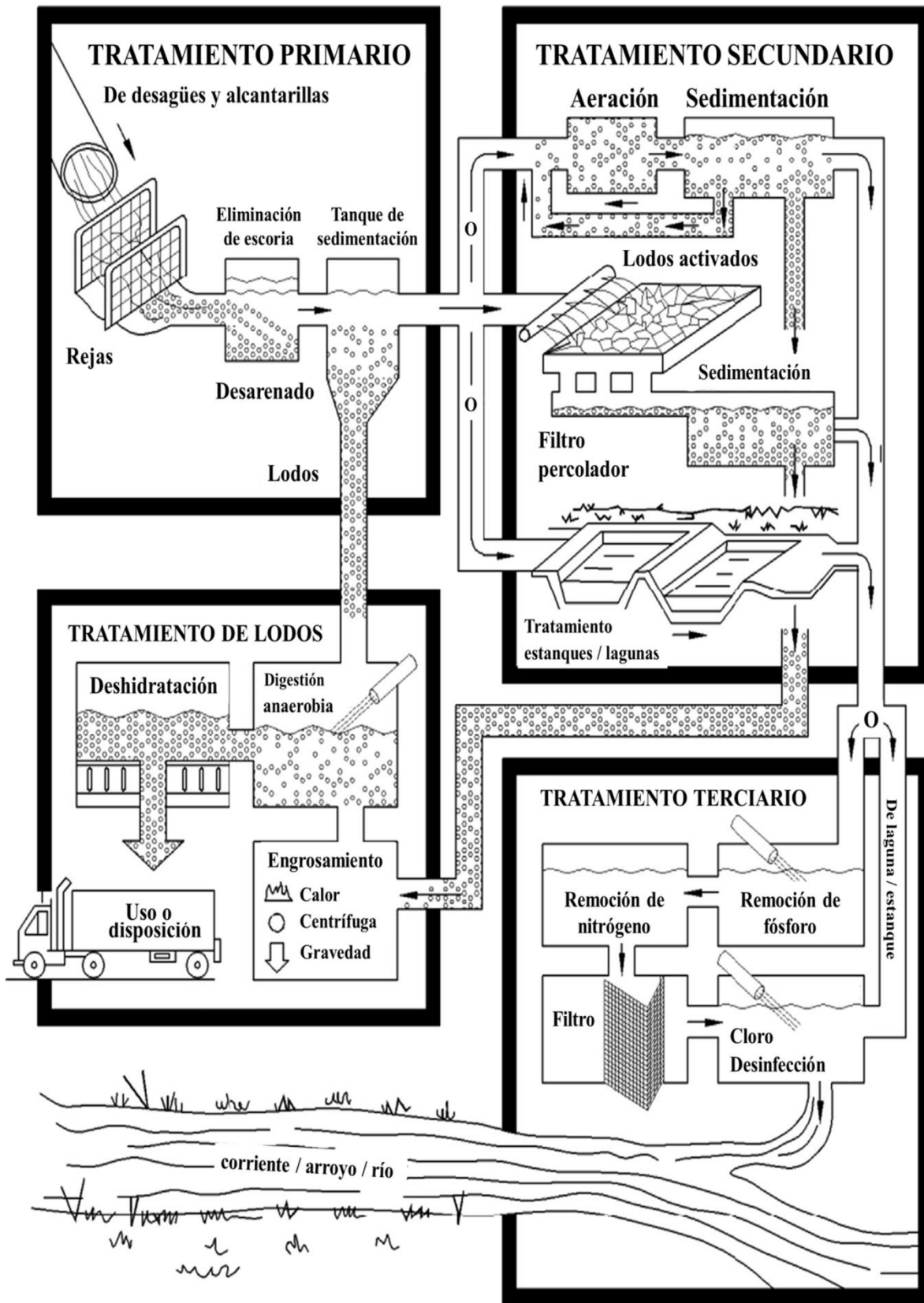


Figura 2.2.- Proceso típico de tratamiento de aguas residuales (Razzak et al., 2013)

2.2.2.- Uso de microalgas en el tratamiento para la eliminación de N y P

El tratamiento de aguas residuales con microalgas para la eliminación de N y P, fue propuesto en la década de los 1950's por Oswald y Gotaas (1957). Desde entonces se han realizado numerosos estudios en distintos tipos de residuos y procesos del cultivo de microalgas, en los cuales se ha obtenido una alta reducción de nitrógeno y fósforo bajo condiciones controladas o ambientales (Tabla 2.4).

Cabe destacar, que la eliminación de nutrientes (N y P) en el tratamiento terciario usualmente utiliza métodos que incluyen procesos aerobios y anaerobios, como la nitrificación y desnitrificación (Queiroz *et al.*, 2007; Renuka *et al.*, 2013) o precipitación química por la adición de sales de aluminio o hierro (Malhotra *et al.*, 1965; Barnard 1975, Wang *et al.*, 2006). Sin embargo, las desventajas de estos métodos convencionales son el alto costo económico y la producción de grandes cantidades de lodos que pueden requerir un tratamiento adicional (Gonçalves *et al.*, 2017). Por otro lado, el uso de cultivos de microalgas para el tratamiento terciario presenta ventajas ante los métodos convencionales como: a) la eliminación eficiente y simultánea del N y P (Pittman *et al.*, 2011; Rawat *et al.*, 2011), b) la recuperación de nutrientes durante la generación biomasa de la cual se podrían extraer productos de alto valor (De la Noüe *et al.*, 1992; Pittman *et al.*, 2011; Rawat *et al.*, 2011; Pires *et al.*, 2013) y c) la disminución de los costos totales del tratamiento al eliminar la necesidad de un tratamiento de lodos (Sriram y Seenivasan 2012; Bidart *et al.*, 2014; Mennaa *et al.*, 2015).

Tabla 2.4.- Eliminación de N y P por diversos géneros de microalgas y cianobacterias en procesos por lotes axénicos de diferentes flujos de residuos reales y sintéticos (adaptado de: Cai *et al.*, 2013)

Género y especie	Flujo de residuos	Tipo de proceso	Tiempo (d)	NT		PT	
				Valor inicial (mg/L)	Remoción (%)	Valor inicial (mg/L)	Remoción (%)
Categoría Chlorophyta							
<i>Chlorella</i> sp.	Abono digerido	Lote	21	100 – 240	76 – 83	15 – 30	63 – 75
*: la muestra fue diluida a concentraciones de 10, 15, 20 y 25% con posterior filtración (1.5 µm), no especifican condiciones de tratamiento (Wang <i>et al.</i> , 2010)							
<i>C. kessleri</i>	Medio sintético	Lote	3	168	8 – 19 ^b	10 – 12	8 – 20 ^c
*: temperatura regulada (30°C) a 300 rpm, con luz artificial a diferentes fotoperiodos (Lee y Lee 2001)							
<i>C. pyrenoidosa</i>	Agua residual agroindustrial	Lote alimentado	5	267	87 – 89	56	70
*: la muestra se ajustó a pH de 6.5 y se esterilizó en autoclave (121 °C/20 min), el tratamiento fué realizado en una incubadora con luz artificial 40.5 µmol m ⁻² s ⁻¹ con un fotoperiodo 14:10 y temperatura de 27 ± 1°C (Hongyang <i>et al.</i> , 2011)							
<i>C. sorokiniana</i>	Medio sintético esterilizado	Lote	10	–	–	22	45 – 72
*: temperatura regulada (26 ± 2°C), iluminación constante de 60 µmol m ⁻² s ⁻¹ y pH de 6.8 a 7.0 (Hernandez <i>et al.</i> , 2006)							
<i>C. vulgaris</i>	Medio sintético	Lote	1 – 10	13 – 410	23 – 100 ^a	5 – 8	46 – 94 ^c
*: aireación enriquecida con CO ₂ , pH de 6.5 a 7.0, iluminación continua a 4100 lux y temperatura de 20 ± 2°C (Aslan y Kapdan 2006)							
<i>C. vulgaris</i>	Agua residual agroindustrial	Lote	5 – 9	3 – 36	30 – 95 ^a	112	20 – 55
*: filtración a 0.45µm, esterilización (20min) y dilución 1:1 con agua dulce, temperatura de 20 ± 2°C e iluminación continua 60 µmol m ⁻² s ⁻¹ y aeración con difusión de burbujas (Gonzalez <i>et al.</i> , 1997)							
<i>C. vulgaris</i>	Agua residual municipal	Lote	2 – 10	48 – 1550	55 – 88	4 – 42	12 – 100
*: temperatura 25 ± 1°C, intensidad de luz 135 µE m ⁻² s ⁻¹ y aeración con burbujeo (Khan y Yoshida, 2008; Ruiz-Marin <i>et al.</i> , 2010)							
<i>C. reinhardtii</i>	Medio sintético	Lote	10 – 30	129	42 – 83 ^a	120	13 – 14 ^c
*: temperatura 25 ± 1 °C, aireación enriquecida con CO ₂ , iluminación continua 120 µmol m ⁻² s ⁻¹ (Kong <i>et al.</i> , 2010)							
<i>Scenedesmus</i> sp	Medio sintético	Lote	0.2 – 4.5	14 – 44	30 – 100 ^{a, b}	1.4 – 6.0	30 – 100 ^c
*: temperatura 20 ± 2°C intensidad luminosa 6500 ± 300 lux, fotoperiodo 13:11 L:O, agitación por burbujeo (Zhang <i>et al.</i> , 2008)							
<i>S. dimorphus</i>	Agua residual industrial	Lote	9	–	–	112	20 - 55
*: filtración a 0.45µm, esterilización (20 min) y dilución 1:1 con agua dulce, temperatura de 20 ± 2°C e iluminación continua 60 µmol m ⁻² s ⁻¹ y aeración con difusión de burbujas (Gonzalez <i>et al.</i> , 1997)							
<i>S. obliquus</i>	Agua residual municipal	Lote	0.2 – 8	27	79 – 100 ^a	12	47 – 98
*: inóculo hiperconcentrado, dilución 1:1 de agua residual con agua de mar estéril, bajo condiciones ambientales (Lavoie <i>et al.</i> , 1985; Ruiz-Marin <i>et al.</i> , 2010)							

– No especificado; * Condiciones experimentales en tratamiento previo del residuo y/o condiciones durante tratamiento: ^a Nitrógeno amoniacal, ^b Nitrato, ^c

Ortofosfatos totales; ‰ La décima parte de un porcentaje

Tabla 2.4.- Continuación

Género y especie	Flujo de residuos	Tipo de proceso	Tiempo (d)	NT		PT	
				Valor inicial (mg/L)	Remoción (%)	Valor inicial (mg/L)	Remoción (%)
Categoría Cyanobacteria							
<i>Arthrospira</i> sp.	Efluentes anaerobios porcinos	Semi-continuo	–	–	84 – 96 ^a	–	72 – 87 ^c
*: se evaluó una solución diluida con 2% (v/v) del efluente residual, con ajuste de pH inicial (8.8) y durante el tratamiento se controló el a pH de 9.5, bajo condiciones ambientales (Olguin <i>et al.</i> , 2003)							
<i>A. platensis</i>	Agua residual agroindustrial	Lote	15	2 – 3	96 – 100 ^a	18 – 21	87 – 99 ^c
*: condiciones controladas mantenimiento de pH 8, distintas suplementaciones de nutrientes (Phang <i>et al.</i> , 2000)							
<i>Oscillatoria</i> sp.	Agua residual municipal	Continuo	14	498	100	76	100
*: dilución 1:1 con agua marina estéril, bajo condiciones ambientales (Craggs <i>et al.</i> , 1997)							
Categoría Diatomea							
<i>P. tricornutum</i>	Agua residual municipal	Continuo	14	498 – 835	80 – 100	76 – 116	50 – 100
*: dilución 1:1 con agua marina estéril, bajo condiciones controladas (Craggs <i>et al.</i> , 1995, 1997)							
Categoría Haptophyta							
<i>I. galbana</i>	Medio sintético esterilizado	Lote	8	377	99	–	–
*: temperatura 20 ± 1°C, bajo distintas intensidades de iluminación continua, aireación de 4.5 L/min y salinidad a 33‰ (Valenzuela-Espinoza <i>et al.</i> , 1999)							

– No especificado; * Condiciones experimentales en tratamiento previo del residuo y/o condiciones durante tratamiento: ^a Nitrógeno amoniacal, ^b Nitrito, ^c

Ortofosfatos totales; ‰ La décima parte de un porcentaje

2.3.- Consideraciones en el cultivo de microalgas

2.3.1.- Asimilación de nutrientes con microalgas

Las microalgas consumen carbono en la forma de CO_2 que proviene de la atmósfera y de los carbonatos disociados (HCO_3^-) presentes en el medio acuoso (Wang *et al.*, 2008). Por otra parte la asimilación de nitrógeno incluye una reducción en dos fases para obtener NH_4^+ a nivel del cloroplasto, ocurriendo la generación de NO_2^- durante la reducción de NO_3^- a NH_4^+ , en la que una fracción de NO_2^- producida y no convertida a NH_4^+ se libera al medio acuoso (Burhenne y Tischner 2000; Wang *et al.*, 2010). Por otra parte, el fosfato es asimilado de las formas HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- para después ser incorporado dentro de componentes orgánicos a través del mecanismo de fosforilación, donde gran cantidad del fosfato es utilizado para la generación de adenosin trifosfato (ATP), derivado de adenosin difosfato (ADP), obteniendo así el abastecimiento de energía celular (Martínez *et al.*, 2000; Cai *et al.* 2013). El mecanismo de asimilación de nutrientes por microalgas utilizando efluentes secundarios municipales como fuente de C, N y P se presenta en la Figura 2.3.

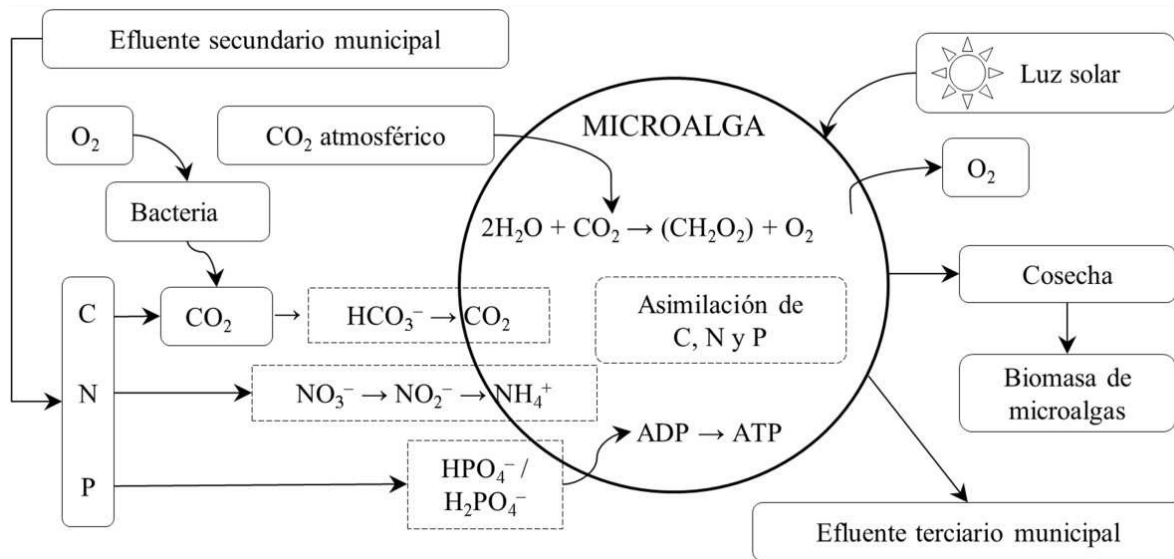


Figura 2.3.- Mecanismo de asimilación de C, N y P en efluentes secundarios municipales durante el cultivo de microalgas (adaptado de: Abinandan y Shanthakumar 2015)

2.3.2.- Incremento de pH por actividad fotosintética en el cultivo de microalgas

Es importante tener en cuenta que el aumento del pH durante el cultivo de microalgas puede ser causado por varios procesos asociados. Uno de ellos es la asimilación de CO₂ y el uso de NO₃⁻ como fuente inorgánica de nitrógeno debido a que el consumo de 1 mol de NO₃⁻ produce equivalentemente un mol de OH⁻ (Song *et al.*, 2011; Rashid *et al.*, 2014) dada la reacción siguiente:



Adicionalmente, al aumento del pH, por el consumo de NO₃⁻ por las microalgas, la asimilación de carbono inorgánico como HCO₃⁻ proporciona el CO₂ necesario para el crecimiento de microalgas, al mismo tiempo que se genera la acumulación de OH⁻ y el incremento gradual del pH (Martínez *et al.*, 2000), lo que explica en gran medida la alcalinización del pH, dada la siguiente reacción:



En concordancia al consumo de carbono e incremento de pH durante el cultivo de microalgas, reportes utilizando lagunas algales de alta tasa (HRPA, por sus siglas en inglés) indican valores de pH superiores a 11 causados por el agotamiento de CO₂ y HCO₃⁻ (Heubeck *et al.*, 2007; Park y Craggs 2010), que pueden contribuir al desplazamiento del equilibrio: CO₂/HCO₃⁻/CO₃²⁻ hacia la formación de CO₃²⁻ que predomina en valores de pH mayores a 10.5 (Martínez *et al.*, 2000; Markou y Georkakis, 2011),

2.3.3.- pH y su efecto en la disponibilidad de N y P en el cultivo de microalgas

Es importante indicar que la asimilación de nutrientes (N y P) por las microalgas también está regulada por factores externos como el pH. Por ejemplo, se ha demostrado que los valores de pH superiores a 9.3 tienen efectos de predominio de NH₃ sobre NH₄⁺, facilitando así la eliminación de NH₃ por aumento de pH mientras que la forma de NH₄⁺ no está disponible para la asimilación de microalgas (Markou y Georgakakis 2011; Craggs *et al.*, 2013) Figura 2.4.

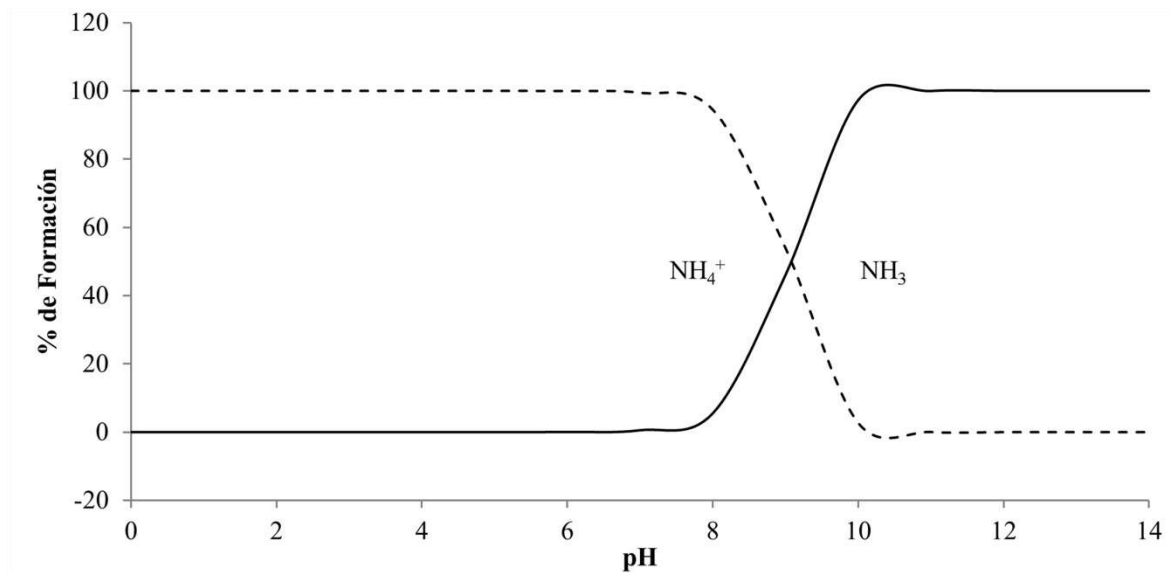


Figura 2.4.- Formación de especies $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ en función del pH (adaptado de: Markou y Georgakakis 2011)

Del mismo modo, el pH tiene un fuerte efecto sobre la biodisponibilidad de P, causando la precipitación de P con cationes (por ejemplo, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) a valores de pH de 9.0 y 11.0 pH (Heubeck *et al.*, 2007; Markou y Georgakakis 2011; Cai *et al.*, 2013) Figura 2.5.

