

Análisis de efectividad de *Chlorococcum littorale* y *Scenedesmus* sp. en biorremediación de aguas residuales

Itzel Yolotzin López Pacheco

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2016

ZAMORANO
CARRERA DE AMBIENTE Y DESARROLLO

**Análisis de efectividad de *Chlorococcum
littorale* y *Scenedesmus* sp. en biorremediación
de aguas residuales**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera en Ambiente y Desarrollo en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Itzel Yolotzin López Pacheco

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2016

Análisis de efectividad de *Chlorococcum littorale* y *Scenedesmus* sp. en biorremediación de aguas residuales

Itzel Yolotzin López Pacheco

Resumen. Las aguas residuales se definen como el agua resultante de un proceso, en el cual se ha contaminado. La biorremediación es una opción para complementar el proceso de tratamiento de las aguas residuales. *Chlorococcum littorale* y *Scenedesmus* sp. son microalgas que han sido poco estudiadas con el fin de remediar las aguas residuales, por lo cual surge la necesidad de determinar su efectividad. Los mejores resultados se observaron con la solución: 75% medio y 25% de agua residual después de lodos activados en ambos casos. En las disoluciones de *C. littorale* existió una remoción de fósforo total de 57% y de nitrógeno total de 94% y en *Scenedesmus* sp. hubo remoción de fósforo total de 52% y de nitrógeno total de 92%. Con los resultados obtenidos se hicieron pruebas estadísticas de ANOVA y Tukey. En este estudio realizado en el Tecnológico de Monterrey, se determinó que las algas *C. littorale* y *Scenedesmus* sp. pueden ser utilizadas como una alternativa para aprovechar las aguas residuales después de un tratamiento primario y secundario, y antes de descargarlas a un efluente, con el fin de obtener biomasa para producir energía y suplementos alimenticios para animales, además de reducir aún más los niveles de contaminación en las aguas residuales.

Palabras clave: Caracterización de biomasa, microalga, reducción de contaminantes.

Abstract. Wastewater is defined as water resulting from a process where the water was contaminated. Bioremediation is an option to supplement the wastewater treatment process. *Chlorococcum littorale* and *Scenedesmus* sp. are microalgae that have been little studied for their capacity to remedy the wastewater, so it is important to determine their effectiveness. The best results were observed with the solution: 75% medium and 25% residual water after activated sludge in both cases. In solutions of *C. littorale* there was a removal of total phosphorus of 57% and total nitrogen of 94% and with *Scenedesmus* sp. there was total phosphorus removal of 52% and 92% of total nitrogen. With the results obtained statistical tests ANOVA and Tukey were made. In this study at Tecnológico de Monterrey, it was determined that algae *C. littorale* and *Scenedesmus* sp. can be employed as an alternative to approach wastewater after primary and secondary treatment, and before discharging into an effluent furthermore obtain raw materials for energy and food supplements for animals, and also to reduce contamination levels in the wastewater.

Key words: Characterization of biomass, microalgae, reducing pollutants.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
4. CONCLUSIONES	31
5. RECOMENDACIONES	32
6. LITERATURA CITADA.....	33
7. ANEXOS	39

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

	Cuadros	Página
1.	Caracterización de aguas residuales.....	13
2.	Medición de pH del experimento de <i>Chlorococcum littorale</i>	18
3.	Resultados de la prueba Tukey para pH de <i>Chlorococcum littorale</i>	18
4.	Medición de DQO del experimento de <i>Chlorococcum littorale</i>	19
5.	Resultados de la prueba Tukey para DQO de <i>Chlorococcum littorale</i>	19
6.	Medición de fósforo total (mg/L PO ₄) del experimento de <i>Chlorococcum littorale</i>	20
7.	Resultados ANOVA y prueba Tukey para fósforo total de <i>Chlorococcum littorale</i>	20
8.	Medición de nitrógeno total (mg/L N) del experimento de <i>Chlorococcum littorale</i>	21
9.	Resultados ANOVA y prueba Tukey para nitrógeno total de <i>Chlorococcum littorale</i>	21
10.	Medición de pH del experimento de <i>Scenedesmus</i> sp.	22
11.	Medición de DQO del experimento de <i>Scenedesmus</i> sp.	23
12.	Medición de fósforo total (mg/L PO ₄) del experimento de <i>Scenedesmus</i> sp.	23
13.	Resultados ANOVA y prueba Tukey para fósforo total de <i>Scenedesmus</i> sp.	24
14.	Medición de nitrógeno total (mg/L N) del experimento de <i>Scenedesmus</i> sp.	24
	Figuras	Página
1.	<i>Chlorococcum littorale</i> observada en el microscopio a 40 X.....	4
2.	<i>Scenedesmus</i> sp. observada en el microscopio a 40X.....	5
3.	Medición de DQO, utilizando el reactor HACH.....	6
4.	Uso de KIT para determinar nitrógeno total y fósforo total.	7
5.	Cultivo de <i>Chlorococcum littorale</i> en agua residual después de lodos activados.	8
6.	Cultivo de <i>Scenedesmus</i> sp. en agua residual después de lodos activados.	8
7.	Cultivo de <i>Chlorococcum littorale</i> en agua residual antes de cloración.....	9