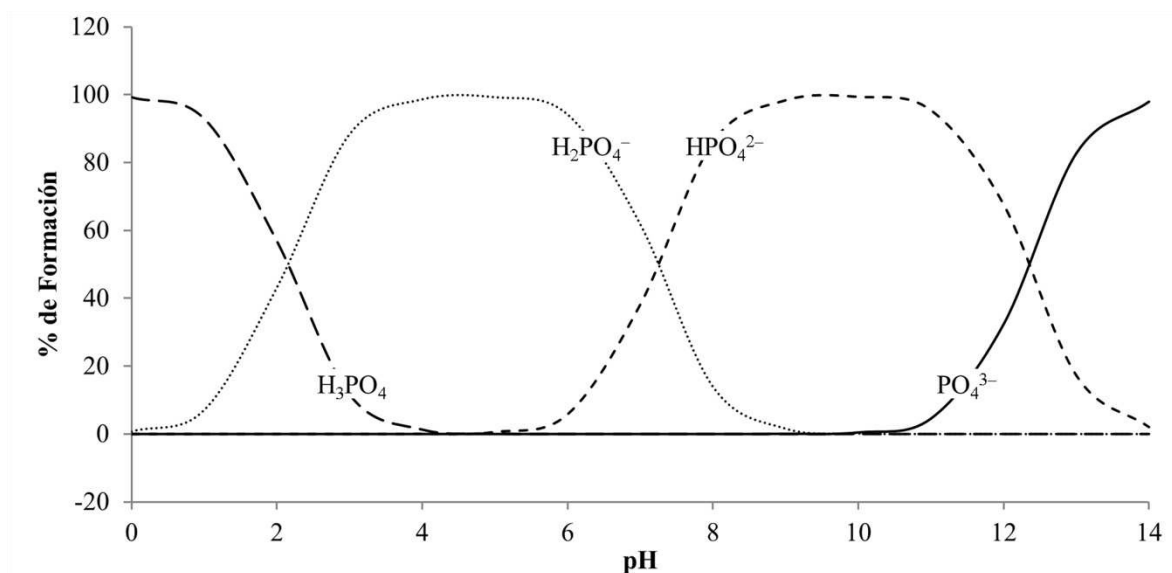


Figura 2.5.- Formación de especies de PO_4^{3-} en función del pH (adaptado de: Markou y Georgakakis 2011)

Cabe destacar que la volatilización del amonio y la precipitación del fosfato pueden reducirse mediante la adición de carbono (*e.g.* CO₂) y el efecto de amortiguación en el pH, sin embargo este amortiguamiento en el pH y disminución en la eliminación de N y P en el cultivo de microalgas con fines de proporcionar un tratamiento de agua puede ser compensado por el aumento de la producción de algas y la asimilación de nutrientes dentro de la biomasa (Park *et al.*, 2011). Por otra parte, el equilibrio de las especies de carbono: CO₂ disociado, bicarbonato (HCO₃⁻) y carbonato (CO₃²⁻) dependen principalmente del pH, (Figura 2.6). En el cual el HCO₃⁻ es la forma predominante de carbono inorgánico disuelto a pH 8, mientras que a valores superiores de pH de 10.5 las especies de CO₃²⁻ predominan (Markou y Georgakakis 2011).

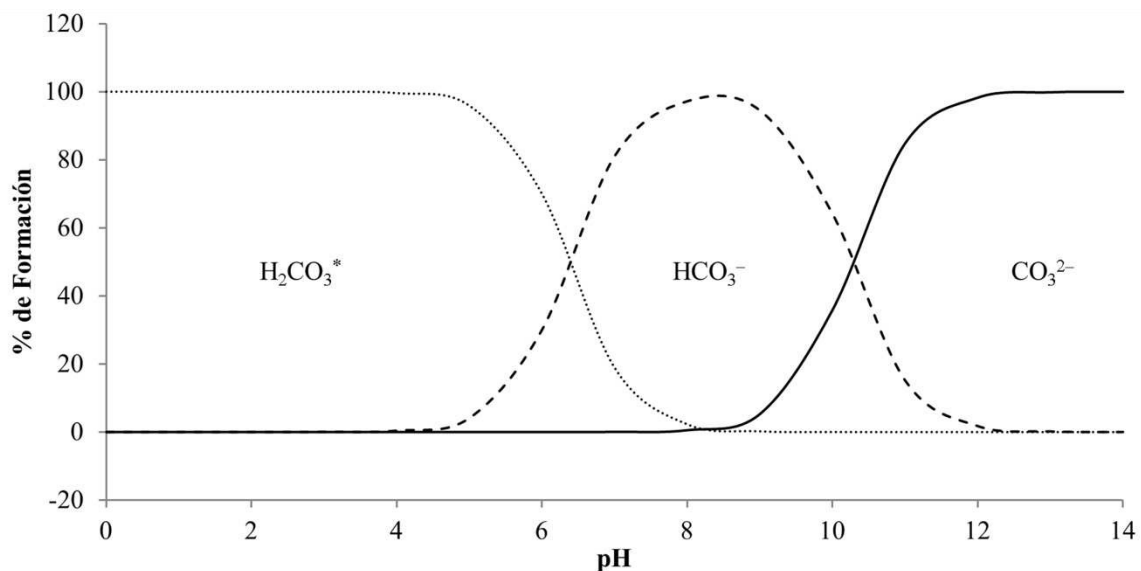


Figura 2.6.- Formación de especies de carbono inorgánico en función del pH (H₂CO₃^{*}, se refiere a CO₂ (aq) + H₂CO₃) (adaptado de: Markou y Georgakakis 2011)

2.3.4.- Sistemas de cultivo de microalgas y recuperación de biomasa de microalgas

El cultivo de microalgas puede realizarse en sistemas abiertos (estanques) o sistemas cerrados (fotobiorreactores). Ambos sistemas tienen ventajas y desventajas. La Tabla 2.5 ilustra las limitaciones en operación entre sistemas fotobiorreactores y abiertos. Por otra parte la Tabla 2.6, indica las principales limitaciones y desafíos que enfrenta la cosecha de microalgas, que ocasionan que no se haya definido tecnología eficiente y de bajo costo

(Henderson *et al.*, 2008; Rashid *et al.*, 2014). Que en suma impactan y generan costos aproximados en un intervalo que va del 20 al 30% del costo total de producción (Rashid *et al.*, 2014).

Tabla 2.5.- Comparación de cultivo de microalgas en fotobiorreactor y sistema abierto
(Rashid *et al.*, 2014)

Parámetro	Fotobiorreactor		Sistema abierto	
Contaminación	Menor	✓	Mayor	X
Mezclado	Alto	✓	Bajo	X
Costo capital	Alto	X	Bajo	✓
Área	Mínima	✓	Elevada	✓
Evaporación	Menor	–	Mayor	–
Intercambio gaseoso	Alto	✓	Bajo	X
Rendimiento de lípidos	Alto	✓	Bajo	X
Rendimiento de biomasa	Alto	✓	Bajo	X
Comercialización	Difícil	X	Fácil	✓
Cosecha	Alto	✓	Bajo	X
Proceso de optimización	Fácil	✓	Difícil	X

✓ Condición deseada; X Condición no deseada; – depende de los objetivos propuestos

Tabla 2.6.- Características que dificultan y generan altos costos en la recuperación de biomasa de microalgas (Rashid *et al.*, 2014)

Dificultades que limitan la recuperación de biomasa	
• Cultivo estable y diluido de microalgas	• Protocolo diferente para agua dulce y algas marinas
• Tamaño de células pequeñas	• No hay métodos simples aplicables a todos los tipos de cultivo de microalgas
• Diversidad de tamaño celular, forma y movilidad	• Baja eficiencia de cosecha
• Presencia de materia orgánica algogénica	• Dosis floculante alta
• Contaminación de biomasa cosechada por productos químicos	• Protocolo diferente para agua dulce y algas marinas
• Interferencia con la extracción de lípidos	• Alto consumo de energía

La Tabla 2.7 presenta un resumen de los posibles obstáculos, soluciones, intereses futuros, objetivos de investigación y desarrollo en la cosecha de microalgas.

Tabla 2.7.- Guía básica para cosechar microalgas (Rashid *et al.*, 2014)

Obstáculos técnicos en las técnicas de cosecha	Acción requerida
Floculación <ul style="list-style-type: none"> • Baja eficiencia de cosecha debido al pequeño tamaño celular • La técnica de cosecha depende de la cepa a cosechar • Menor eficiencia en especies marinas (debido a la alta salinidad) • Recuperación del floculante para la reducción de costos y purificación del agua • Aumento de la contaminación del ambiente por el uso excesivo de floculantes o aditivos 	Optimizar el método de floculación, manipular el pH y entender el impacto ambiental resultante
Filtración <ul style="list-style-type: none"> • La falta de disponibilidad de un material adecuado para el filtro • Se necesita un diseño optimizado para evitar la formación de torta en el proceso de filtración • Depende de la cepa de microalgas • Costoso 	Optimizar el diseño de filtración, el material del filtro y el concepto de vibración de filtros debe introducirse
Centrifugación <ul style="list-style-type: none"> • Alto costo capital 	Se deben introducir unidades comerciales de bajo costo
Sedimentación <ul style="list-style-type: none"> • Falta de un diseño adecuado 	Optimizar la recuperación de floculantes en los tanques de sedimentación con el diseño de un sistema de reciclaje de agua
Flotación de aire disuelto <ul style="list-style-type: none"> • No hay estudios significativos disponibles 	Establecer los estudios de línea de base, así como el diseño de ingeniería para determinar el tamaño de burbuja óptimo y su distribución en el cultivo
Electro flotación / coagulación / floculación <ul style="list-style-type: none"> • Sustitución periódica de electrodos • Escala de electrodos • Pocos estudios disponibles 	Diseñar una técnica eficaz para eliminar la escala de los electrodos
Auto-floculación <ul style="list-style-type: none"> • Capacidad limitada de las microalgas para la captación de CO₂, P y otros nutrientes • La correlación de pH, nutrientes y la captación de biomasa no se ha desarrollado hasta el momento 	Investigar la interacción de la absorción de nutrientes, cambio de pH y la disolución de oxígeno
Biofloculación <ul style="list-style-type: none"> • Desarrollo de la relación sinérgica entre bacterias y algas • No se dispone de análisis tecno-económicos 	Desarrollar una relación sinérgica entre bacterias y algas. Realizar análisis tecno-económico y comparar con otras técnicas de cosecha

Tabla 2.7.- (continuación)

Obstáculos técnicos en las técnicas de cosecha	Acción requerida
Sonicación <ul style="list-style-type: none">• No se dispone de muchos estudios	Se necesita de estudios extensos para explotar su efectividad
Manipulación metabólica <ul style="list-style-type: none">• Desarrollo de cepas de alta energía	Estudios para mejorar el contenido energético de las microalgas
Tendencias recientes <ul style="list-style-type: none">• En la actualidad, la alternativa de técnicas de recolección convencional, tales como: floculación, coagulación y sedimentación se están estudiando, debido a varios inconvenientes, como el alto costo involucrado en la: centrifugación, recuperación de sales, purificación de agua e ineficiencia de diseños en los tanques de sedimentación• Se está presentando particular interés en la flotación de aire disuelto (FAD), electroforesis, auto-floculación y biofloculación• La manipulación de la sonicación y la ingeniería metabólica son muy prometedoras para probar su eficacia en la recolección de microalgas	
Objetivos de investigación y desarrollo <ul style="list-style-type: none">• Reducir la energía y costo del proceso• Investigar la viabilidad de las técnicas recientes de recolección• Evaluar cada opción tecnológica en términos de coherencia global del sistema y sostenibilidad• Introducir técnicas nuevas de cosecha	

2.4.- Aprovechamiento y aplicaciones de la biomasa de microalgas

2.4.1.-Panorama de generación de productos de interés a partir de microalgas

La biomasa celular de las microalgas se ha reconocido como uno de los recursos biológicos de mayor importancia, a razón de que una gran cantidad de especies de microalgas presenta un alto valor nutricional, además de ser precursora potencial de una amplia variedad de bio-productos de alto valor económico, tales como: pigmentos, lípidos, compuestos bioactivos, algunos polisacáridos, biohidrógeno e incluso biopoliésteres con propiedades similares al plástico. Igualmente las microalgas en su composición contienen tres grupos de pigmentos (clorofilas, carotenoides y ficobilinas) esenciales para la captación de la luz y fijación del CO₂. Estos pigmentos presentan cualidades para tener un éxito de comercialización en su uso como “alimentos funcionales”, cosméticos, acuicultura, productos farmacéuticos o tecnología de los alimentos. Otra característica de relevancia es el alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados esenciales para el metabolismo humano, que sugieren su uso y comercialización, para la obtención de alimentos sanos así como su extracción y concentración de compuestos de alto valor económico en el campo farmacéutico y terapéutico, que igualmente mantienen una superioridad de rentabilidad económica en comparación a la obtención de biocombustibles. Finalmente, la biomasa posterior a la recuperación de productos se puede utilizar como forraje, materia prima de biogas o biofertilizante (Pulz y Gross, 2004; Mata *et al.*, 2010; Chu, 2012; Batista *et al.*, 2013; Koller *et al.*, 2014, Reyna *et al.*, 2014).

La Figura 2.7 presenta una visión esquemática de productos potenciales de microalgas, así como la aplicación final de estos productos.

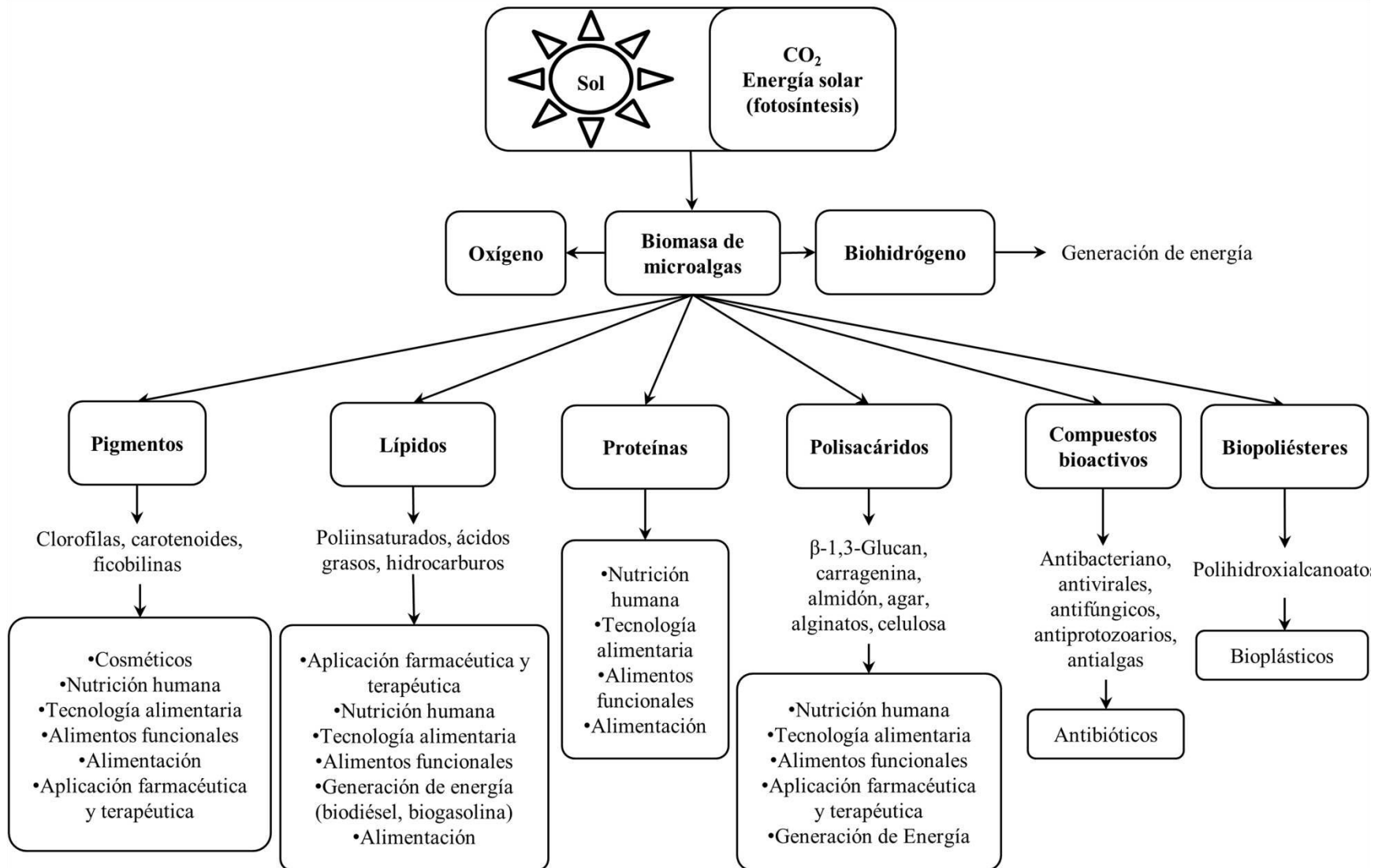


Figura 2.7.- Panorámica general de productos sintetizados y áreas de aplicación a partir de microalgas (Koller *et al.*, 2014)

2.4.2.-Situación comercial y económica de las microalgas

La comercialización de microalgas empezó como aditivo alimenticio en Japón al inicio de 1960 con un cultivo de *Chlorella* sp., la cual continuó durante las décadas de 1970 y 1980, expandiéndose mundialmente, principalmente a los Estados Unidos de América, India, Israel y Australia (Spolaore *et al.*, 2006; Borowitzka 1999). Los productos a base de microalgas son propiedad en su mayoría de empresas privadas. La Figura 2.8 muestra la distribución geográfica de las principales empresas que operan este sector.

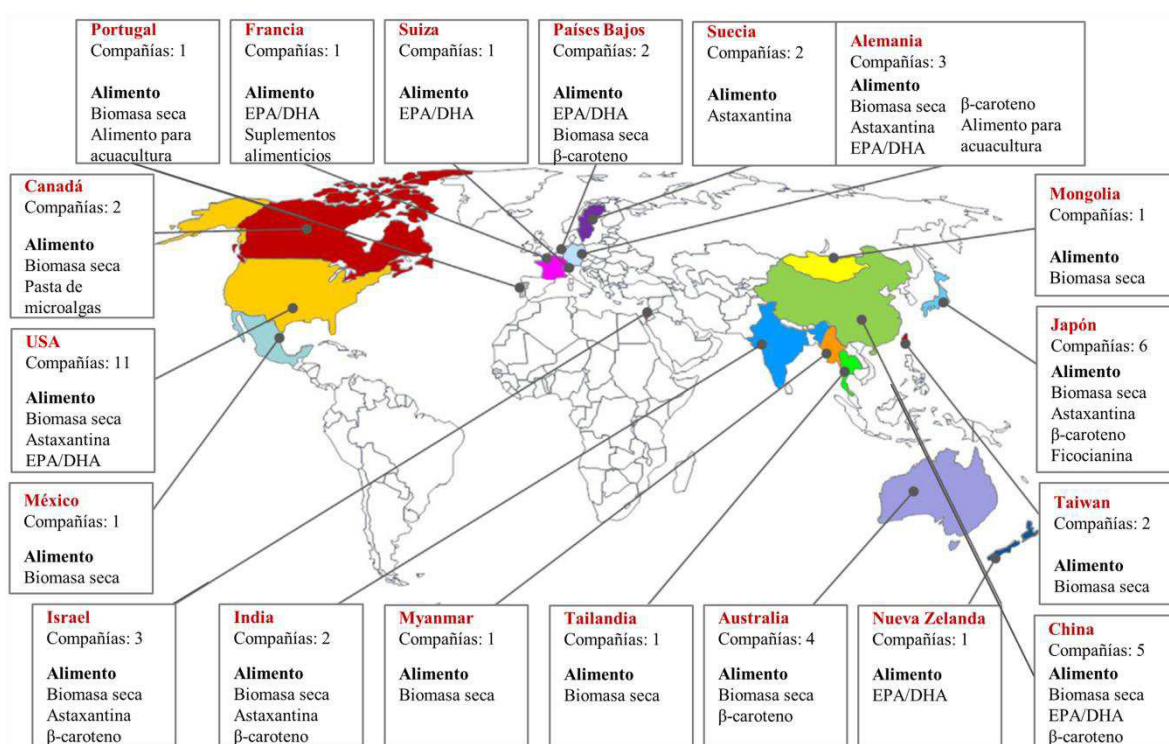


Figura 2.8.- Distribución mundial de empresas privadas que producen productos derivados de microalgas (Vigani *et al.*, 2015). Nota: el mapa se refiere a la sede de empresas

Por otro lado, el precio del mercado para la biomasa de microalgas y sus componentes, es función del área donde se encuentre el centro de producción, la situación real del mercado y la pureza del producto. Una característica que se debe tener en cuenta respecto a los productos que ofrecen los valores económicos más altos de comercialización, son los compuestos extraídos que representan un pequeño porcentaje del total en los que se

requiere un alto esfuerzo en aislamiento y purificación que contribuye considerablemente a los precios finales (Tabla 2.8).

Tabla 2.8.- Precios de mercado y el volumen del mercado mundial de productos de microalgas seleccionados (Koller *et al.*, 2014)

Producto	*Precio de mercado aproximado por Kg [USD-$\\$]	*Volumen global del mercado [USD-$\\$]
Biomasa para nutrientes	40 – 50	1.25×10^9
Biomasa para alimentación	10	4×10^9
Nutracéuticos de microalgas para la nutrición humana	120	7×10^7
β -caroteno	300 – 3000	2×10^8
Astaxantina	> 2000	2×10^8
Ficobiliproteínas	3000 – 25,000	5×10^7
β -1,3-glucan	5 – 20	1×10^8 (estimación para EE.UU.)
Ácido docosahexaenoico	50	1×10^8 (estimación de la República Popular China); 4×10^8 (estimación para EE.UU.)
Ácido eicosapentaenoico	4600 (cultivo puro de <i>Phaeodactylum tricorutum</i> , producto de alta pureza)	1.25×10^3 (estimación para Japón)
Biodiésel	**0.5 (precio general)	1×10^9

* Tipo de cambio periodo 2017- 10: Peso Mexicano – US Dólar (MXN-USD) \$ 18 MXN – 1 USD; ** La estimación de biodiesel a partir de microalgas es fuertemente fluctuante (3 – 4 [USD- $\$$] por Kg)

Capítulo 3

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1.- Hipótesis

A través del cultivo, resiembra en lotes sucesivos y eliminación de la fracción suspendida es posible acondicionar y semi-purificar un consorcio de microalgas nativas para mejorar la facilidad de cosecha, producción de biomasa y pulimento de efluentes secundarios provenientes de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Municipales.

3.2.- Objetivos

3.2.1.- Objetivo General

Acondicionar y semi-purificar un consorcio de microalgas nativas mediante su cultivo, resiembra en lotes sucesivos y eliminación de la fracción suspendida para la producción de biomasa de fácil cosecha y pulimento de efluentes secundarios provenientes de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Municipales.

3.2.2.- Objetivos Específicos

- i.* Propagar y acondicionar consorcios de microalgas nativas del Estado de Nuevo León, México bajo condiciones que favorecen la auto-floculación
- ii.* Evaluar y seleccionar consorcios de microalgas de acuerdo a su capacidad de floculación y producción de biomasa bajo condiciones que contribuyen a la cosecha por auto-floculación
- iii.* Acondicionar, semi-purificar y seleccionar un consorcio de microalgas en función de su capacidad de floculación y producción de biomasa durante su cultivo y resiembra en lotes sucesivos en ESPTAR
- iv.* Acondicionar, semi-purificar y cultivar en lotes consecutivos un consorcio de microalgas en ESPTAR bajo intemperie
- v.* Evaluar la capacidad de floculación y producción de biomasa de microalgas cultivada en lotes consecutivos con ESPTAR bajo intemperie
- vi.* Evaluar el pulimento en ESPTAR por el uso del cultivo de microalgas en lotes consecutivos bajo intemperie
- vii.* Evaluar el efecto del cultivo de microalgas sobre coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli*
- viii.* Caracterizar la composición fisicoquímica y valorizar parcialmente el uso potencial de la biomasa de microalgas producida en ESPTAR

Capítulo 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.- Área de trabajo

Para la elaboración del presente estudio se contó con la infraestructura del Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales (LICA), Laboratorio de Biotecnología (LB), Laboratorio de Alimentos, Medicamentos y Toxicología (LAMT), Laboratorio de Fotocatálisis y Electroquímica Ambiental (LAFEAM) y el Laboratorio de Instrumentación Analítica (LIA) de la Facultad de Ciencias Químicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). Además del área verde perteneciente a la red de riego de la UANL ubicada en las coordenadas geográficas latitud: 25.727185, longitud: -100.307480 e infraestructura proporcionada por el Área de Química y Fisicoquímica Ambiental del Departamento de Ciencias Básicas (CB) de la División de Ciencias Básicas e Ingeniería (CBI), perteneciente a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), Unidad Azcapotzalco, en la Ciudad de México.

4.2.- Disposición de residuos

Los residuos generados durante la realización del proyecto de investigación se dispusieron y clasificaron de acuerdo a las características de los mismos y a los reglamentos establecidos por la Facultad de Ciencias Químicas, UANL, por medio de los contenedores proporcionados por el Departamento de Medio Ambiente y Seguridad, mismo que se aseguró de llevar a cabo las labores pertinentes de almacenaje previo a la disposición final de los residuos: Colector A: residuos ácidos, Colector P: plástico, Colector V: vidrio, Cubeta verde: basura industrial (papel filtro, guantes, etcétera).

4.3.- Estrategia general del proyecto

A continuación se indica el planteamiento de la realización del proyecto y un diagrama de flujo como síntesis de las diferentes etapas y su interrelación (Figura 4.1).

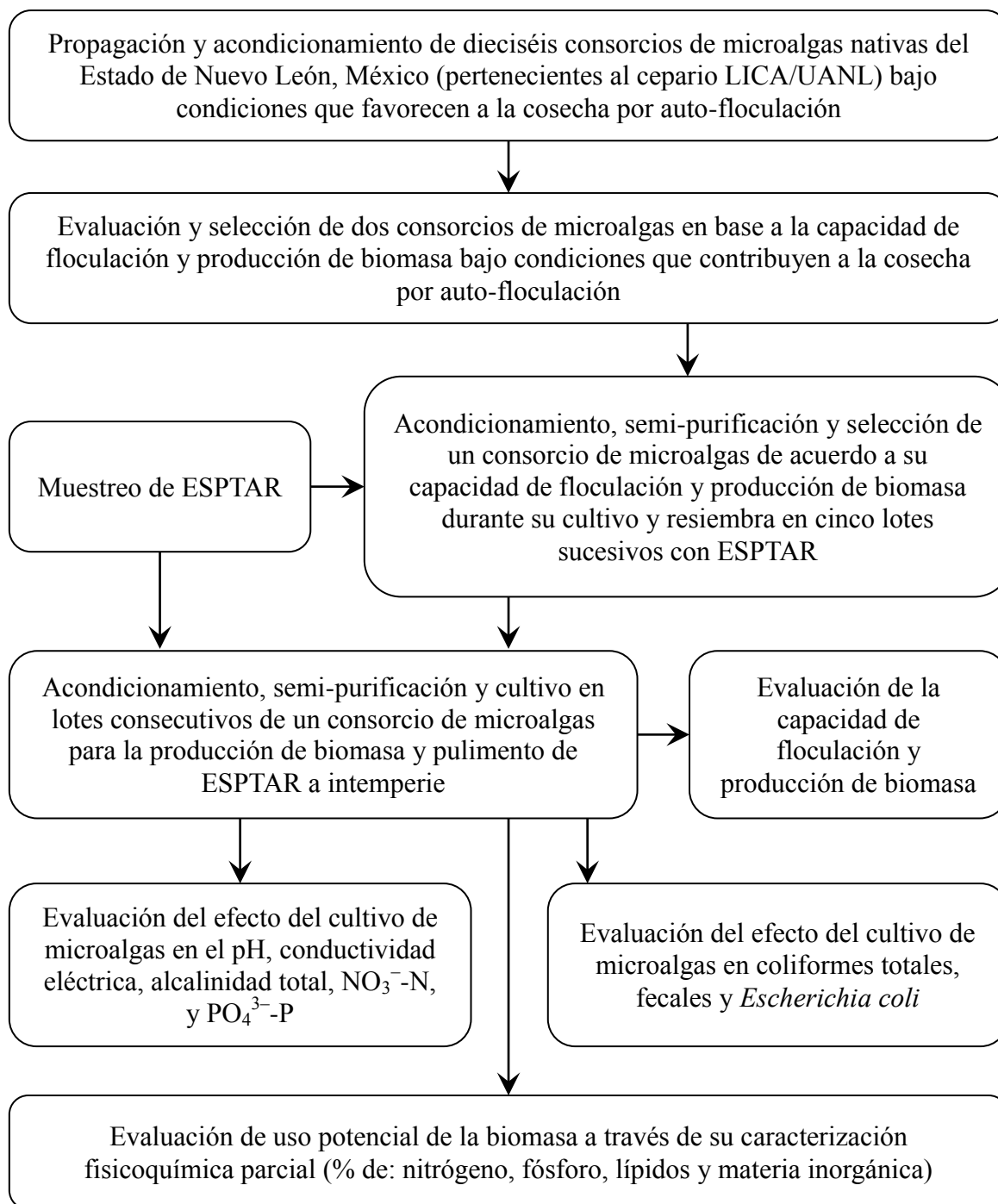


Figura 4.1.- Diagrama de flujo del procedimiento experimental general del proyecto

4.4.- Análisis de datos

Para los resultados experimentales de carbono inorgánico total, conductividad eléctrica, materia inorgánica (sección 4.7), alcalinidad total, NO_3^- -N, PO_4^{3-} -P (sección 4.10), concentración de biomasa y capacidad de floculación (sección 4.7 y 4.10) se efectuó un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA). En los casos que se presentaron diferencias significativas, se llevó a cabo una comparación múltiple de medias por el método de Tukey ($\alpha= 0.05$), utilizando el programa estadístico SPSS (versión 11.0 para Windows, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

4.5.- Consorcios de microalgas nativas y su propagación bajo condiciones que contribuyen a la auto-floculación

Dieciséis consorcios de microalgas nativas (01-16) pertenecientes a la Subcuenca Hidrológica de San Juan, del Estado de Nuevo León, fueron proporcionados por el laboratorio LICA perteneciente a la UANL. La propagación, acondicionamiento y pruebas de preselección de los consorcios de microalgas se realizó utilizando la solución nutritiva López-Chuken y Young (2010) la cual está compuesta de: KNO_3 5 mM, KH_2PO_4 1mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 mM, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 6.25 mM, H_3BO_3 46 μM , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 9.15 μM , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 765 nM, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 320 nM, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 15 nM, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y Na_2EDTA 20 μM . La tabla 4.1 indica la composición elemental de la solución nutritiva.

Tabla 4.1.- Composición elemental de la solución nutritiva LC (López-Chuken y Young 2010)

Elemento	mg/L	mM
Ca	250.48	6.25
N	245.67	17.54
K	234.59	6.00
S	64.81	2.02
Mg	48.61	2.00
P	30.98	1.00
C	2.37	0.20
Fe	1.12	0.02
Na	0.91	0.04
Cl	0.65	0.02
Mn	0.50	0.01
B	0.50	0.05
Zn	0.05	7.65×10^{-4}
Cu	0.02	3.20×10^{-4}
Mo	0.01	1.08×10^{-4}

La propagación de los cultivos de los consorcios de microalgas se realizó en una réplica utilizando dieciséis fotobiorreactores cilíndricos (capacidad 1 L, diámetro interior de 10 cm y altura de 14 cm) de material plástico translúcido. Para proporcionar CO₂ atmosférico y una agitación suave, los fotobiorreactores se airearon continuamente desde la base a 0.5 VVM (volumen de aire por volumen de líquido por minuto), utilizando aire previamente filtrado a 0.45 µm (Millipore Millex-HV). La Tabla 4.2 señala las condiciones de la propagación del cultivo de microalgas.

Tabla 4.2.- Condiciones de propagación de los consorcios de microalgas

Características de operación de los cultivos de microalgas en propagación
<ul style="list-style-type: none"> • Fotoperiodo: 24:0 Luz:Oscuridad • Flujo luminoso promedio: 5600 lux • Volumen de medio: 700 mL • Inóculo: 10 – 30 mL concentración variable • Fertilización: 30 mL de solución nutritiva LC cada 15 días • Mantenimiento de volumen por pérdidas de evaporación: con agua desionizada • Cosecha de biomasa: cada 30 días

Es importante señalar que las condiciones de propagación en este estudio posibilitan la inducción a la auto-floculación de los consorcios de microalgas nativas. Debido a

características tales como el uso de sales de nitrato como fuente de nitrógeno, bajo suministro de carbono que favorece el aumento gradual del pH (> 9) durante la actividad fotosintética de las microalgas y el contenido de sales de calcio, magnesio y fósforo presentes en la solución nutritiva LC.

4.6.- Metodologías para la determinación de la concentración de biomasa y capacidad de floculación en microalgas

Las metodologías utilizadas para la determinación de la concentración de biomasa y capacidad de floculación de las microalgas utilizadas en el desarrollo del presente proyecto se describen a continuación. La cuantificación de la biomasa de microalgas se realizó en peso seco utilizando una estufa de convección Quincy Lab. Inc. 40GL. El procedimiento constó en la toma de un volumen de 15mL y su filtración en filtros de vidrio Whatman GF/F previamente llevados a peso constante por 48h a 70°C. El peso seco se calculó mediante la diferencia del peso inicial del filtro y el peso final (peso de filtro y células retenidas) posterior a la filtración y secado a 48h a 70°C. La metodología para la determinación de la capacidad de floculación consistió en: dejar los cultivos en estado estático (según el tiempo requerido en la prueba) para posteriormente tomar una alícuota de 15 mL a 2/3 de la profundidad del fotobiorreactor utilizado, para después ser filtrada y llevada a peso constante (Whatman GF/C, 48h/70°C). El porcentaje de la capacidad de floculación se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de capacidad de floculación} = 100\% - \left(\frac{A \times 100\%}{B} \right)$$

Donde A es el peso en g (BS)/L de la biomasa de microalgas suspendida después del tiempo de reposo (*i.e.* estado estático del cultivo), B es el 100% de la biomasa de microalgas suspendida en g (BS)/L.

4.7.- Evaluación y selección de consorcios de microalgas con base en la capacidad de floculación y producción de biomasa cultivada en condiciones que contribuyen a la auto-floculación

Inicialmente se procedió a estandarizar la concentración de inóculo de 16 consorcios de microalgas proporcionados por el cepario del LICA de la UANL. La estandarización consistió en calcular la concentración de densidad celular en peso seco (Whatman GF/C, 48h/70°C), para posteriormente ajustar e inocular biomasa húmeda a una concentración equivalente a 0.002% (peso BS por volumen, equivalentes a 0.02 g (BS)/L) en un volumen de 700mL de solución nutritiva LC. El experimento se llevó a cabo en cultivos en lote (una réplica) durante 30 días empleando las condiciones de operación previamente utilizadas durante la propagación de consorcios Figura 4.2 (sección 4.5). Asimismo, la pérdida de volumen por evaporación se compensó diariamente mediante la adición de agua desionizada. La temperatura promedio fue de $30.9 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ medida a través de un termómetro AVALY VA-EDT-1H.

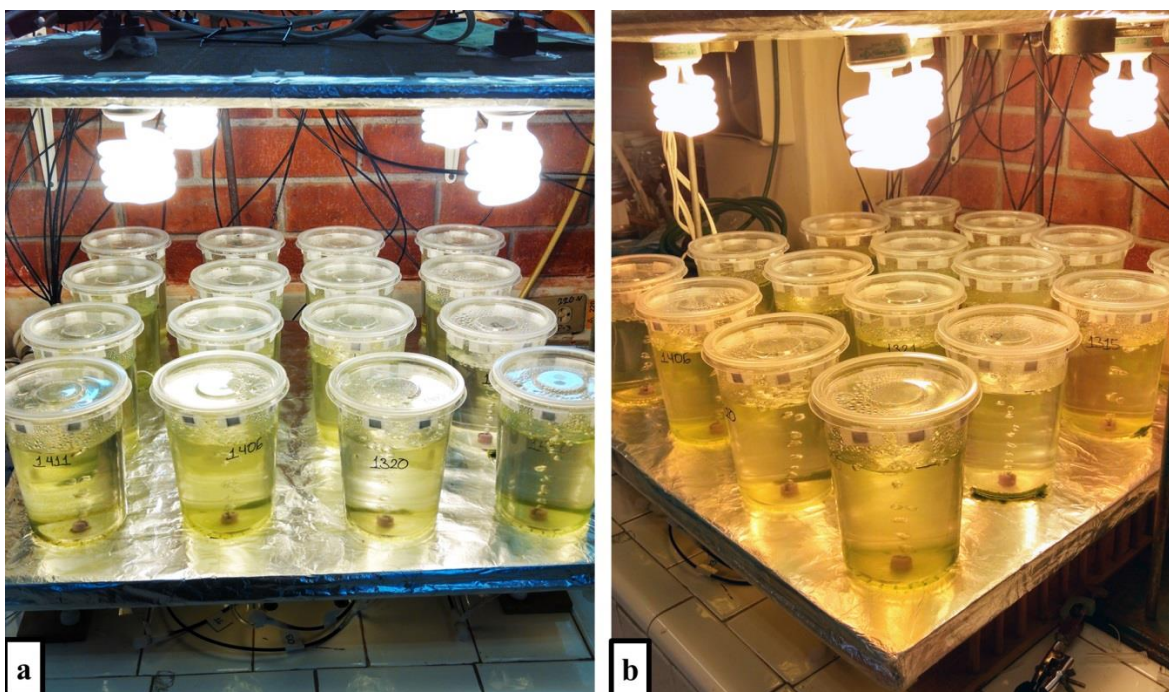


Figura 4.2.- Cultivo de consorcios de microalgas en solución nutritiva LC. a) Vista frontal. b) Vista lateral

Con el fin de evaluar y seleccionar 2 consorcios de microalgas bajo los criterios de capacidad de floculación y producción de biomasa, se evaluó el % de capacidad de floculación a 60 minutos de reposo durante los días 10, 20 y 30 del cultivo, además del contenido de biomasa g (BS) / L (Whatman GF/C, 48h/70°C) medido intermitentemente (días: 5, 10, 15, 20, 25 y 30). Asimismo, se monitorearon los siguientes parámetros: pH (AOAC 1997, método 973.41), medido diariamente durante 30 días, conductividad eléctrica (CE) (AOAC 1997, método 973.40) y carbono inorgánico (CI) medidos al inicio (día 0) y al término del cultivo (día 30). Por otra parte, considerando que las microalgas tienen el potencial de recuperar compuestos inorgánicos de la solución nutritiva LC (*e.g.* calcio, magnesio y fósforo) que participan en el proceso de auto-floculación, se analizó la biomasa seca de microalgas para determinar el % de materia inorgánica (cenizas) (AOAC 1997, método 942.05).

4.8.- Muestreo de ESPTAR

Se contó con la autorización y colaboración de la UANL para la recolección de ESPTAR de acuerdo a la NMX-AA-003-1980. El muestreo se realizó en la cisterna perteneciente a la interconexión de la red de agua tratada de Servicios de Agua y Drenaje de Monterrey I.P.D. a la red de riego de la UANL ubicada en las coordenadas geográficas latitud: 25.727185, longitud: -100.307480 Figura 4.3.

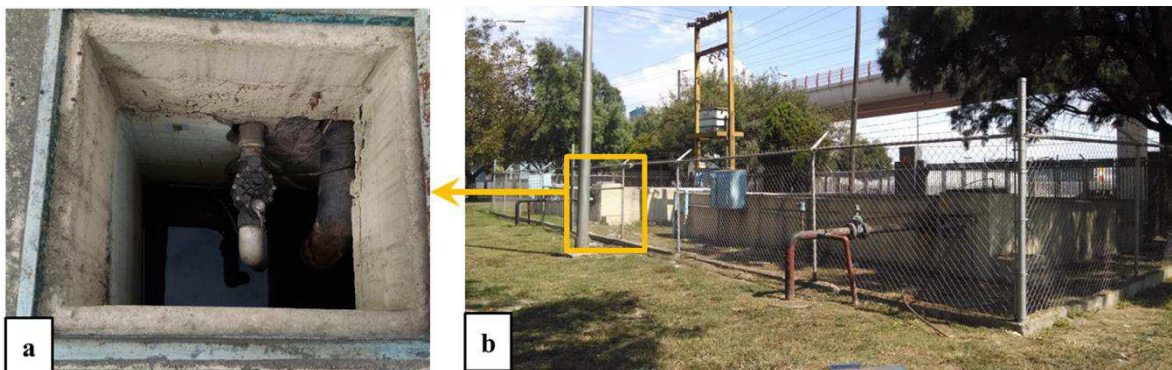


Figura 4.3.- Cisterna perteneciente a la red de riego de ESPTAR de la UANL. a) Lugar de muestreo. b) Vista general de la cisterna de la UANL

Asimismo, reportes oficiales avalan que los ESPTAR cumplen con la NOM-001-SEMARNAT-1996 al momento de su descarga, tal como lo señala la Tabla 4.3 que muestra los parámetros y resultados en la calidad de descarga de efluentes secundarios de la PTAR de “Dulces Nombres” del Estado de Nuevo León, México. De igual forma, la Tabla 4.4 presenta las características fisicoquímicas de ESPTAR del Estado de Nuevo León previo a su descarga.