8.	Cultivo de <i>Scenedesmus</i> sp. en agua residual antes de cloración.	9
9.	Cultivo de <i>Scenedesmus</i> sp.	10
10.	Cuantificación de carbohidratos por el método colorimétrico.	11
11.	Cuantificación de lípidos por el método colorimétrico.	11
12.	Cuantificación de proteínas por el método colorimétrico.	12
13.	Peso seco de <i>Chlorococcum littorale</i> en las disoluciones de agua residual después de lodos activados.	14
14.	Peso seco de <i>Chlorococcum littorale</i> en las disoluciones de agua residual antes de cloración.	15
15.	Peso seco de <i>Scenedesmus</i> sp. en las disoluciones de agua residual después de lodos activados	16
16.	Peso seco de <i>Scenedesmus</i> sp. en las disoluciones de agua residual antes de cloración.	17
17.	Cuantificación de Carbohidratos de <i>Chlorococcum littorale</i>	25
18.	Cuantificación de Carbohidratos de <i>Scenedesmus</i> sp.	26
19.	Cuantificación de carotenoides de <i>Chlorococcum littorale</i>	26
20.	Cuantificación de carotenoides de <i>Scenedesmus</i> sp.	27
21.	Cuantificación de lípidos de <i>Chlorococcum littorale</i>	28
22.	Cuantificación de lípidos de <i>Scenedesmus</i> sp.	29
23.	Cuantificación de proteínas de <i>Chlorococcum littorale</i>	30
24.	Cuantificación de proteínas de <i>Scenedesmus</i> sp.	30

Anexos

Página

1.	Medición de pH con potenciómetro.	39
2.	Medición de Demanda Química de Oxígeno (DQO) por el método 8000 Hach	40
3.	Medición de nitrógeno total mediante el KIT TNT 827 Hach.	41
4.	Medición de fósforo total mediante el KIT TNT 844 Hach	42
5.	Medición de Metales por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP masas).	43
6.	Medio MC	44
7.	Medio BG-11	45
8.	Medio 3N-BBM+ V	46
9.	Cuantificación de lípidos mediante método colorimétrico	47
10.	Cuantificación de carbohidratos mediante método colorimétrico.	48
11.	Cuantificación de carotenoides mediante método colorimétrico.	49
12.	Cuantificación de proteínas mediante el KIT 23240 de Thermo Scientific, Modified Lowry Protein Assay Kit.	50

1. INTRODUCCIÓN

El agua residual se define como el agua proveniente en forma de desecho de un proceso previo (Rodríguez & Durán de Bazúa, 2006). La extracción de agua potable en el mundo es de 3918 km³ por año y alrededor del 80%, es descargada sin tratamiento alguno en aguas superficiales (Corcoran, Nellesmann, & Baker, 2010; Food and Agriculture Organization [FAO], 2014).

Se estima que en México en descargas municipales al año, se obtienen 7.26 hm³ de aguas residuales, de las cuales solo se tratan 3.34 hm³. El agua tiene una carga contaminante de 1.96 millones de toneladas de demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅) y solo en los tratamientos residuales se logra remover 0.73 millones de toneladas de DBO₅. La DBO₅ indica la cantidad de oxígeno que necesita los microorganismos existentes en el agua, y con su reducción se estabiliza el contenido orgánico (Comisión Nacional del Agua, 2014).

La clasificación de las aguas residuales se hace dependiendo del origen de la contaminación, existen de origen natural y de origen antropogénico. Las aguas contaminadas de manera natural mayormente son de contaminantes existentes en el suelo como los minerales y sales. Las aguas residuales de origen antropogénico, se dividen en tres sectores principales: el industrial, el urbano o de lugares residenciales y el de agricultura y ganadería (Barba, 2002).

Las características generales del agua residual se dividen en aspectos físicos, químicos y biológicos. Las aguas residuales urbanas muestran diferentes características: el color varía de negro a café claro. El olor depende de los componentes químicos como ácido sulfhídrico, 2-3 Benzopirrol e Indol y del grado de descomposición de la materia orgánica. La temperatura del agua residual varía entre los 15 °C y los 20 °C. Los sólidos totales están relacionados con el tipo de residuos que se han vertido en el agua y afectan la vida de los organismos, por medio de la disminución de las tasas de fotosíntesis de las algas o bacterias. Así como, el aumento de depósitos por sedimentación provocando ambientes anóxicos y la afección a las branquias de los peces, provocándoles asfixia (Déniz, 2010).