Tabla 4.3.- Resultados promedio del año 2011 a 2012 de la calidad de descarga de ESPTAR “Dulces Nombres” del Estado de Nuevo León, México

Parámetros de calidad	Valores de diseño		Resultados
	LMMI *	Promedio mensual	Promedio anual
pH	6 – 9	–	7.1
DBO	60	30	15
DQO	–	–	81
SST	60	30	54
SSV	–	–	43
NH ₃ - N	10	2	5.4
N-orgánico	10	5	4.4
PO ₄ ³⁻ -P	–	–	1.8
Grasas y aceites	20	10	5.0
Coliformes totales	10000	1000	361

Todos los valores están expresados en mg/L excepto unidades de pH y coliformes totales (NMP/100 mL);

– No especificado; * LMMI Límite máximo para muestras individuales; N-orgánico= Nitrógeno orgánico;

SSV= Sólidos suspendidos volátiles

Tabla 4.4.- Composición fisicoquímica de ESPTAR del Estado de Nuevo León
(Beltrán-Rocha 2014)

Parámetro	Concentración
pH	7.23 ± 0.01
CE	133.30 ± 0.20
Carbono orgánico total	18.28 ± 0.22
NT	17.33 ± 0.83
N-orgánico*	3.67
NO ₂ ⁻ -N	0.03 ± 0.00
NO ₃ ⁻ -N	13.40 ± 0.07
NH ₄ ⁺ -N	0.23 ± 0.02
PO ₄ ³⁻ -P	2.29 ± 0.03
Na ⁺	330.43 ± 0.73
K ⁺	32.46 ± 0.09
Ca ²⁺	104.46 ± 0.61
Mg ²⁺	21.01 ± 0.03
Fe ²⁺ /Fe ³⁺	4.53 ± 0.001

Todos los valores están expresados en mg/L excepto unidades de pH y CE (mS/m); * Calculado indirectamente (NT– (NO₂⁻-N + NO₃⁻-N + NH₄⁺-N))

4.9.- Evaluación de la capacidad de floculación y producción de biomasa durante el acondicionamiento, semi-purificación y selección de un consorcio de microalgas cultivado en lotes sucesivos de ESPTAR

Con la finalidad de acondicionar, semi-purificar y seleccionar un consorcio de microalgas de fácil cosecha para la producción de biomasa y recuperación de nutrientes en ESPTAR. Se efectuó una serie de 5 cultivos consecutivos en lote con un tiempo de residencia de 2 días por lote. Al término de cada lote se llevó a cabo un recambio total de ESPTAR y se procedió a re-inocular la fracción de biomasa recuperada y sedimentada tras 15 minutos de reposo con el fin de eliminar las microalgas suspendidas (*i.e.* la fracción del consorcio que no sedimenta). La preparación del inóculo consistió en determinar la concentración de biomasa en peso seco (Whatman GF/C, 48h/70°C) de los consorcios 09 y 10 (previamente seleccionados sección 4.7), para posteriormente elaborar un ajuste a 0.05% (peso BS por volumen, equivalentes a 0.5g (BS)/L) en un volumen de 1L de ESPTAR (1 replica). Los parámetros aplicados al término de cada lote (2 días) fueron la determinación de la capacidad de floculación a 15 minutos de reposo y concentración de biomasa (g BS / L).La

temperatura promedio para 10 días de cultivo (5 cultivos en lote de 2 días) medida con un termómetro AVALY VA-EDT-1H fue de 22.7 ± 2.1 °C. Las condiciones de operación del cultivo consistieron en el uso de un fotobiorreactor construido con una botella PET con capacidad de 1.5 L (Figura 4.4), con aireación a 0.5 VVM (aire estéril previamente filtrado a $0.45 \mu\text{m}$ Millipore Millex-HV) e iluminación led a 4800 lux empleando un fotoperiodo de 16:8 L:O, esto con el fin de aclimatar las microalgas a un subsecuente cultivo a intemperie.

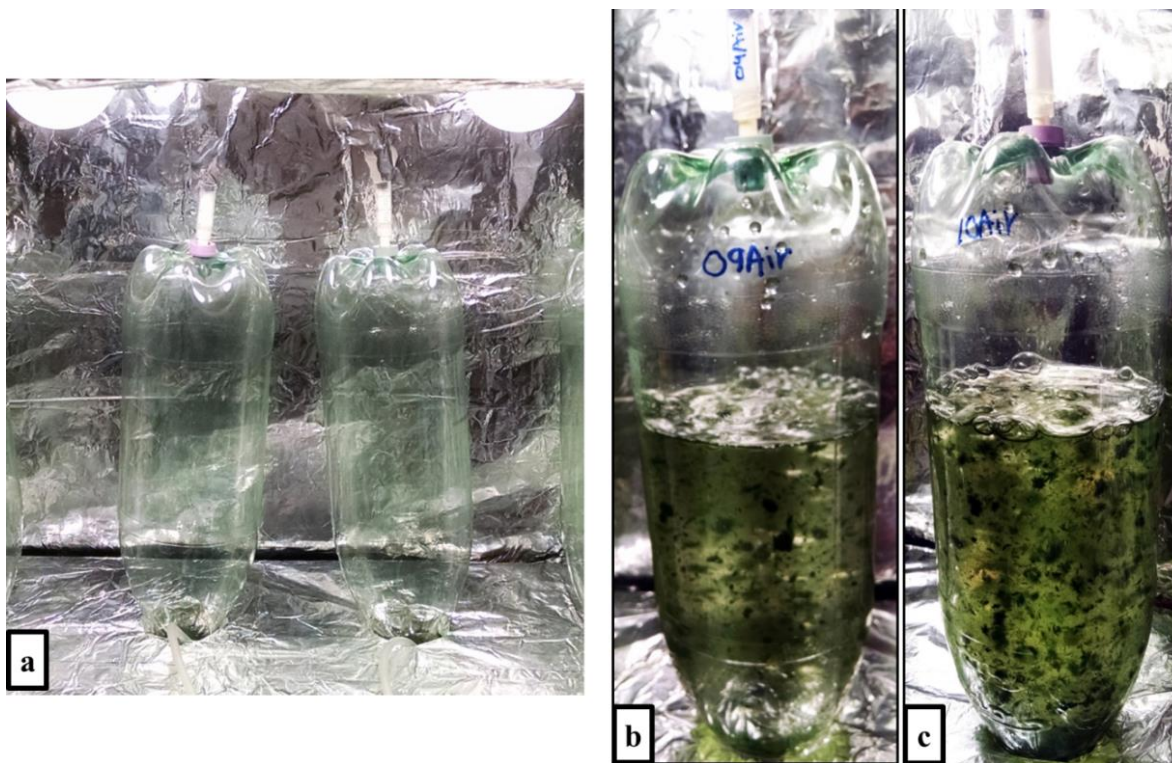


Figura 4.4.- Montaje del cultivo de microalgas en ESPTAR. a) Fotobiorreactores. b) Cultivo del consorcio de microalgas 9. c) Cultivo del consorcio de microalgas 10

4.10.- Evaluación del pulimento de ESPTAR y producción de biomasa de fácil cosecha durante el acondicionamiento, semi-purificación y cultivo en lotes consecutivos de un consorcio de microalgas

La evaluación del acondicionamiento en ESPTAR y semi-purificación del consorcio de microalgas 10 el cual fue seleccionado en la sección 4.9, se llevó a cabo realizando 3 lotes consecutivos de cultivo durante un periodo de 5 días por lote (*i.e.* un tiempo de 15 días de

experimentación) bajo condiciones de intemperie. Al término de cada lote (1, 2 y 3) se midió la capacidad de floculación a 15 minutos de reposo y se recambió el contenido total del ESPTAR, esto con el fin de eliminar la fracción de microalgas suspendidas pertenecientes al consorcio y acondicionar el inóculo (*i.e.* la fracción sedimentada) bajo condiciones no controladas de cultivo (*e.g.* intensidad de luz, fotoperiodo y temperatura) y uso de ESPTAR como fuente de nutrientes hacia una mejor capacidad de floculación, recuperación de nutrientes y generación de biomasa durante su resiembra en los lotes 2 y 3 de cultivo. Para el cultivo y resiembra del consorcio de microalgas 10 en los lotes 2 y 3 se utilizaron 3 reactores cónicos marca Fast Ferment (con capacidad de 30 L) acoplados a líneas independientes de aireación a 2.5 L / minuto en un volumen de 25 L de ESPTAR (dando una equivalencia de aireación de: 0.1 VVM) Figura 4.5.



Figura 4.5.- Cultivo de consorcios de microalgas en ESPTAR. a) Vista panorámica del sistema de cultivo. b) Conjunto de reactores fast ferment

La cuantificación de la biomasa de microalgas para la preparación del inóculo, así como la determinación de la producción de biomasa (lotes 1, 2 y 3) se realizó a partir del peso seco

(AOAC 1997, método 930.15). En la cual al inicio de cada lote se llevó a cabo un ajuste de inóculo a 0.01% (peso BS por volumen, equivalente a 0.1g (BS)/L). Asimismo, es de importancia mencionar que la duración de 5 días en el cultivo de microalgas (por cada lote) fue con el objetivo de asegurar el aumento de pH (>9) a través de la actividad fotosintética de las microalgas, misma que indirectamente favorece el proceso de auto-floculación de las microalgas, precipitación de fosfatos y volatilización de amonio. Las horas de luz diaria promedio durante los cultivos fue de 11.5 ± 0.1 h (obtenido de los registros reportados por el Sistema Integral de Monitoreo Ambiental (SIMA)), por otra parte la temperatura promedio (termómetro Avaly VA-EDT-1H) se encontró en un valor de: $23.7 \pm 9.6^\circ\text{C}$ Figura 4.6.

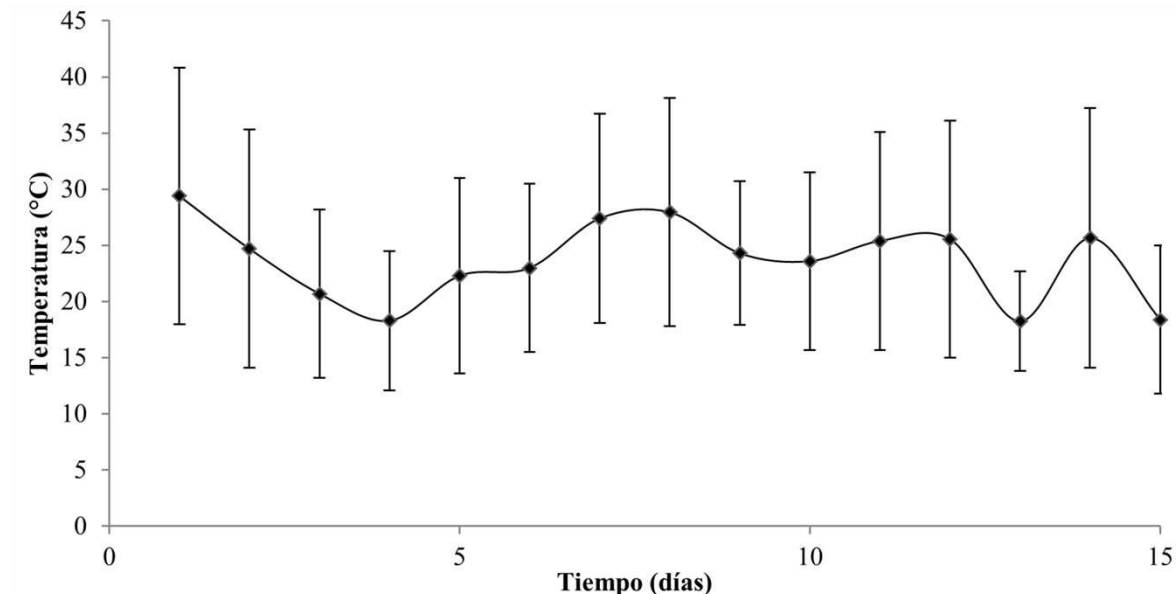


Figura 4.6.- Temperatura ambiental durante el cultivo del consorcio de microalgas 10 a intemperie

Los parámetros aplicados en los ESPTAR durante el cultivo por lote del consorcio de microalgas 10 se muestran en la Tabla 4.5. Para determinar el % de reducción en los distintos parámetros, se utilizó la siguiente fórmula: $((C_0 - C) / C_0) \times 100$; donde C_0 es la concentración inicial y C es la concentración después del cultivo de microalgas.

Tabla 4.5.- Parámetros en el cultivo de microalgas en lote utilizando ESPTAR bajo condiciones a intemperie

Parámetro	Método utilizado	Frecuencia
pH	AOAC 1997, método 973.41	Diario
CE	AOAC 1997, método 973.40	Diario
Alcalinidad total	NMX-AA-036-SCFI-2001	Inicial/final
NO ₃ ⁻ -N	Método de salicilato (Monteiro <i>et al.</i> , 2003)	Inicial/final
PO ₄ ³⁻ -P	NMX-AA-029-SCFI-2001	Inicial/final
Coliformes totales	NOM-113-SSA1-1994. Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable	Inicial/final
Coliformes fecales y <i>E. coli</i>	AOAC 2000, método 966.24. Determinación de coliformes fecales y <i>Escherichia coli</i>	Inicial/final

La biomasa de microalgas cosechada al término de cada lote se secó a 70°C durante 48h utilizando una estufa de convección (Quincy Lab. Inc. 40GL). Posteriormente, la biomasa de microalgas cosechada perteneciente al lote 3 fue caracterizada utilizando los métodos indicados en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6.- Análisis fisicoquímico realizados en la biomasa de microalgas cosechada

Análisis	Método
Peso seco (humedad)	AOAC 1997, método 930.15
Nitrógeno total Kjeldahl	AOAC 1997, método 984.13
Materia inorgánica (cenizas)	AOAC 1997, método 942.05
Lípidos totales	Bligh y Dyer 1959
Fósforo total	AOAC 1997, método 965.17

Capítulo 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1.- Evaluación y selección de consorcios de microalgas durante su cultivo en condiciones que contribuyen a la auto-floculación

5.1.1.- Selección de consorcios de microalgas en base a su capacidad de floculación y producción de biomasa

Generalmente, la adecuada selección de especies de microalgas es un paso crítico que define un rendimiento efectivo en la producción de biomasa (Mata *et al.*, 2010; Razzak *et al.*, 2013). Por otra parte, también es importante evaluar la capacidad de las especies de microalgas para interactuar como consorcios (Eldridge *et al.*, 2012) y el efecto de las características de la solución nutritiva (*e.g.* pH, disponibilidad de carbono, calcio, magnesio y fósforo) (Sukenik y Shelef 1984; Becker 2004; Pittman *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2014) en la auto-floculación inducida vía química, la cual podría representar una estrategia con alto potencial en la pre-concentración y cosecha de biomasa, debido a que mejoraría la rentabilidad en el cultivo a gran escala de microalgas (Brennan y Owende 2010). Los resultados del presente estudio a 30 días de cultivo indicaron una producción de biomasa de 1.42 ± 0.03 a 4.37 ± 0.10 g (BS) / L (Figura 5.1) y una notable capacidad de floculación con 81.2 ± 0.8 a 99.5 ± 0.03 % (Figura 5.2) situándose dentro del rango obtenido reportado en el uso de floculantes inorgánicos para la cosecha de microalgas (60 a 100 %) (Wan *et al.*, 2015). Por otra parte, cabe destacar que dentro de los consorcios de microalgas evaluados (1-16), los consorcios 9 y 10 sobresalieron en la producción de biomasa con 4.37 ± 0.10 y 4.19 ± 0.09 g (BS) / L respectivamente (Figura 5.1) siendo seleccionados para su estudio y cultivo en ESPTAR.

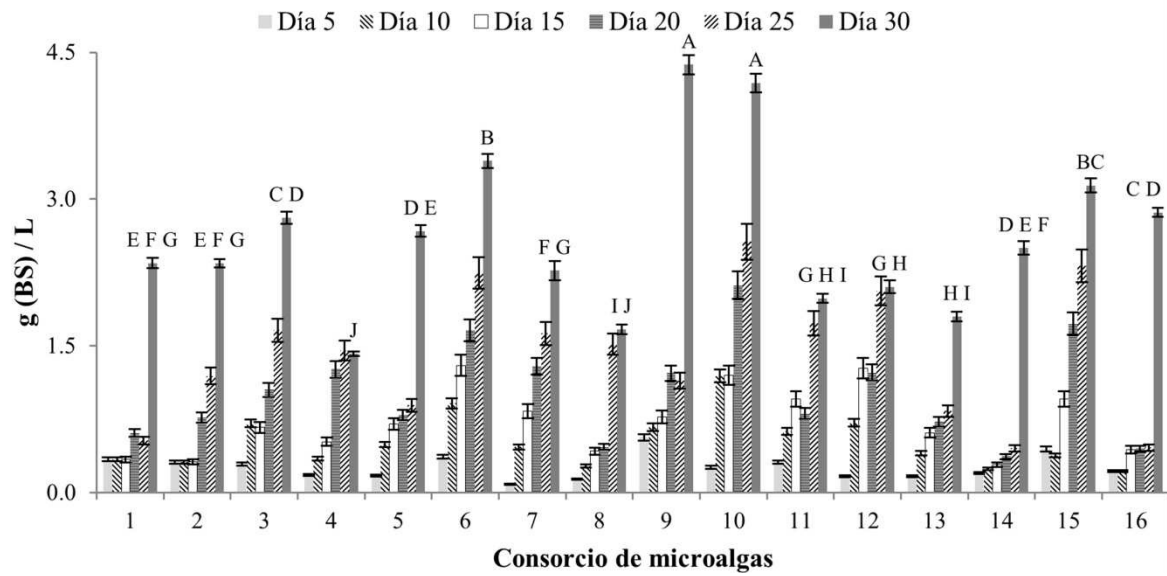


Figura 5.1.- Concentración de biomasa (g (BS) / L) de los 16 consorcios de microalgas cultivados en solución nutritiva LC durante los días: 5, 10, 15, 20, 25 y 30. Promedio (n = 3) ± EE. ANOVA de una sola vía. Diferentes letras indican diferencia significativa (Tukey, $\alpha = 0.05$) entre consorcios a 30 días de cultivo

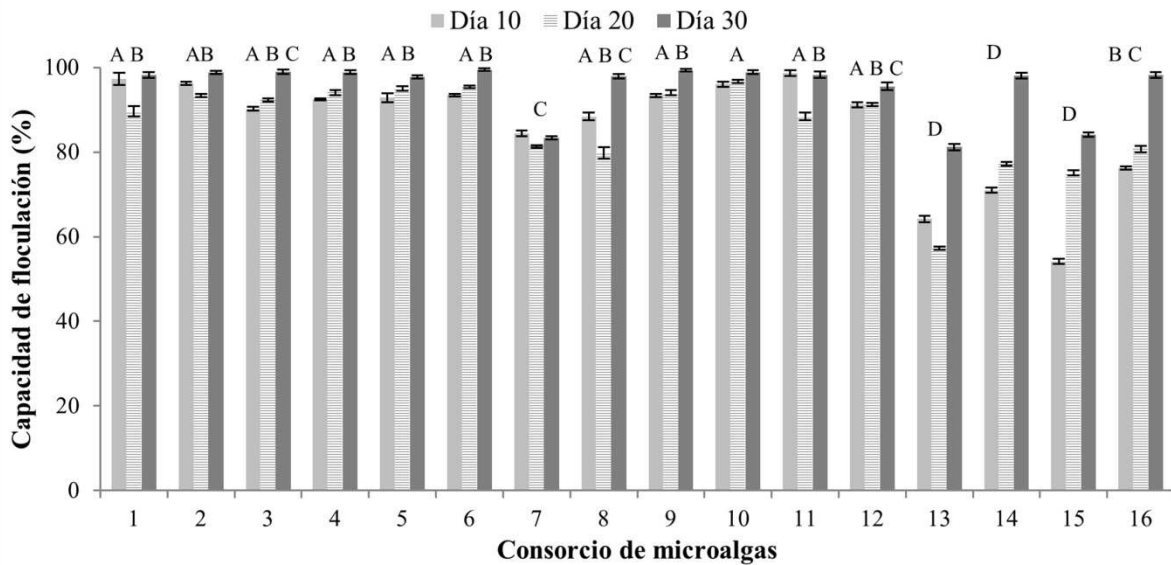


Figura 5.2.- Capacidad de floculación (%) a 10, 20 y 30 días de los 16 consorcios de microalgas cultivados en solución nutritiva LC. Promedio (n = 3) ± EE. ANOVA de una sola vía. Diferentes letras indican la diferencia significativa (Tukey, $\alpha = 0.05$) para el valor promedio de los días 10, 20 y 30 de cultivo de cada consorcio de microalgas

5.1.2.- Implicaciones del pH durante la auto-floculación y el cultivo de microalgas

En este estudio, la alcalinización de la solución nutritiva LC, desde el pH inicial de 4.74 ± 0.01 hasta más de 9.00 de pH durante el cultivo de microalgas (Figura 5.3), probablemente actuó como un factor que contribuyó a la floculación (>80% a los 30 días, Figura 5.2) por auto-floculación que se ha reportado que ocurre a un $\text{pH} > 9.00$ (Show *et al.*, 2013).

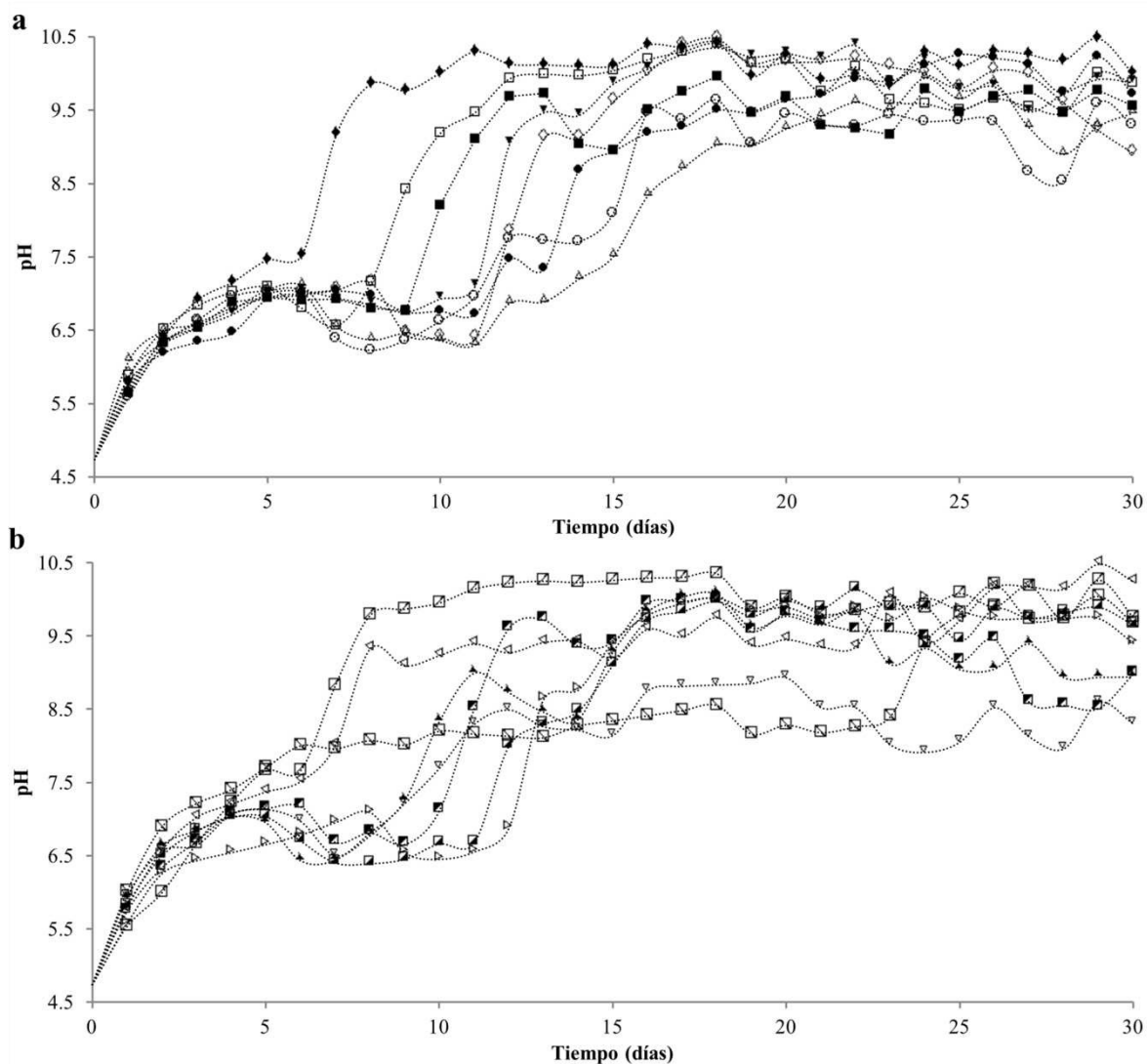


Figura 5.3.- Valores de pH durante el cultivo de consorcios de microalgas en solución nutritiva LC. a) Consorcio de microalgas: 1 (Δ), 2 (∇), 3 (\square), 4 (\blacksquare), 5 (\diamond), 6 (\blacklozenge), 7 (\circ) y 8 (\bullet). b) Consorcio de microalgas: 9 (\boxplus), 10 (\boxtimes), 11 (∇), 12 (\blacktriangle), 13 (\blacklozenge), 14 (\blacktriangleright), 15 (\blacktriangleleft) y 16 (\blacktriangleright).

Promedio ($n = 3$) \pm EE. La ausencia de la barra de error indica EE no apreciable

En este trabajo se utilizó NO_3^- como fuente nitrógeno debido a que el consumo de NO_3^- produce 1 mol equivalente de OH^- (Song *et al.*, 2011; Rashid *et al.*, 2014). Del mismo modo, la asimilación de HCO_3^- pudo proporcionar el CO_2 necesario para el crecimiento de las microalgas al mismo tiempo de generar la acumulación de OH^- que promovió el incremento gradual de pH en el medio acuoso (Martínez *et al.*, 2000). Asimismo, es importante destacar que el agotamiento y consumo de CO_2 y HCO_3^- causado por microalgas contribuye a la alcalinización del medio con valores superiores a 11.0 de pH (Heubeck *et al.*, 2007; Park y Craggs 2010). Lo anterior podría ser atribuido a la disminución del amortiguamiento en los cambios de pH proporcionado por la relación $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ y formación de especies de CO_3^{2-} que predominan en valores superiores de 10.5 de pH (Martínez *et al.* 2000; Markou y Georgakakis 2011; Craggs *et al.* 2013).

En el presente experimento, el suministro de bajo contenido de carbono en la solución nutritiva LC (0.20 mM) fue un factor que permitió el incremento del pH (>9) durante el cultivo de las microalgas. Asimismo, el aporte de CO_2 atmosférico proveniente de la aireación (0.5 VVM) puede considerarse como una característica favorable que posibilite el aumento del pH, debido a que la concentración de CO_2 proveniente del aire, podría haber sido consumido de manera directa por las microalgas evitando en gran parte su disociación en el agua y el decremento del pH por la formación de H_2CO_3 , el cual se ha reportado como un efecto no deseado durante la administración de CO_2 (adición directa o para el enriquecimiento del aire) en el cultivo de microalgas (Zhang *et al.* 2012). De igual forma, la aplicación de la aeración se podría considerar como una estrategia favorable en el uso de soluciones nutritivas bajas en carbono para el cultivo de microalgas, por la razón de que la aireación de los cultivos en este estudio proporcionó suficiente carbono para la producción de biomasa (1.42 ± 0.02 a 4.37 ± 0.10 g (BS) / L, a 30 días, Figura 5.1) sin amortiguar el pH en la solución nutritiva LC.

Por otro lado, las concentraciones de CI a los 30 días indicaron incrementos de 310 a 799% en comparación con el valor inicial de 2.02 ± 0.02 mg/L de CI Figura 5.4. En este estudio, la fijación de CI se puede explicar debido a la formación de HCO_3^- en el pH alcalino (> 8, Figura 5.3) por dos medios: 1) la hidratación de CO_2 y posterior reacción ácido-base para

formar HCO_3^- y 2) una reacción directa de CO_2 con OH^- para formar HCO_3^- (Sydney *et al.*, 2014). Por lo tanto, una ventaja del incremento de pH en solución y uso de la aeración durante el cultivo de microalgas podría ser la captación de CO_2 atmosférico como una de las fuentes principales de carbono. Igualmente, se debe considerar que otra utilidad del pH alcalino en el cultivo de microalgas está dada por la eliminación o reducción de la población de microorganismos patógenos (*e.g.* coliformes) a un pH superior o igual a 9.5 (Heubeck *et al.*, 2007).

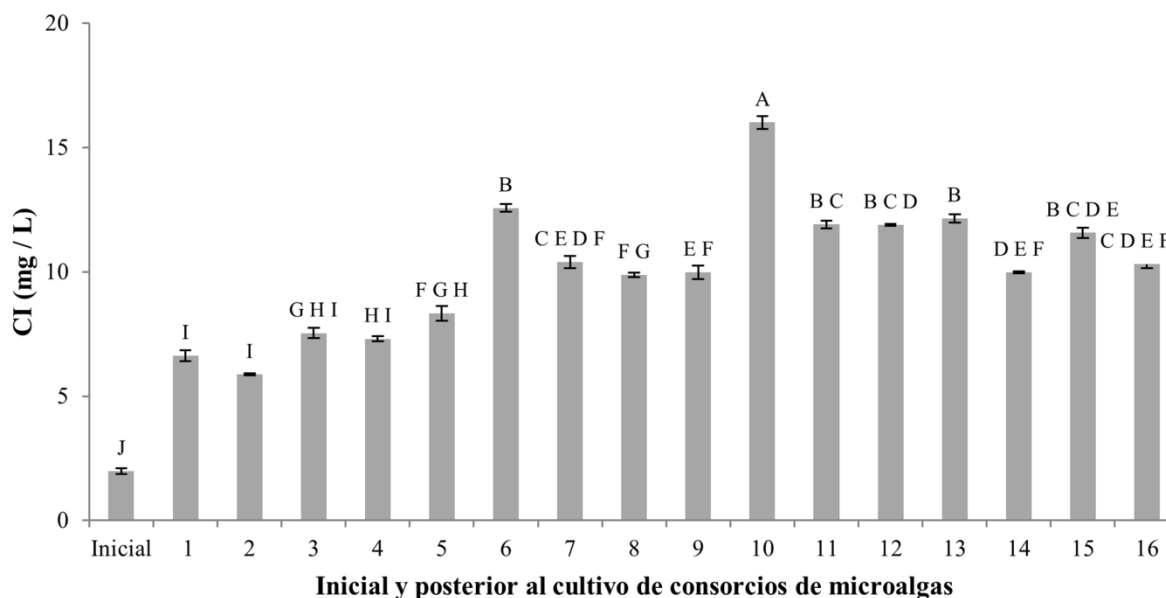


Figura 5.4.- Concentración de CI inicial y posterior a 30 días de cultivo de los 16 consorcios de microalgas evaluados en solución nutritiva LC. Promedio ($n = 3$) \pm EE. ANOVA de una sola vía. Diferentes letras indican diferencia significativa (Tukey, $\alpha = 0.05$)

5.1.3.- Efecto del pH alcalino y composición de la solución nutritiva en la auto-floculación de microalgas

Es de destacar que la auto-floculación en microalgas se asocia a la formación de precipitados inorgánicos de calcio o magnesio en la solución nutritiva y no únicamente al incremento de pH del cultivo como tal (Show *et al.* 2013; Vandamme *et al.* 2013; Nguyen *et al.*, 2014). Esto último fue confirmado por Nguyen *et al.* (2014), el cual indicó que la

auto-floculación de las microalgas a través del aumento natural del pH sólo ocurre en los medios suplementados con calcio o magnesio. Asimismo, se cree que el mecanismo de acción de la auto-floculación se debe a la interacción entre los precipitados de calcio o magnesio con cargas superficiales positivas y la neutralización posterior de la carga superficial negativa de las células de microalgas (Becker 2004; Vandamme *et al.*, 2013). Sin embargo, todavía hay incertidumbre sobre el mecanismo general (Vandamme *et al.*, 2012). No obstante, se ha identificado que la precipitación de fosfato de calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) en condiciones alcalinas (pH 9 a 11) juega un papel muy importante en la auto-floculación (Laliberté *et al.* 1997; Vandamme *et al.* 2012; Nguyen *et al.* 2014) la cual se logra adecuadamente en concentraciones de 0.03 a 0.07 mM de fósforo de fosfato y de 1.5 a 2.5 mM de calcio (Sukeník y Shelef 1984; Lavoie y De la Noüe 1987). Igualmente, se ha reportado que el magnesio a concentraciones superiores a 0.15 mM puede inducir de forma significativa la auto-floculación (Vandamme *et al.* 2012, 2013), ya que a pH elevado (\approx 10.2 - 11.5) el Mg^{2+} forma precipitados de hidróxido de magnesio ($\text{Mg}(\text{OH})_2$) (Parks 1967; Nguyen *et al.*, 2014).

En la presente investigación, la solución nutritiva LC proporcionó concentraciones suficientes de: Ca (6.25 mM), Mg (2.00 mM), P (1.00 mM) y bajo suministro de C (0.20 mM) (Tabla 4.1) para facilitar la formación de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y $\text{Mg}(\text{OH})_2$ durante el incremento gradual de pH ocasionado por el crecimiento de las microalgas. A razón de estas características se observaron dos posibles efectos indirectos a la auto-floculación como: 1) la disminución de la CE (36.1 a 51.1%) en la solución nutritiva y 2) el alto contenido de materia inorgánica en la biomasa cosechada de los 16 consorcios de microalgas evaluados (21.4 ± 0.7 a $35.9 \pm 0.9\%$) Figuras 5.5 y 5.6. La declinación de la CE observada podría corresponder a la asimilación de los nutrientes en forma iónica por las microalgas y / o precipitación de compuestos iónicos tales como: NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} / Fe^{3+} y elementos traza que contribuyen a la CE global de la solución (Oswald 1988; Yu *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2013). En concordancia a la disminución de la CE, la biomasa cosechada resultante presentó una alta concentración de materia inorgánica.

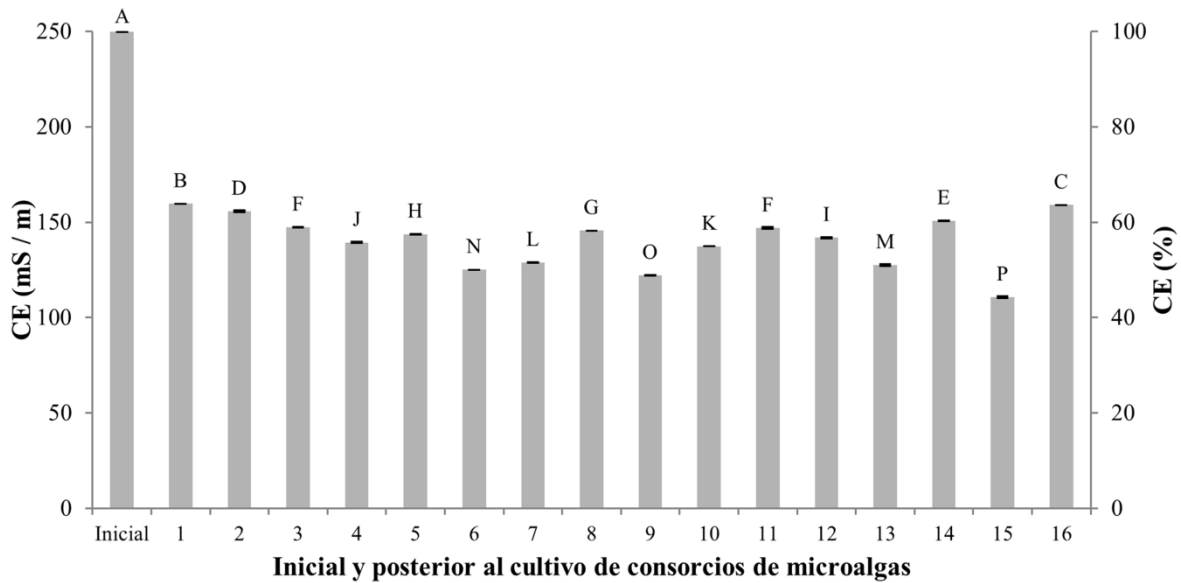


Figura 5.5.- Concentración de CE inicial y posterior a 30 días de cultivo de los 16 consorcios de microalgas evaluados en solución nutritiva LC. Promedio (n = 3) ± EE. ANOVA de una sola vía. Diferentes letras indican diferencia significativa (Tukey, $\alpha = 0.05$)

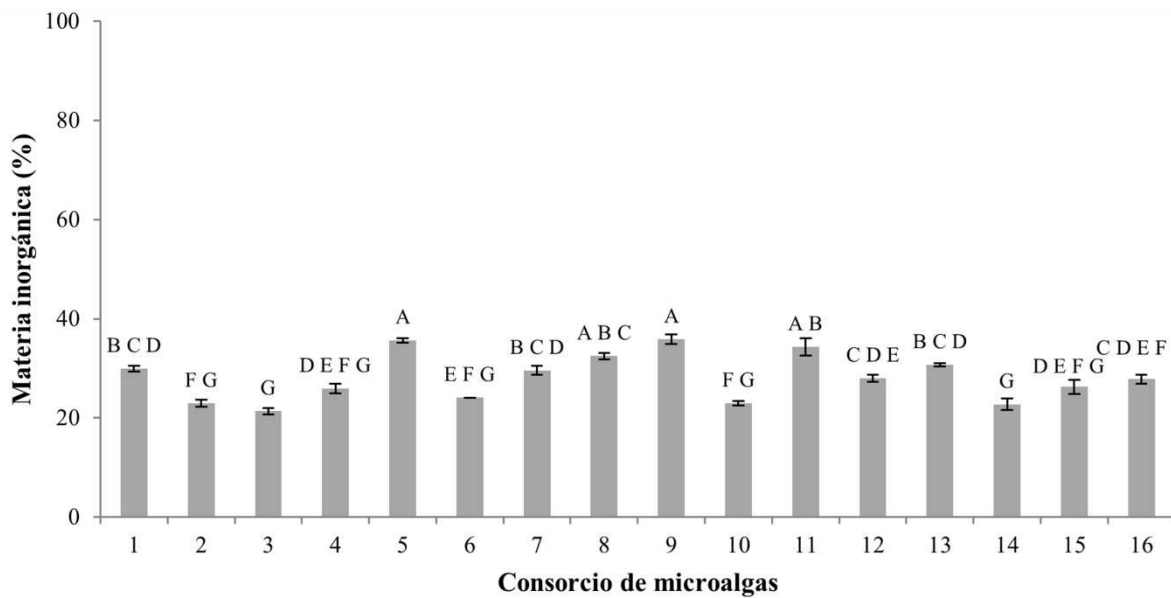


Figura 5.6.- Concentración de materia inorgánica en biomasa de los 16 consorcios de microalgas evaluados en solución nutritiva LC. Promedio (n = 3) ± EE. ANOVA de una sola vía. Diferentes letras indican diferencia significativa (Tukey, $\alpha = 0.05$)

5.2.- Acondicionamiento, semi-purificación y selección de un consorcio de microalgas de acuerdo a su capacidad de floculación y producción de biomasa durante su cultivo y resiembra en ESPTAR

Una estrategia práctica y aplicable para la operación de cultivos de microalgas, está dada por la selección y adaptación de cepas con fenotipos deseables, para su uso en distintos recursos hídricos no aprovechados tales como los ESPTAR (Mata *et al.*, 2010; Rawat *et al.*, 2011; Razzak *et al.*, 2013; Sutherland *et al.*, 2015). Por otra parte, cabe destacar que en el desarrollo de una población de microalgas la imposición o cambio de las características de cultivo (*e.g.* composición del medio nutritivo, pH, fotoperiodo, temperatura, etc.) provoca una adaptación (*i.e.* un acondicionamiento celular que promueve un mejor crecimiento y un menor tiempo en la fase de latencia) y selección de especies (Barsanti y Gualtieri 2006; Lananan *et al.*, 2014). Asimismo, el acondicionamiento de microalgas a un medio de cultivo para la producción de biomasa son demostrados por Rizkytata *et al.* (2014), a través de la evaluación del crecimiento de *Chlorella vulgaris* utilizando concentraciones de 10.0, 20.0, 30.0, 37.5 y 50.0% de aguas residuales agroindustriales de tofu como fuente de nutrientes. En dicha evaluación, se obtuvo una disminución en el crecimiento de *Chlorella vulgaris* al emplear 37.5 % y 50.0% de agua residual y una mayor producción de biomasa a 30% de aguas residuales, siendo esta última concentración la que requirió un mayor tiempo de adaptación celular (*i.e.* fase de latencia) en comparación a las concentraciones de 10 y 20% de agua residual.

En este estudio los consorcios de microalgas 9 y 10 tras 10 días de acondicionamiento a los ESPTAR como medio nutritivo y 5 ciclos de re-siembra con la finalidad de semi-purificar (*i.e.* eliminar la fracción que no sedimentó), indicaron un alto porcentaje en la capacidad de floculación con valores para el ciclo 5 de 98.0 ± 0.2 y $99.4 \pm 0.2\%$ (consorcio 9 y 10 respectivamente) (Figura 5.7). Asimismo, la alta recuperación de biomasa (>98%) se encontró entre los valores obtenidos por la adición de floculantes (60 a 100%) (Wan *et al.*, 2015), lo que remarca el alto potencial del cultivo de consorcios de microalgas previamente acondicionados y semi-purificados en un recurso altamente sostenible (ESPTAR) (Rawat *et*

al., 2011), el cual dada sus características fisicoquímicas permite un crecimiento favorable en el desarrollo de las microalgas (Beltrán-Rocha 2014; Guldhe *et al.*, 2017).