Entre la composición química del agua residual urbana se encuentra: la materia orgánica, el nitrógeno, el fósforo, el cloro, el sulfuro así como aceites y grasas. El valor de pH es de alrededor de 7.5 en algunas plantas de tratamiento. Así como la cantidad total de carbono es de 113 mg L⁻¹, el nitrógeno total es de 110 mg L⁻¹, y el fósforo totales de 5.3 mg L⁻¹ (Jiang et al., 2011).

Entre los contaminantes biológicos se pueden encontrar bacterias coliformes totales y fecales, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus* sp, *Salmonella* sp. También se encuentran protozoos y helmintos (Déniz, 2010). Estas características son importantes debido al impacto que tiene la descarga del agua sin recibir tratamientos a efluentes limpios.

El tratamiento de aguas residuales se divide en tratamientos físico-químicos, avanzados y biológicos. Entre los tratamientos físico- químico se encuentran el ozono, el peróxido, la cloración, la adsorción por carbón activado y la luz ultravioleta. Los tratamientos avanzados abarcan la osmosis inversa, la ultrafiltración, la nano filtración, la oxidación avanzada y el birreactor de membrana. Por último, los métodos biológicos incluyen el tratamiento por lodos activados, humedales, filtros biológicos y la biorremediación (Miceli, Nájera, Rojas, Quintero, & Orantes, 2014).

La biorremediación de aguas residuales se entiende como la degradación de contaminantes basada en la capacidad de organismos potencialmente identificados para reducir contaminantes (Amores, Terrón, Gonzáles, & Gonzáles, 2015). Esta opción para el tratamiento de aguas residuales ha sido aceptada debido a su efectividad de no afectar al medio ambiente, es barata en comparación con los tratamientos químicos y reduce la toxicidad del agua (Luka, Usman, Tya, & Joseph, 2014).

Para la reducción de materiales oleaginosos ha sido empleada la cianobacteria *Anabaena azollae*. Para la disminución de materia orgánica se ha utilizado la bacteria *Aeromonas hydrophilia* con un 42.86% de reducción de DBO en 72 horas. Y *Bacillus licheniformis* con un 82.76% de demanda química de oxígeno (DQO) en 72 horas (Sonune & Garode, 2015). Se ha determinado que las especies de algas como *Botryococcus braunii* y *Scenedesmus rubescens* logran reducir hasta 1.8 mg/L de fósforo en el agua (Aravantinou, Theodorakopoulos, & Manariotis, 2013). También *Chlorella* sp. puede reducir hasta el 76% de cadmio y 78% de níquel (Rehman & Shakoori, 2004).

Las microalgas han sido utilizadas también para procesos de biorremediación. Entre su utilidad se encuentran: remoción de los contaminantes y nutrientes del agua residual. También la eliminación de nutrientes y compuestos xenobióticos con la ayuda de absorbentes a base de algas, tratamiento de aguas ácidas y con contenido de metales, captura de dióxido de carbono (CO₂), así como la detección de compuestos tóxicos utilizando biosensores a base de algas (Rawat, Ranjith, Mutanda, & Bux, 2011).

Entre las ventajas de aplicar algas en la remediación de medios contaminados se encuentran: el bajo costo de la implementación, al aplicarse no producen sustancias tóxicas, la reducción de los sólidos totales disueltos y el aumento del oxígeno disuelto en el medio (Gani et al., 2015).

Las microalgas son organismos eucariotas, que normalmente poseen un flagelo que permite su movilidad, contienen un núcleo y cloroplastos que les permiten realizar la fotosíntesis. Además, su metabolismo puede ser autótrofo, heterótrofo y mixotrófico (Bhatnagar, Chinnasamy, Singh, & Das, 2011).

Las microalgas se han empleado en la biorremediación debido a que son organismos capaces de realizar el proceso de la fotosíntesis capturando carbono de la atmósfera y son diez veces más eficientes que la biomasa terrestre (Usui & Ikenouchi, 1997). Además, de que metabólicamente necesitan grandes cantidades de nitrógeno y fósforo para la síntesis de sus proteínas funcionales (Rawat et al., 2011). La remoción de nutrientes como el nitrógeno y el fósforo está directamente relacionada con la cantidad de producción de biomasa de las algas (Sydney et al., 2011). El carbono existente en las algas es de

aproximadamente el 50% de su peso, es por eso que se necesitan 1.8 kg de CO₂ para producir 1 kg de biomasa (Amaro, Guedes, & Malcata, 2011).