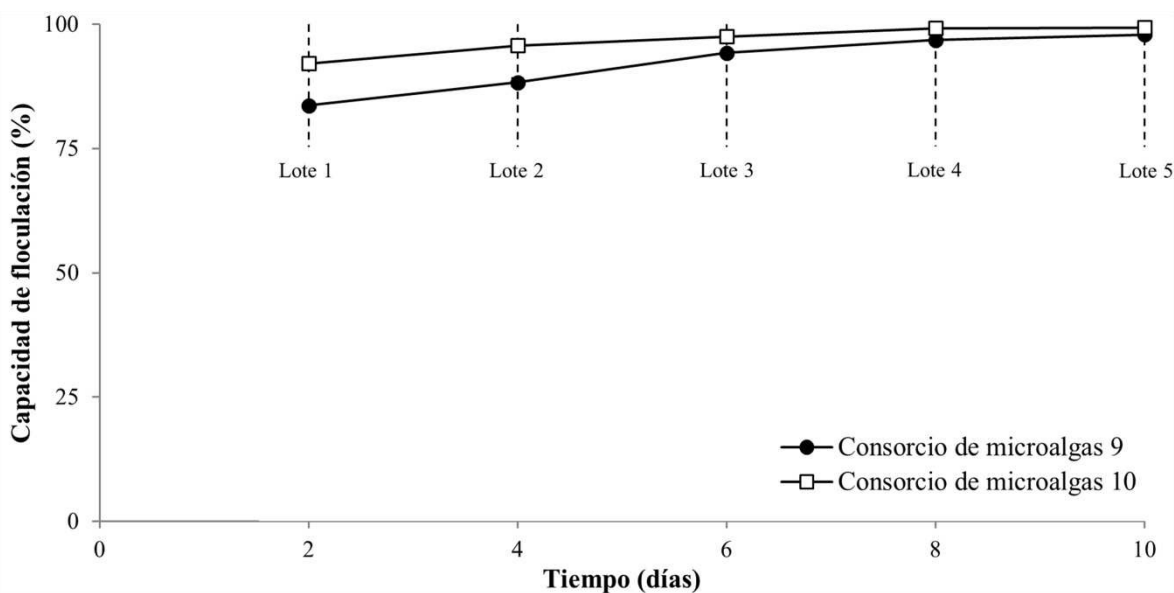


Figura 5.7.- Capacidad de floculación (%) de los consorcios de microalgas 9 y 10 durante su cultivo en cinco lotes sucesivos en ESPTAR. Promedio ($n = 3$) \pm EE. La ausencia de la barra de error indica EE no apreciable

Además de considerar la preparación del consorcio (*i.e.* acondicionamiento y semi-purificación) para la fácil cosecha de biomasa de microalgas empleando ESPTAR, se consideró la estabilidad del cultivo medida a través de la generación de biomasa, esto con el fin de llevar escalamientos posteriores para la producción de biomasa en condiciones de intemperie. Los resultados obtenidos tras 5 ciclos y recambios totales de ESPTAR, señalan un estabilidad y producción favorable durante el cultivo del consorcio 10, obteniendo una concentración final de 1.3 ± 0.1 g (BS) / L equivalentes a una producción del 151% (en comparación al valor inicial de inóculo 0.5 g (BS) / L) Figura 5.8. Por otra parte, el consorcio 9 no indicó una producción adecuada de biomasa alcanzando un valor final a 10 días de cultivo de: 0.4 ± 0.0 g (BS) / L, concentración que representa una pérdida de 11.5% tomando en cuenta la concentración inicial de biomasa Figura 5.8. Debido a los resultados de producción de biomasa se seleccionó el consorcio de microalgas 10 para su posterior evaluación a intemperie.

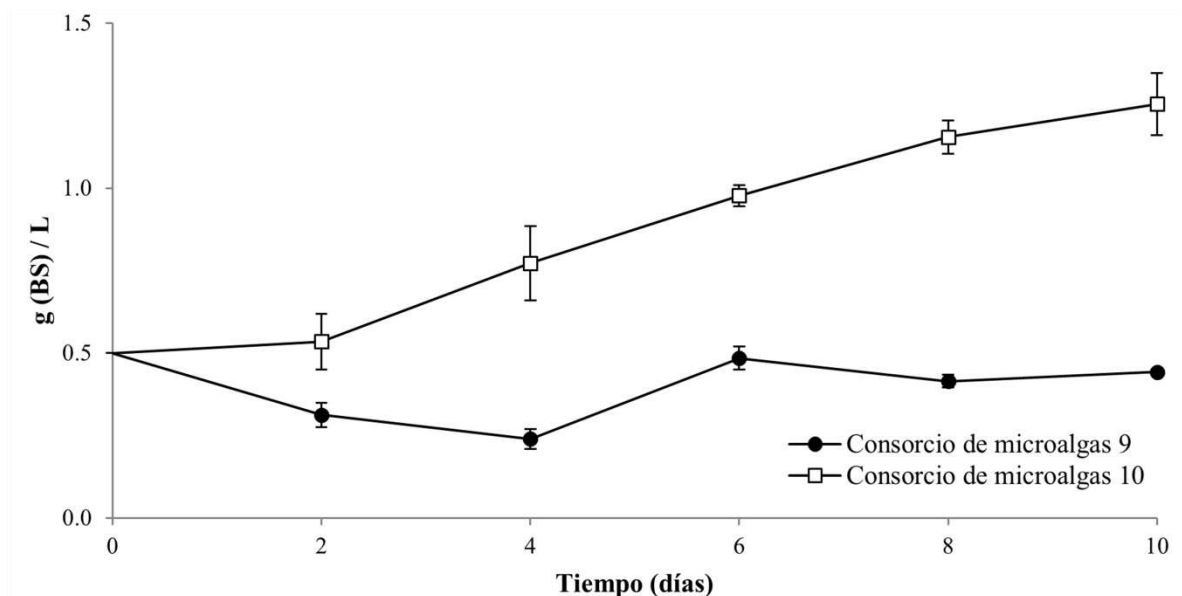


Figura 5.8.- Concentración de biomasa de los consorcios de microalgas 9 y 10 durante su cultivo en lotes sucesivos en ESPTAR. Promedio ($n = 3$) \pm EE. La ausencia de la barra de error indica EE no apreciable

5.3.- Acondicionamiento, semi-purificación y evaluación de un consorcio de microalgas durante la producción de biomasa y pulimento de ESPTAR a intemperie

5.3.1.- Capacidad de floculación y producción de biomasa de microalgas durante su cultivo a intemperie en lotes sucesivos utilizando ESPTAR

Los resultados del acondicionamiento y semi-purificación del consorcio de microalgas 10 para su cultivo con generación de biomasa para su fácil cosecha y operación bajo condiciones ambientales en ESPTAR, indicó efectos favorables posterior a realizar el primer recambio del cultivo en lote, aumentando la capacidad de floculación de 74.6% (lote 1) a 84.0% (lote 3) Tabla 5.1. De igual manera la producción de biomasa mostró efectos positivos incrementando la concentración de biomasa de 66% (lote 1) a 167% (lote 3) Tabla 5.1.

Tabla 5.1.- Capacidad de floculación, concentración (g (BS) / L) y aumento de biomasa (%) del consorcio 10 de microalgas cultivado en lotes con ESPTAR

Lote	Capacidad de floculación (%)	Concentración final g (BS) / L	Aumento de biomasa (%)*
1	74.6 ± 0.7 ^B	0.17 ± 0.01 ^B	66 ± 11 ^B
2	81.4 ± 0.8 ^A	0.23 ± 0.01 ^{AB}	133 ± 5 ^{AB}
3	84.0 ± 0.9 ^A	0.27 ± 0.01 ^A	167 ± 13 ^A

* Valor generado con respecto a la concentración inicial de inóculo. Promedio (n = 3) ± EE. ANOVA de una sola vía. Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (Tukey, $\alpha = 0.05$)

Los efectos del acondicionamiento y semi-purificación del consorcio de microalgas 10 en el aumento de la producción de biomasa y capacidad de floculación, se pueden observar de manera indirecta a través de los decrementos obtenidos para la CE durante el cultivo en lote sucesivos, en el cual inicialmente se obtuvo una reducción de 8.5% (lote 1), aumentando posteriormente a 19.8 y 18.1% para los lotes 2 y 3 respectivamente Figura 5.9. Tal como lo señala Oswald (1988), la declinación de la CE debido a la actividad de las microalgas podría representar un parámetro altamente correlacionado con el aumento de la producción de biomasa de microalgas, ya que el consumo de elementos básicos para el crecimiento de microalgas, es decir, N y P (en formas iónicas NO_3^- , PO_4^{3-}), componentes iónicos como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} / Fe^{3+} y elementos traza (Cai *et al.*, 2013) contribuyen a la CE total de la solución. Asimismo, parte del decremento obtenido en la CE, podría ser debido a la precipitación de iones como Ca^{2+} , Mg^{2+} y PO_4^{3-} , los cuales participan en el proceso de auto-floculación de microalgas a través de su co-precipitación (Sukenic y Shelef 1984; Becker 2004; Yu *et al.* 2005; Nguyen *et al.*, 2014).

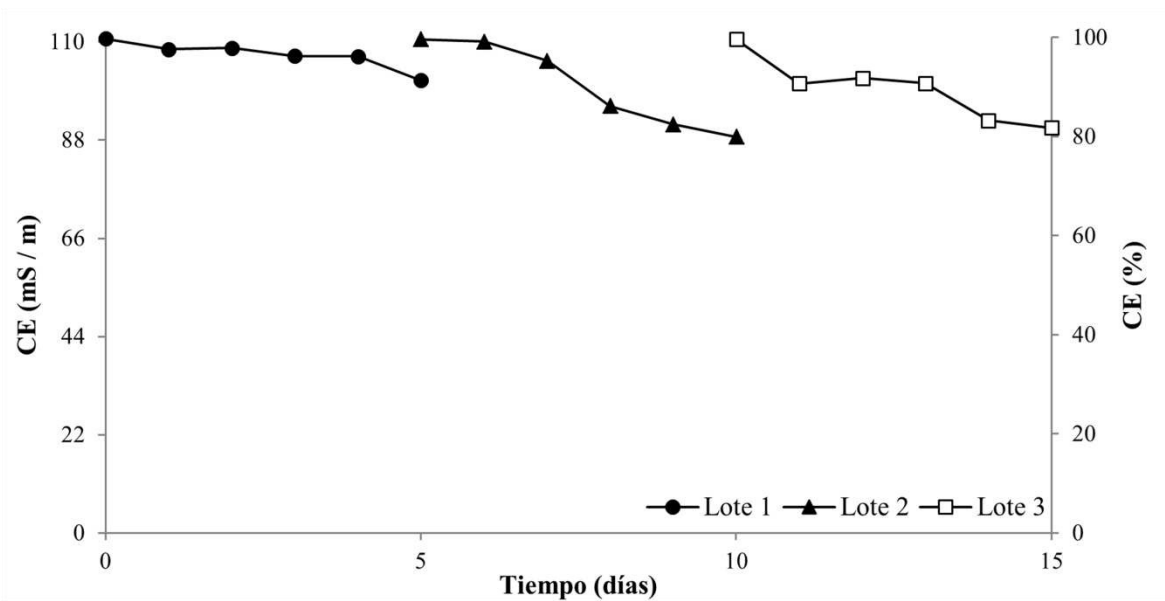


Figura 5.9.- Valores de CE durante el cultivo en lotes sucesivos del consorcio de microalgas 10 en ESPTAR. Promedio ($n = 3$) \pm EE. La ausencia de la barra de error indica EE no apreciable

5.3.2.- Efecto del aumento del pH en ESPTAR durante el cultivo de microalgas

En el cultivo de microalgas, el pH está controlado principalmente por las especies de carbono (CO_2 , HCO_3^- , CO_3^{2-}) que amortiguan el pH (Rashid *et al.*, 2014). Una medida de la capacidad del agua para neutralizar iones H^+ , CO_3^{2-} y otros iones que modifican el pH está dada por la alcalinidad total medida en mg/L de CaCO_3 (Wolf-Gladrow *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2009). Los resultados de alcalinidad total posteriores a 5 días de cultivo para cada uno de los 3 lotes evaluados indicaron reducciones de 13.1 % (lote 1) y 50.3% (lote 2 y 3) con respecto al valor inicial de 209.3 ± 2.5 mg/L de CaCO_3 Tabla 5.2. Este decremento en la alcalinidad total del agua, podría ser debido al consumo HCO_3^- el cual al ser consumido directamente durante el desarrollo de las microalgas produce proporcionalmente una disminución en la alcalinidad total del agua (Sawyer y McCarty 1967). Por otra parte, se ha observado que cuando el CO_2 es asimilado directamente por las microalgas, se evitan modificaciones de pH en el sistema acuático debido a que no todo el CO_2 en equilibrio consigue disolverse en el medio acuoso (Sawyer y McCarty 1967). Esto último podría indicar que el CO_2 atmosférico proveniente de la aireación (0.1 VVM), no

rebasó el consumo de carbono por parte del desarrollo del consorcio de microalgas 10, presentándose reducciones de alcalinidad total al término de cada lote de cultivo Tabla 5.2.

Tabla 5.2.- Resultados de la alcalinidad total posterior al cultivo en lotes del consorcio de microalgas 10 en ESPTAR

Alcalinidad total (mg/L de CaCO ₃)		
Valor inicial	209.3 ± 2.5	
Valor final lote	Alcalinidad total (mg/L de CaCO ₃)	% de Reducción
1	182.0 ± 2.0 ^A	13.1 ± 1.0 ^B
2	104.0 ± 4.0 ^B	50.3 ± 1.9 ^A
3	104.0 ± 4.0 ^B	50.3 ± 1.9 ^A

Promedio (n = 3) ± EE. ANOVA de una sola vía. Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (Tukey, $\alpha = 0.05$)

Al final de 5 días de cultivo para cada lote del consorcio de microalgas 10 cultivado, se obtuvo un incremento del pH (valor inicial de 8.0 ± 0.0) de 9.7 ± 0.0 , 9.8 ± 0.0 y 9.9 ± 0.0 para los lotes 1, 2 y 3 respectivamente Figura (5.10). En sistemas acuáticos es reportado que en el intervalo de pH 8 a 10.5 la forma predominante de carbono inorgánico disuelto es HCO_3^- (Markou y Georgakakis 2011), la cual podría haber predominado en este estudio dado la concordancia de pH (intervalo de 8.0 a 9.9 de pH Figura 5.10). Esto último explica en gran medida el aumento del pH debido a que el consumo de HCO_3^- aporta el CO_2 necesario para el desarrollo de las microalgas a la par de generar OH^- que propicia la elevación del pH del medio (Martínez *et al.* 2000). De igual manera, la fuente de nitrógeno inorgánico utilizada por las microalgas contribuye a los cambios de pH, en la cual si la fuente principal de nitrógeno es NH_4^+ su asimilación acidificaría el pH por la producción de H^+ (Barsanti y Gualtieri 2006). No obstante, en los ESPTAR la forma predominante de nitrógeno inorgánico es NO_3^- (> 98%) (Wang *et al.*, 2010; Ji *et al.*, 2013; Beltrán-Rocha 2014), el cual al ser asimilado produce de manera equivalente OH^- ocasionando aumentos en el pH (Song *et al.*, 2011; Rashid *et al.*, 2014), tal como los presentados en este estudio (Figura 5.10). Considerando la capacidad de las microalgas de incrementar el pH por consumo de NO_3^- y agotamiento de carbono (*e.g.* HCO_3^-), se podría modular el aumento del pH de acuerdo a su tiempo de cultivo.

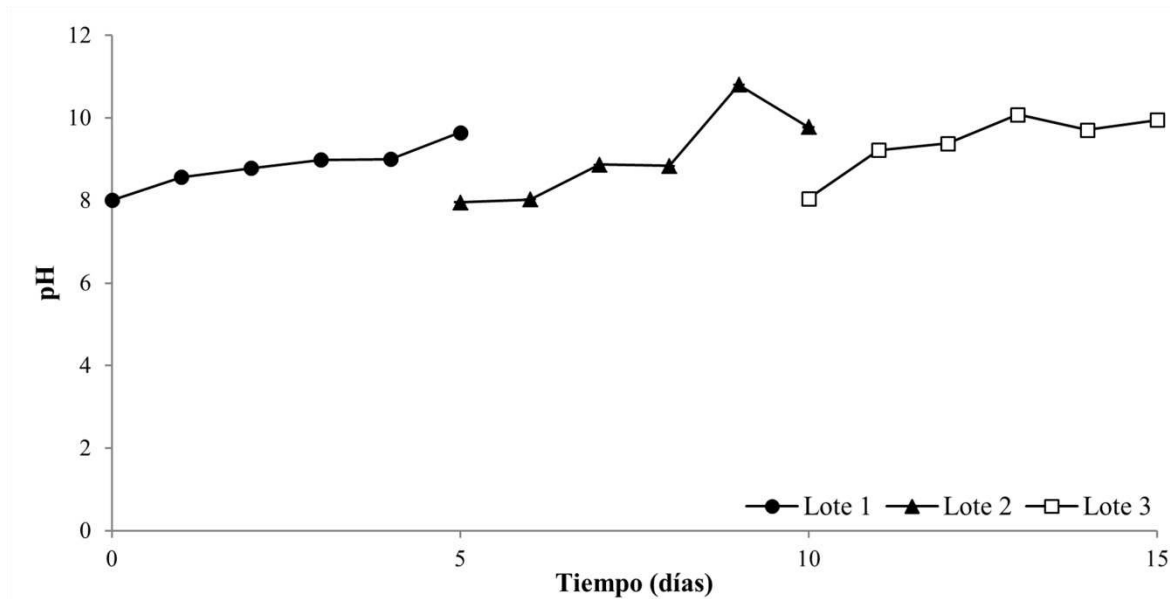


Figura 5.10.- Valores de pH durante el cultivo en lotes sucesivos del consorcio de microalgas 10 en ESPTAR. Promedio (n = 3) ± EE. La ausencia de la barra de error indica EE no apreciable

Por otro lado el aumento de pH (valores entre 9 y 10) por la actividad fotosintética natural de las microalgas conseguido en este estudio, destaca con ventajas tales como: cumplir con la normativa de descarga NOM-001-SEMARNART-1996 (pH de 5 a 10) y favorecer el proceso de auto-floculación de las microalgas a través de la co-precipitación de calcio / fósforo para la formación de precipitados de fosfato de calcio $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (en un intervalo de pH de 9 a 11) (Vandamme *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 2014). Otra ventaja del aumento de pH en los ESPTAR del presente estudio es la probable desinfección o condición desfavorable para el crecimiento de coliformes totales, fecales y *E. coli* (Tabla 5.3), tal como lo reportan Heubeck *et al.* (2007), los cuales obtuvieron un efecto en la eliminación de *E. coli* durante el cultivo de microalgas en aguas residuales domésticas, alcanzando reducciones de $\approx 50\%$ a pH 8 y de 100% a pH de 9.5. Este punto es particularmente importante, debido a que la eliminación por el aumento de pH en el cultivo da el beneficio potencial de proporcionar un método de desinfección sin cloro en los ESPTAR previo a la descarga en sistemas acuáticos receptores.

Tabla 5.3.- Resultados de la calidad microbiológica (coliformes totales, coliformes fecales y *E. coli*) inicial y posterior al cultivo en lotes del consorcio de microalgas 10 en ESPTAR

	Coliformes totales	Coliformes fecales	<i>E. coli</i>
Valor inicial ESPTAR	16.5 ± 3.5	< 2	< 2
	Coliformes totales	Coliformes fecales	<i>E. coli</i>
Valor final lotes: 1, 2 y 3	< 2	< 2	< 2
Promedio (n = 3) ± EE			

5.3.3.- Evaluación del pulimento en ESPTAR durante el cultivo de microalgas

En ambientes acuáticos tales como los ESPTAR, la forma de nitrógeno más oxidada, termodinámicamente estable y predominante es NO_3^- , en la cual la suma de NO_2^- y NH_4^+ representa solo una pequeña fracción del nitrógeno inorgánico (Barsanti y Gualtieri 2006). Asimismo, el consumo y reducción de NO_3^- se produce en un proceso que implica dos reducciones para la producción de NH_4^+ a nivel de cloroplasto, produciéndose NO_2^- durante el proceso de reducción de NO_3^- a NH_4^+ que posteriormente es asimilado e integrado a aminoácidos (Burhenne y Tischner 2000; Umamaheswari y Shanthakumar 2016). Los resultados de eliminación de NO_3^- para los 3 lotes consecutivos de cultivo de microalgas 10 en los ESPTAR, indicaron reducciones considerables con 30.9 ± 0.5 , 55.8 ± 0.9 y $53.6 \pm 1.3\%$ para los lotes 1, 2 y 3 respectivamente (Tabla 5.4). Lo que podría indicar un acondicionamiento al consumo de NO_3^- y producción de biomasa posterior al cultivo de microalgas del lote 1 (Tabla 5.1). De igual manera, el fósforo total presentó reducciones considerables indicando una eficiencia mayor al 90% (Tabla 5.4). Cabe mencionar que aunque el fósforo es considerado como el nutriente limitante en el cultivo de microalgas (para sistemas de producción y tratamientos) (Cai *et al.*, 2013) se reporta que concentraciones de 15 $\mu\text{g/L}$ de $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ son suficientes para promover y saturar el crecimiento de algas en la mayoría de los sistemas acuáticos (Correll 1998), por lo que en este estudio no se vio limitado el cultivo para la producción de biomasa y pulimento de los ESPTAR por microalgas. Por otra parte, el pulimento ocasionado por el desarrollo de las microalgas en el presente estudio, dio como resultado el cumplimiento de descarga de N (lotes de cultivo 2 y 3) y P (lotes de cultivo 1, 2 y 3) para sistemas acuáticos sensibles a eutrofización según lo aplicado por normas estrictas tal como la Directiva 91/271/CEE que

estipula concentraciones menores de 1 mg/L de PT y 10 mg/L de NT para su descarga (Consejo CE, 1991).

Tabla 5.4.- Resultados del pulimento de NO_3^- -N y PO_4^{3-} -P posterior al cultivo en lotes del consorcio de microalgas 10 en ESPTAR

	NO_3^- -N (mg/L)		PO_4^{3-} -P (mg/L)	
Valor inicial ESPTAR	17.6 ± 0.2		3.8 ± 0.1	
Valor final lote	NO_3^- -N (mg/L)	% de Reducción	PO_4^{3-} -P (mg/L)	% de Reducción
1	12.1 ± 0.1 ^A	30.9 ± 0.5 ^B	0.4 ± 0.0 ^A	90.4 ± 0.1 ^C
2	7.8 ± 0.2 ^B	55.8 ± 0.9 ^A	0.2 ± 0.0 ^C	95.2 ± 0.2 ^A
3	8.2 ± 0.2 ^B	53.6 ± 1.3 ^A	0.3 ± 0.0 ^B	93.0 ± 0.0 ^B

Promedio (n = 3) ± EE. ANOVA de una sola vía. Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (Tukey, $\alpha = 0.05$)

5.3.4.- Caracterización fisicoquímica parcial de la biomasa de microalgas generada de ESPTAR para su valorización y determinación de uso potencial

Las microalgas tienen la capacidad de adaptarse a una amplia gama de condiciones durante su cultivo (*e.g.* composición del medio, pH, temperatura, luz, etc.). Tales adaptaciones influyen en la composición bioquímica de la biomasa resultante (Loladze y Elser 2011; Choi y Lee 2015; Whitton *et al.*, 2016). La Tabla 5.5 muestra la composición fisicoquímica de la biomasa del consorcio de microalgas 10 posterior al pulimento en ESPTAR. La baja concentración de lípidos en la biomasa resultante (0.35 ± 0.02 BS %), indica que el uso de los ESPTAR como solución nutritiva no es un medio adecuado para la generación de aceites y posterior producción de biodiésel. Cabe señalar, que para obtener rentabilidad en la producción de biodiésel se requiere una alta tasa de crecimiento asociada a un alto contenido de lípidos en la biomasa (>70%) (Rashid *et al.*, 2014), además del diseño de subsistemas de bajo costo que incluyan la extracción de lípidos y su conversión a biodiésel (Cai *et al.*, 2013; Craggs *et al.*, 2013).

De manera alternativa, debe considerarse que las microalgas poseen una alta capacidad para eliminar eficientemente a los cationes metálicos (M^{n+}) de la solución acuosa, las cuales en gran parte se incorporan como material orgánico en la célula (Barsanti y Gualtieri 2006; Park *et al.*, 2011). En el presente estudio, los resultados muestran una alta recuperación de

metales (medidos como contenido de ceniza) con un valor de $46.5 \pm 0.7\%$ y la probable asimilación de iones metálicos como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} y $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, como es descrito previamente por Wang *et al.* (2010) quienes observaron disminuciones de estos iones metálicos durante el cultivo de *Chlorella* sp. en los ESPTAR. Por otro lado, la composición de la biomasa de microalgas resultante (Tabla 5.5) sugiere que la biomasa podría usarse como biofertilizante, debido a su alto contenido de minerales (micronutrientes) y macronutrientes como C, N y P incorporados en forma orgánica (*i.e.* carbohidratos, proteínas y lípidos). Igualmente, debe considerarse que las microalgas contienen reguladores del crecimiento vegetal (*e.g.* auxinas, giberelinas y citoquininas) que podrían mejorar el crecimiento de los cultivos agrícolas (Barsanti y Gualtieri 2006; Garcia-Gonzalez y Sommerfeld 2016). Cabe destacar, que desde el punto de vista de la sustentabilidad, los biofertilizantes a base de microalgas son recursos importantes que aún no se aprovechan o usan ampliamente, utilizando efluentes secundarios municipales. La generación de biofertilizantes a partir de microalgas y ESPTAR, ciertamente podría ser rentable con poca contribución a la contaminación ambiental a la vez de proporcionar un efecto estimulante y beneficioso sobre el crecimiento de las plantas (Pittman *et al.*, 2011; Garcia-Gonzalez y Sommerfeld 2016). Finalmente, otra de las ventajas de usar microalgas como biofertilizante es la posibilidad de ahorrar energía al evitar el secado de la biomasa, mediante el uso directo del cultivo vivo o extractos húmedos.

Tabla 5.5- Composición fisicoquímica de la biomasa generada en ESPTAR

Análisis	Composición fisicoquímica de la biomasa microalgas BS (%)
Nitrógeno total Kjeldahl	3.6 ± 0.1
Materia inorgánica (cenizas)	46.5 ± 0.7
Lípidos totales	0.35 ± 0.02
Fósforo total	2.4 ± 0.0

Capítulo 6

CONCLUSIONES

- i.* La producción de biomasa posterior a 30 días de cultivo en solución nutritiva LC varió de 1.4 a 4.4 g (BS) / L entre los 16 consorcios de microalgas evaluados. Estos resultados resaltan el diferente potencial de la diversidad biológica y la necesidad de seleccionar especies de alto rendimiento previo a la producción de biomasa a gran escala.
- ii.* Se obtuvo una alta capacidad de floculación (81 a 100 %) probablemente como resultado de la auto-floculación causada por el aumento natural del pH (de 4.7 a más de 9.0) durante el crecimiento de las microalgas en la solución nutritiva LC y otros factores tales como: suministro reducido de carbono (*i.e.* proporcionado por la solución nutritiva y aireación) y la formación de precipitados de fosfato de calcio o hidróxido de magnesio.
- iii.* El pH alcalino alcanzado en la solución nutritiva LC, fue una característica que permitió la formación de HCO_3^- y el incremento de la concentración de carbono inorgánico en el medio acuoso durante la aireación. Por otro lado, se observaron dos efectos secundarios durante la auto-floculación: disminución pronunciada de la conductividad eléctrica (36.1 a 51.1%) y alta concentración inorgánica (21.4 a 35.9%) en la biomasa cosechada.
- iv.* La semi-purificación basada en la eliminación de la fracción suspendida de microalgas y el acondicionamiento a través de la re-siembras en el ESPTAR utilizando los consorcios de microalgas 9 y 10 favoreció la fácil cosecha de biomasa y la alta capacidad de floculación con valores de alrededor del 98% de recuperación para ambos consorcios. Por otra parte, solo el cultivo con el consorcio 10 indicó una producción favorable de biomasa, representando un mejor acondicionamiento a los recambios de agua durante el cultivo.

- v. El cultivo a intemperie del consorcio de microalgas 10 acondicionado y semi-purificado para la generación de biomasa de fácil cosecha en efluentes secundarios municipales, tras cultivarse en una serie de 3 cultivos en lote continuos, obtuvo incrementos en la capacidad de floculación de 74.6% (lote 1) a 84% (lote 3) y producción de biomasa de 66% (lote 1) a 167% (lote 3).
- vi. En general, el consorcio de microalgas 10 tras el acondicionamiento y semi-purificación en el ESPTAR indicó un mayor potencial para la reducción de la CE (de: 8.5 a 18.1%), alcalinidad total (de: 13.1 a 50.3%), NO_3^- -N (de: 30.9 a 53.6%) y PO_4^{3-} -P (de: 90.4 a 93.0%).
- vii. El tratamiento de pulimento en los ESPTAR utilizando el consorcio de microalgas 10 redujo las concentraciones de fósforo y nitrógeno (a excepción del lote 1 del cultivo) para su descarga a sistemas acuáticos sensibles a eutrofización, que se permite según la Directiva 91/271/EEC (< 1 mg/L de PT y < 10 mg/L de NT).
- viii. El uso de los ESPTAR como medio de cultivo y el bajo contenido de lípidos (0.35%) de la biomasa de microalgas obtenida indicaron no ser útiles para la producción de biodiésel. Por otro lado, la alta concentración de materia inorgánica (46.5%) sugiere que la biomasa podría reciclarse fácilmente como biofertilizante debido al suministro de minerales y compuestos orgánicos de C, N y P (e.g. carbohidratos, proteínas y lípidos).
- ix. Se demostró que es posible acondicionar y semi-purificar un consorcio de microalgas nativas para mejorar la capacidad de floculación, producción de biomasa y pulimento de los efluentes secundarios municipales. En relación a esto, se destaca que no se requirió una modificación externa en los cultivos (e.g. uso de agentes floculantes) para aumentar la capacidad de floculación, lo cual disminuiría costos en el proceso de producción de biomasa y modo de cosecha convencional. Asimismo, los efluentes secundarios cumplieron con los límites permisibles de descarga para N y P de la Directiva 91/271/EEC, la cual a nivel internacional es la legislación más

estricta. Finalmente, a partir del uso de los efluentes secundarios municipales como medio de cultivo y la recuperación de nutrientes (principalmente la alta concentración de minerales) por las microalgas, se identificó de manera parcial el aprovechamiento de la biomasa como un biofertilizante.

REFERENCIAS

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A.A., Ibraheem, I.B.M. 2012.** Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(3), 257-275.
- Abinandan, S., Shanthakumar, S. 2015.** Challenges and opportunities in application of microalgae (Chlorophyta) for wastewater treatment: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 52, 123-132.
- AOAC. 1997.** Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 16th edn, Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA.
- AOAC. 2000.** Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 17th edn, Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA.
- Aslan, S., Kapdan, I.K. 2006.** Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering*, 28(1), 64-70
- Barnard, J.L. 1975.** Biological nutrient removal without the addition of chemicals. *Water Research*, 9(5-6), 485-490.
- Barsanti, L., Gualtieri, P. 2006.** Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology. CRC Press, Taylor and Francis, Boca Raton.
- Batista, A.B., Gouveia, L., Bandarra, N.M., Franco, J.M, Raymundo, A. 2013.** Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research*, 2(2), 164-173.
- Becker, E.W. 2004.** Microalgae in human and animal nutrition. In: *Handbook of microalgal culture*. Richmond, A. (eds). Biotechnology and Applied Phycology. Oxford: Blackwell Science, pp. 312-551.
- Beltrán-Rocha, J.C. 2014.** Desarrollo de un proceso de remoción de nutrientes de efluentes eutróficos por un consorcio de microalgas nativas de Nuevo León, México cultivadas en un nuevo fotobiorreactor. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, México.
- Bidart, C., Fröhling, M., Schultmann, F. 2014.** Electricity and substitute natural gas generation from the conversion of wastewater treatment plant sludge. *Applied Energy*, 113, 404-413.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. 1959.** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 37, 911-917.
- Borowitzka, M.A. 1999.** Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, 70(1-3), 313-321.
- Brennan, L., 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(2), 557-577.
- Brown, C.D., Hoyer, M.V., Bachmann, R.W., Canfield, D.E. 2000.** Nutrient-chlorophyll relationships: an evaluation of empirical nutrient-chlorophyll models using Florida and north-temperate lake data. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 57, 1574-1583.
- Burhenne, N., Tischner, R. 2000.** Isolation and characterization of nitrite-reductase-deficient mutants of *Chlorella sorokiniana* (strain 211-8k). *Planta*, 211(3), 440-445.

- Cai, T., Park, S.Y., Li, Y. 2013.** Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 19, 360-369.
- Choi, H.J., Lee, S.M. 2015.** Effect of the N/P ratio on biomass productivity and nutrient removal from municipal wastewater. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38(4), 761-766.
- Christenson, L., Sims, R. 2011.** Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advance*, 29(6), 686-702.
- Chu, W.L. 2012.** Biotechnological applications of microalgae. *International e - Journal of Science, Medicine & Education*, 6, 24-37.
- CONAGUA. 2007.** Comisión Nacional del Agua. Manual de agua potable, alcantarillado y saneamiento. ISBN: 978-968-817-880-5, Editor: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos, México, D.F.
- Consejo de las Comunidades Europeas. 1991.** Directiva del Consejo 91/271/CEE, de 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas. DOCE 135/L, de 30-05-91.
- Correll, D.L. 1998.** The role of phosphorus in the eutrophication of receiving waters: A review. *Journal of Environment Quality*, 27(2), 261-266.
- Craggs, R.J., Lundquist, T.J., Benemann, J.R. 2013.** Wastewater treatment and algal biofuel production. In: *Algae for biofuels and energy*. Borowitzka, M.A., Moheimani, N.R. (eds). Springer, Dordrecht, pp. 153-163.
- Craggs, R.J., McAuley, P.J., Smith, V.J. 1997.** Wastewater nutrient removal by marine microalgae grown on a corrugated raceway. *Water Research*, 31(7), 1701-1707.
- Craggs, R.J., Smith, V.J., McAuley, P.J. 1995.** Wastewater nutrient removal by marine microalgae cultured under ambient conditions in mini-ponds. *Water Science and Technology*, 31(12), 151-160.
- De la Noüe, J., Laliberte, G., Proulx, D. 1992.** Algae and waste water. *Journal of Applied Phycology*, 4(3), 247-254.
- Dodds, W.K., Bouska, W.W., Eitzmann, J.L., Pilger, T.J., Pitts, K.L., Riley, A.J., Schloesser, J.T., Thornbrugh, D.J. 2009.** Eutrophication of U.S. freshwaters: analysis of potential economic damages. *Environmental Science & Technology*, 43(1), 12-19.
- Eldridge, R.J., Hill, D.R.A., Gladman, B.R. 2012.** A comparative study of the coagulation behaviour of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 24(6), 1667-1679.
- EPA. 2000.** Nutrient Criteria Technical Guidance Manual, Lakes and Reservoirs. US Environmental Protection Agency (EPA), Office of Water, EPA-822-B00-001.
- Garcia-Gonzalez, J., Sommerfeld, M. 2016.** Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*. *Journal of Applied Phycology*, 28(2), 1051-1061.
- Gonçalves, A.L., Pires, J.C.M., Simões, M. 2017.** A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Research*, 24, 403-415.
- Gonzalez, L.E., Canizares, R.O., Baena, S. 1997.** Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresource Technology*, 60(3), 259-262.

Gouveia, L., Graça, S., Sousa, C., Ambrosano, L., Ribeiro, B., Botrel, E.P., Castro-Neto, P., Ferreira, A.F., Silva, C.M. 2016. Microalgae biomass production using wastewater: Treatment and costs. *Algal Research*, 16, 167-176.

Grima, E.M., Belarbi, E.H., Fernández, F.G.A., Medina, A.R., Chisti, Y. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*, 20 (7-8), 491-515.

Guldhe, A., Kumari, S., Ramanna, L., Ramsundar, P., Singh, P., Rawat, I., Bux, F. 2017. Prospects, recent advancements and challenges of different wastewater streams for microalgal cultivation. *Journal of Environmental Management*, 203, 299-315.

Henderson, R., Parsons, S.A., Jefferson, B. 2008. The impact of algal properties and pre-oxidation on solid-liquid separation of algae. *Water Research*, 42(8-9), 1827-1845.

Hernandez, J.P., de-Bashan, L.E., Bashan, Y. 2006. Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella* spp. co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(1-2), 190-198.

Heubeck, S., Craggs, R.J., Shilton, A. 2007. Influence of CO₂ scrubbing from biogas on the treatment performance of a high rate algal pond. *Water Science and Technology*, 55(11), 193-200.

Hongyang, S., Yalei, Z., Chunmin, W., Xuefei, Z., Jinpeng, L. 2011. Cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* in soybean processing wastewater. *Bioresource Technology*, 102(21), 9884-9990.

Jacobsen, B.N., Warn, T. 1999. Overview and comparison of effluent standards for urban waste water treatment plants in European countries. *European Water Management*, 2(6), 25-39.

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

Khan, M., Yoshida, N. 2008. Effect of L-glutamic acid on the growth and ammonium removal from ammonium solution and natural wastewater by *Chlorella vulgaris* NTM06. *Bioresource Technology*, 99(3), 575-582.

Koller, M., Muhr, A., Braunegg, G. 2014. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research*, 6, 52-63.

Kong, Q.X., Li, L., Martinez, B., Chen, P., Ruan, R. 2010. Culture of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in wastewater for biomass feedstock production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(1), 9-18.

Laliberté, G., Lessard, P., De la Noüe, J., Sylvestre, S. 1997. Effect of phosphorus addition on nutrient removal from wastewater with the cyanobacterium *Phormidium bohneri*. *Bioresource Technology*, 59(2-3), 227-233.

Lananan, F., Abdul-Hamid, S.H., Din, W.N.S., Ali, N., Khatoon, H., Jusoh, A., Endut, A. 2014. Symbiotic bioremediation of aquaculture wastewater in reducing ammonia and phosphorus utilizing Effective Microorganism (EM-1) and microalgae (*Chlorella* sp.). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 95, 127-134.

Lavoie, A., de la Noüe, J. 1985. Hyperconcentrated cultures of *Scenedesmus obliquus*: a new approach for wastewater biological tertiary treatment?. *Water Research*, 19(11), 1437-1442.

Lavoie, A., de la Noüe, J. 1987. Harvesting of *Scenedesmus obliquus* in wastewaters: auto or bioflocculation?. *Biotechnology & Bioengineering*, 30(7), 852-859.

- Lee, K., Lee, C.G. 2001.** Effect of light/dark cycles on wastewater treatments by microalgae. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 6(3), 194-199.
- Loladze, I., Elser, J.J. 2011.** The origins of the Redfield nitrogen-to-phosphorus ratio are in a homeostatic protein-to-rRNA ratio. *Ecology Letters*, 14(3), 244-250.
- Lopez-Chuken, U.J., Young, S.D. 2010.** Modelling sulphate-enhanced cadmium uptake by *Zea mays* from nutrient solution under conditions of constant free Cd^{2+} ion activity. *Journal of Environmental Sciences*, 22(7), 1080-1085.
- Malhotra, S.K., Lee, G.F., Rohlich, G. 1964.** Nutrient removal from secondary effluent by alum flocculation and lime precipitation. *International Journal of Air and Water Pollution*, 8, 487-500.
- Markou, G., Georgakakis, D. 2011.** Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy*, 88(10), 3389-3401.
- Martínez, M.E., Sánchez, S., Jiménez, J.M., El-Yousfi, F., Muñoz, L. 2000.** Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 73(3), 263-272.
- Mata, T., Melo, A., Simões, M., Caetano, N. 2010.** Parametric study of a brewery effluent treatment by microalgae *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 107, 151-158.
- Mennaa, F.Z., Arbib, Z., Perales, J.A. 2015.** Urban wastewater treatment by seven species of microalgae and an algal bloom: biomass production, N and P removal kinetics and harvestability. *Water Research*, 83, 42-51.
- Monteiro, M.I.C., Ferreira, F.N., De Oliveira, N.M.M., Avila, A.K. 2003.** Simplified version of the sodium salicylate method for analysis of nitrate in drinking waters. *Analytica Chimica Acta*, 477(1), 125-129.
- Morris, L., Colombo, V., Hassell, K., Kellar, C., Leahy, P., Long, S.M., Myers, J.H., Pettigrove, V. 2017.** Municipal wastewater effluent licensing: A global perspective and recommendations for best practice. *Science of the Total Environment*, 580, 1327-1339.
- Nguyen, T.D.P., Frappart, M., Jaouen, P., Pruvost, J., Bourseau, P. 2014.** Harvesting *Chlorella vulgaris* by natural increase in pH: effect of medium composition. *Environmental Technology*, 35(9-12), 1378-1388.
- Nixon, S.W. 1995.** Coastal marine eutrophication: A definition, social causes, and future concerns. *Ophelia*, 41, 199-219.
- NMX-AA-003-1980.** Norma Mexicana. Aguas residuales - Muestreo, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 25 de marzo de 1980.
- NMX-AA-006-SCFI-2010.** Análisis de agua - Determinación de materia flotante en aguas residuales y residuales tratadas - Método de prueba (Cancela a la NMX-AA-006- SCFI-2000), publicada en el Diario Oficial de la Federación el 14 de septiembre de 1997.
- NMX-AA-029-SCFI-2001.** Norma Mexicana. Análisis de agua - Determinación de fósforo total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - Método de prueba (cancela a la NMX-AA-029-1981), publicada en el Diario Oficial de la Federación el 17 de abril de 2001.
- NMX-AA-036-SCFI-2001.** Norma Mexicana. Análisis de agua - Determinación de acidez y alcalinidad en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - Método de prueba (cancela a la NMX-AA-036-1980) publicada en el Diario Oficial de la Federación el 01 de agosto de 2001.

NOM-001-SEMARNAT-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 6 de enero de 1997.

NOM-113-SSA1-1994. Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 10 de mayo de 1995.

Olguin, E.J., Galicia, S., Mercado, G., Perez, T. 2003. Annual productivity of *Spirulina* (*Arthrospira*) and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions. *Journal of Applied Phycology*, 15(1-2), 249-257.

Oswald, W.J. 1988. Large-scale algal culture systems (engineering aspects). In: *Microalgal Biotechnology*. Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J. (eds). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 357-394.

Oswald, W.J., Gotaas, H.B. 1957. Photosynthesis in sewage treatment. *Transactions of the American Society of Civil Engineers*, 122, 73-105.

Park J.B.K., Craggs R.J. 2010. Wastewater treatment and algal production in high rate algal ponds with carbon dioxide addition. *Water Science and Technology*, 61(3), 633-639.

Park, J.B.K., Craggs, R.J., Shilton, A.N. 2011. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology*, 102(1), 35-42.

Parks, G.A. 1967. Aqueous surface chemistry of oxides and complex oxide minerals. In: *Equilibrium concepts in natural water systems*. Stumm, W. (eds). *Advances in chemistry series*, vol. 67, American Chemistry Society, Washington, DC, pp. 121-160.

Phang, S.M., Miah, M.S., Yeoh, B.G., Hashim, M.A. 2000. *Spirulina* cultivation in digested sago starch factory wastewater. *Journal of Applied Phycology*, 12(3-5), 395-400.

Pires, J.C., Alvim-Ferraz, M.C., Martins, F.G., Simoes, M. 2013. Wastewater treatment to enhance the economic viability of microalgae culture. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(8), 5096-5105.

Pittman, J.K., Dean, A.P., Osundeko, O. 2011. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource technology*, 102(1), 17-25.

PND. 2013. Plan Nacional del Desarrollo 2013-2018, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 20 de mayo de 2013.

PNUD. 2014. El desarrollo humano y los objetivos de desarrollo del milenio en Puebla. Publicado por el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD). Impreso en México/Printed in México por Producción Creativa, abril 2014. <http://www.mx.undp.org/content/mexico/es/home/library/poverty/el-desarrollo-humano-y-los-odm-en-puebla/>.

Pulz, O., Gross, W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(6), 635-648.

Queiroz, M.I., Lopes, E.J., Zepka, L.Q., Bastos, R.G., Goldbeck, R. 2007. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor. *Bioresource Technology*, 98(11), 2163-2169.

Rabalais, N.N. 2004. Eutrophication. In: *The global coastal ocean multiscale interdisciplinary processes*. Robinson, A.R., McCarthy, J., Rothschild, B.J. (eds). *The Sea*, Vol. 13, Harvard University Press, Cambridge, pp. 819-865.

Rashid, N., Ur-Rehman, M.S., Sadiq, M., Mahmood, T., Han, J.I. 2014. Current status, issues and developments in microalgae derived biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 40, 760-778.

Rasoul-Amini, S.N., Montazeri-Najafabady, S., Shaker, A., Safari, A., Kazemi, P., Mousavi, M.A., Mobasher, Ghasemi. Y. 2014. Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae free cells in bath culture system. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(2), 126-131.

Rawat, I., Ranjith-Kumar, R., Mutanda, T., Bux, F. 2011. Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, 88, 3411-3424.

Razzak, S.A., Hossain, M.M., Lucky, R.A., Bassi, A.S., de Lasa, H. 2013. Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing-A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 622-653.

Renuka, N., Sood, A., Ratha, S.K., Prasanna, R., Ahluwalia, A.S. 2013. Evaluation of microalgal consortia for treatment of primary treated sewage effluent and biomass production. *Journal of Applied Phycology*, 25(5), 1529-1537.

Reyna-Martínez, R., Gómez-Flores, R., López-Chuken, U.J., González-González, R., Fernández-Delgado, S., Balderas-Rentería, I. 2014. Lipid Production by Pure and Mixed Cultures of *Chlorella pyrenoidosa* and *Rhodotorula mucilaginosa* Isolated in Nuevo Leon, Mexico. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(1), 354-359.

Rizkytata, B.T., Gumelar, M.T., Abdullah, T.H. 2014. Industrial tofu wastewater as a cultivation medium of microalgae *Chlorella vulgaris*. *Energy Procedia*, 47, 56-61.

Ruiz-Marin, A., Mendoza-Espinosa, L.G., Stephenson, T. 2010. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology*, 101(1), 58-64.

Salim, S., Kosterink, N.R., Tchetskoua-Wacka, N.D., Vermuë, M.H., Wijffels, R.H. 2014. Mechanism behind autoflocculation of unicellular green microalgae *Ettlia texensis*. *Journal of biotechnology*, 174, 34-38.

Sawyer, C.N., McCarty, P.L. 1967. *Chemistry for sanitary engineers*. 2nd Ed., McGraw Hill, New York, pp. 518.

Selman, M., Greenhalgh, S., Diaz, R., Sugg, Z. 2008. Eutrophication and hypoxia in coastal areas: a global assessment of the state of knowledge. WRI Policy Note Water Quality: Eutrophication and Hypoxia No. 1, World Resources Institute, Washington, DC.

Show, K.Y., Lee, D.J., Chang, J.S. 2013. Algal biomass dehydration. *Bioresource Technology*, 135, 720-729.

Song, W., Rashid, N., Choi, W., Lee, K. 2011. Biohydrogen production by immobilized *Chlorella* sp. using cycles of oxygenic photosynthesis and anaerobiosis. *Bioresource Technology*, 102(18), 8676-8681.

Spilling, K., Seppälä, J., Tamminen, T. 2011. Inducing autoflocculation in the diatom *Phaeodactylum tricorutum* through CO₂ regulation. *Journal of Applied Phycology*, 23(6), 959-966.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 101(2), 87-96.

Sriram, S., Seenivasan, R., 2012. Microalgae cultivation in wastewater for nutrient removal. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 3(2), 9-13.

- Sukenik, A., Shelef, G. 1984.** Algal autoflocculation-verification and proposed mechanism. *Biotechnology and Bioengineering*, 26(2), 142-147.
- Sutherland, D.L., Howard-Williams, C., Turnbull, M.H., Broady, P.A., Craggs, R.J. 2015.** Enhancing microalgal photosynthesis and productivity in wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology*, 184, 222-229.
- Sydney, E.B., Novak, A.C., De Carcalho, J.C., Soccol, C.R. 2014.** Respirometric balance and carbon fixation of industrially important algae. In: *Biofuels from algae*. Paney, A., Lee, D.J., Chisti, Y., Soccol, C.R. (eds). Elsevier, MA, USA, pp. 67-84.
- Umamaheswari, J., Shanthakumar, S. 2016.** Efficacy of microalgae for industrial wastewater treatment: a review on operating conditions, treatment efficiency and biomass productivity. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 15(2), 265-284.
- Valenzuela-Espinoza, E., Millan-Nunez, R., Nunez-Cebrero, F. 1999.** Biomass production and nutrient uptake by *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) cultured with a low cost alternative to the *f/2* medium. *Aquacultural Engineering*, 20(3), 135-147.
- Vandamme, D., Foubert, I., Fraeye, I., Meesschaert, B., Muylaert, K. 2012.** Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: role of magnesium and calcium and practical implications. *Bioresource Technology*, 105, 114-119.
- Vandamme, D., Foubert, I., Meesschaert, B., Muylaert, K. 2010.** Flocculation of microalgae using cationic starch. *Journal of Applied Phycology*, 22(4), 525-530.
- Vandamme, D., Foubert, I., Muylaert, K. 2013.** Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. *Trends in Biotechnology*, 31(4), 233-239.
- Vigani, M., Parisi, C., Rodríguez-Cerezo, E., Barbosa, M.J., Sijtsma, L., Ploeg, M., Enzing, C. 2015.** Food and feed products from microalgae: Market opportunities and challenges for the EU. *Trends in Food Science & Technology*, 42(1), 81-92.
- Vollenweider, R.A., Kerekes, J.J. 1982.** OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). *Eutrophication of Waters. Monitoring, Assessment and Control*. OECD, Paris, pp. 164.
- Wan, C., Alam, M.A., Zhao, X.Q., Zhang, X.Y., Guo, S.L., Ho, S.H., Chang, J.S., Bai, F.W. 2015.** Current progress and future prospect of microalgal biomass harvest using various flocculation technologies. *Bioresource Technology*, 184, 251-257.
- Wang L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y., Wang, Y., Ruan, R. 2010.** Cultivation of green algae *Chlorella sp.* in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Applied biochemistry and biotechnology*, 162(4), 1174-1186.
- Wang, B., Li, Y., Wu, N., Lan, C.Q. 2008.** CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(5), 707-718.
- Wang, X.J., Xia, S.Q., Chen, L., Zhao, J.F., Renault, N.J., Chovelon, J.M. 2006.** Nutrients removal from municipal wastewater by chemical precipitation in a moving bed biofilm reactor. *Process Biochemistry*, 41(4), 824-828.
- Whitton, R., Le-Mével, A., Pidou, M., Ometto, F., Villa, R., Jefferson, B. 2016.** Influence of microalgal N and P composition on wastewater nutrient remediation. *Water Research*, 91, 371-378.
- Williams, A.J., Brannon-Andersen, C., Lewis, G.P. 2009.** Evaluating the effects of sample processing treatments on alkalinity measurements. *Journal of Hydrology*, 377(3-4), 455-464.

Wolf-Gladrow, D.A., Zeebe, R.E., Klaas, C., Körtzinger, A., Dickson, A.G., 2007. Total alkalinity: the explicit conservative expression and its application to biogeochemical processes. *Marine Chemistry*, 106(1-2), 287-300.

Yu, I.T., Su, J.J., Wu, J.F., Lee, S.L., Ju, C.C., Yen, H.T. 2005. Dietary modification for reducing electrical conductivity of piggery wastewater. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 18(9), 1343-1347.

Zhang, E., Wang, B., Wang, Q., Zhang, S., Zhao, B. 2008. Ammonia-nitrogen and orthophosphate removal by immobilized *Scenedesmus* sp. isolated from municipal wastewater for potential use in tertiary treatment. *Bioresource Technology*, 99(9), 3787-3793.

Zhang, X., Amendola, P., Hewson, J.C., Sommerfeld, M., Hu, Q. 2012. Influence of growth phase on harvesting of *Chlorella zofingiensis* by dissolved air flotation. *Bioresource Technology*, 116, 477-484.

A1. LOGROS OBTENIDOS EN ESTE PROYECTO

Libro

1. **Beltrán-Rocha, J.C.**, López-Chuken, U.J., Barceló-Quintal, I.D. **2015**. Microalgas: panorama ambiental y aprovechamiento comercial. EAE Press. España. ISBN 978-3-659-09377-7.

Capítulo de libro

- 1) **Beltrán-Rocha, J.C.**, Guajardo-Barbosa, C., López-Chuken, U.J. **2017**. Microalgas: perspectivas y aplicaciones biotecnológicas. En: Microbiología y biotecnología avanzada. Galán-Wong, L.J., Arévalo-Niño, K., Luna-Olvera, H., Pereyra-Alferez, B., Torre-Zavala, S., Galán-Franco, L.A. (eds). Talleres de la imprenta universitaria de la Universidad Autónoma de Nuevo León. ISBN 978-607-27-0721-4, pp. 361-384.

Artículos científicos

- 1) **Beltrán-Rocha, J.C.**, Barceló-Quintal, I.D., García-Martínez, M., Osornio-Berthet, L., Saavedra-Villarreal, N., Villarreal-Chiu, J., López-Chuken, U.J. **2017**. Polishing of municipal secondary effluent using native microalgae consortia. *Water Science and Technology*, 75(7), 1693-1701.
- 2) **Beltrán-Rocha, J.C.**, Guajardo-Barbosa, C., Barceló-Quintal, I.D., López-Chuken, U.J. **2017**. Biotratamiento de efluentes secundarios municipales utilizando microalgas: Efecto del pH, nutrientes (C, N y P) y enriquecimiento con CO₂ / Biotreatment of secondary municipal effluents using microalgae: Effect of pH, nutrients (C, N and P) and CO₂ enrichment. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. Article in press, 52(3), xxx-xxx.
- 3) García-Martínez, M., Osornio-Berthet, L.J., Solís-Correa, H.E., López-Chuken, U.J., **Beltrán-Rocha, J.C.**, Barceló-Quintal, I.D. 2017. Determination of hydrodynamics in municipal wastewater by a lagoon system with screens. *Journal of Environmental Protection*, 8, 330-343.

Presentaciones en congresos. Modalidad: oral

- 1) **Beltrán-Rocha, J.C.**, López-Chuken, U.J., Barceló-Quintal I.D., Zetina-Moguel, C., Garcia-Alborante, J., Villareal-Chiu, J. **2015**. Cultivo de microalgas y el pulimento de efluentes secundarios municipales. 3er Foro de la Red: Calidad, desarrollo de sistemas de tratamiento, recuperación y sustentabilidad de cuerpos acuáticos: Tecnología del agua. Universidad Autónoma Metropolitana, México. Del 8 al 9 de enero de 2015.

- 2) **Beltrán-Rocha, J.C.**, Barceló-Quintal, I.D., Villareal Chiu, J., Candelario-Torres, M.F., López-Chuken, U.J. **2015**. Pulimento de efluentes secundarios municipales en cultivo de microalgas nativas. III Congreso Internacional de Química e Ingeniería Verde. Facultad de Ciencias Químicas / UANL, México. Del 22 al 24 de abril de 2015.
- 3) García-Martínez, M., Barceló- Quintal, I.D., Osornio-Berthet, L.J., Solís-Correa, H.E., López-Chuken, U.J., **Beltrán-Rocha, J.C.** **2017**. Determination of water quality indices in a lagoon system with screens and curve shapes with slope, in Mexico. 5th Young Water Professionals Conference – IWA México. Morelia, México. Del 24 al 26 de mayo de 2017.
- 4) Osornio-Berthet, L.J., Barceló- Quintal, I.D., López-Chuken, U.J., García-Martínez, M. **Beltrán-Rocha, J.C.** **2017**. Determination of treatment efficiency in a sub-surface wetland system of horizontal flow in Mexico. 5th Young Water Professionals Conference – IWA México. Morelia, México. Del 24 al 26 de mayo de 2017.

Presentaciones en congresos. Modalidad: cartel

- 1) Garza-Mata, A.N., **Beltrán-Rocha, J.C.**, Candelario-Torres, M.F., López-Chuken, U.J. **2015**. Growth and productivity of yeast, microalgae and plants as affected by a new balanced nutrient solution. III Congreso Internacional de Química e Ingeniería Verde. Facultad de Ciencias Químicas / UANL, México. Del 22 al 24 de abril de 2015.
- 2) Rodríguez-Lucio, M.D., **Beltrán-Rocha, J.C.**, Barceló-Quintal, I.D., Saavedra-Villareal, N., López-Chuken, U.J. **2015**. Evaluación de la floculación de biomasa en cultivo de microalgas. II Encuentro Nacional sobre Biotecnología. Universidad Autónoma de Tlaxcala, México. Del 6 al 9 de diciembre de 2015.
- 3) Osornio-Berthet, L.J., Barceló-Quintal, I.D., Osornio-Berthet, L.J., García-Martínez, M., **Beltrán-Rocha, J.C.**, Solís-Correa, H.E. **2016**. Treatment efficient of municipal wastewater by a subsurface horizontal flow wetland modified to rural communities in Mexico. 15th IWA International Conference on Wetland Systems for Water Pollution Control. Gdańsk Polonia. Del 4 al 9 de septiembre de 2016.
- 4) García-Martínez, M., Barceló-Quintal, I.D., López-Chuken, U.J., Osornio-Berthet, L.J., **Beltrán-Rocha, J.C.** **2016**. Efficiency of wastewater treatment by a pilot lagoon system with screens and cambers curves. 13th IWA Specialized Conference on Small Water and Wastewater Systems / 5th IWA Specialized Conference on Resources-Oriented Sanitation. Atenas, Grecia. Del 14 al 17 de septiembre de 2016.
- 5) Guajardo-Barbosa, C., **Beltrán-Rocha, J.C.**, Mora-Zúñiga, A.E., Galindo-Rodríguez, S.A., Gallego-López, J.A., López-Chuken, U.J., Galán-Wong, L.J., Elias-Santos, M. **2017**. Evaluación de la actividad antioxidante de los carotenoides totales producidos por la microalga *Haematococcus pluvialis* bajo distintos periodos

de estrés. IV Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina y II Simposio Nacional de Microbiología Aplicada. Facultad de Ciencias Químicas / UANL, México. Del 27 al 28 de abril de 2017.

- 6) **Beltrán-Rocha, J.C.**, Guajardo-Barbosa, C., Osornio-Berthet, L.J., Ramírez-Lara, E., Barceló-Quintal, I.D., López-Chuken, U.J. **2017**. Polishing of secondary effluent by native microalgae consortia isolated from surface water in Nuevo Leon State, Mexico. The 7th International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts. Miami, FL, USA. Del 18 al 21 de junio de 2017.
- 7) **Beltrán-Rocha, J.C.**, Guajardo-Barbosa, C., García-Martínez, M., Saavedra-Villarreal, N., Barceló-Quintal, I.D., López-Chuken, U.J. **2017**. Screening of natural flocculation ability of microalgae consortia isolated from Nuevo Leon State, Mexico. The 7th International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts. Miami, FL, USA. Del 18 al 21 de junio de 2017.
- 8) Guajardo-Barbosa, C., **Beltrán-Rocha, J.C.**, Quintero-Zapata, I., Galán-Wong, L.J., López-Chuken, U.J., Elías-Santos, M. **2017**. Evaluation of plant growth biostimulants from *Ascophyllum nodosum* for enhance production and quality of the *Haematococcus pluvialis* biomass. The 7th International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts. Miami, FL, USA. Del 18 al 21 de junio del 2017.
- 9) Duarte-Cantú, Y.N., López-Chuken, U.J., Castillo-Nava, D., **Beltrán-Rocha, J.C.** Luna-Olvera, H.A. **2017**. The 7th International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts. Miami, FL, USA. Del 18 al 21 de junio del 2017.
- 10) Guajardo-Barbosa, C., **Beltrán-Rocha, J.C.**, Quintero-Zapata, I., Avilés-Arnaut, H., Galindo-Rodríguez, S.A., López-Chuken, U.J., Galán-Wong, L.J., Elías-Santos, M. **2017**. Evaluación de fitoinductores extraídos de *Ascophyllum nodosum* sobre la producción y calidad de la biomasa de *Haematococcus pluvialis*. XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Puerto Vallarta, Jalisco, México. Del 25 al 30 de junio de 2017.
- 11) Katiushka-Arévalo, N., Julián-Zaragoza, C., **Beltrán-Rocha, J.C.**, Rangel-Rodríguez A.M., Flores, M.S., López-Chuken, U.J. **2017**. Efecto de diferentes medios en la eficiencia de floculación, producción de biomasa y exopolisacáridos, por tres consorcios de microalgas. XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Puerto Vallarta, Jalisco, México. Del 25 al 30 de junio de 2017.
- 12) **Beltrán-Rocha, J.C.**, López-Chuken, U.J., Guajardo-Barbosa, C., Lozano-Rodríguez, M.A., Guajardo-García, A., Oropesa-Melendez, M. **2017**. IV Congreso Internacional de Química e Ingeniería Verde. Facultad de Ciencias Químicas / UANL, México. Del 22 al 24 de septiembre de 2017.

Colaboraciones académicas

Tesis de Maestría

- 1) Cantú-Bernal, S.H. Incremento de la vida de anaquel de probióticos combinados con el alga *Chlorella ssp.* en flan. Laboratorio de Formulación de Biológicos. Facultad de Ciencias Biológicas / UANL.

Tesis de Doctorado

- 2) Reyna-Martínez, R.G. Tamizaje de microalgas del Estado de Nuevo León con actividad antitumoral contra linfoma murino. Unidad de Formulación de Biológicos. Facultad de Ciencias Biológicas / UANL.
- 3) Zaragoza-Carmona, J.A.J. Caracterización parcial de carbohidratos en exopolisacáridos de *Neochloris oleoabundans* y *Chlorella* sp., microalgas útiles para producción de biodiesel. Laboratorio L1 Instituto de Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas / UANL.
- 4) Guajardo-Barbosa, C. Evaluación de la actividad fotoprotectora, antioxidante y de permeabilidad de un extracto formulado de *H. pluvialis* a nivel cutáneo. Laboratorio L6 Instituto de Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas / UANL.