La biomasa absorbe alrededor del 3 al 6% del CO₂ producido por combustibles fósiles en el mundo (Hutchinson, Campbell, & Desjardins, 2007). Esta propiedad convierte a la biomasa en un gran elemento contra el cambio climático. El crecimiento de la biomasa algal resultado de la fijación de CO₂, puede utilizarse para diversos fines como la producción de biodiesel, materiales para construcción o compuestos químicos (Murakami & Ikenouchi, 1997). El uso de micro algas en la biorremediación, es una manera de reciclar el CO₂ producido por el uso de combustibles fósiles y convertirlo en combustibles como el hidrógeno (H) (Skjanes, Lindblad, & Muller, 2007).

Se ha comprobado que el agua residual residencial es una buena fuente de nutrientes para las micro algas, debido a su alto contenido en nitrógeno y fósforo (Wang et al., 2009). Sin embargo, esta debe tratarse antes con procesos que logren eliminar o reducir la cantidad de bacterias y flora microbiana que pueda afectar el crecimiento y acción de las micro algas (Subhadra, 2011).

El agua que se utiliza para el crecimiento de las algas debe tener características específicas que permita que los microorganismos se desarrollen, por ejemplo el pH siendo el parámetro químico que influye en la adsorción de nutrientes (Dwivedi, 2012). También, se debe tener la temperatura controlada en todo momento, sales, vitaminas, oxígeno y suficiente sustrato el cual debe contener proteínas (Williams, 2002).

Chlorococcum littorale pertenece a la familia *Chlorococcaceae*. Es un alga unicelular, mide alrededor de 4 a 11 µm. Posee cloroplastos, y su reproducción la realiza por zoosporas. La morfología del alga puede observarse en la Figura 1. Es una especie marina, por lo cual, soporta concentraciones de cloruro de sodio de 1.5% a 9%, pero el porcentaje de sal en donde hay mayor crecimiento es de 1.5%. Puede crecer en una temperatura de 15 a 28 °C. El pH debe estar por encima de 4. También soporta hasta 60% de concentración de CO₂ (Chihara, Nakayama, Inouye, & Kodama, 1994).

Se han realizado estudios para la extracción de la enzima hidrogenasa, de la cual se pueden obtener hasta 629.6 mg (Ueno, Kurano, & Miyachi, 1999). La cantidad de lípidos que pueden contener es del 34% (Ota et al., 2011).

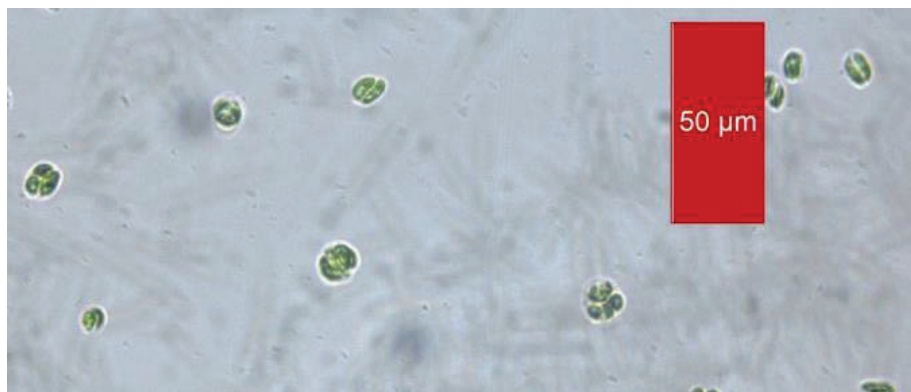


Figura 1. *Chlorococcum littorale* observada en el microscopio a 40 X.

Scenedesmus sp. pertenece al reino plantae, a la clase Chlorophyceae y a la familia *Scenedesmaceae*. La temperatura ideal para su crecimiento es de 23°C (Tu et al., 2015). Soporta temperatura hasta de 32 °C (Chen et al., 2014). La incubación se puede realizar a 26 °C en un agitador a 125 rpm (Xu, Shen, & Chen, 2015). También se necesita un tiempo de fotoperíodo de aproximadamente 14 horas de luz (Ruiz et al., 2014).

Tiene células alargadas y ovales, pared celular lisa y cloroplastos parietales (Fanés, 2009). La morfología del alga puede observarse en la Figura 2. Contiene gran porcentaje de aminoácidos y proteína de 25 y 65% y resiste pH hasta de 4 (Quevedo, Morales, & Acosta, 2008). Tolera pH mayores, como de 9.2 (Álvarez et al., 2015). Además por medio de centrifugación de biomasa se ha determinado que posee el 45% de aceite en su estructura (Demirbas, 2011; Zhang, Zhang, Zhuang, & Zhou, 2014). Incluso se utiliza en suplementos alimenticios actualmente, ya que se cree que ayuda en el control de la obesidad, normaliza la relación entre la glucosa e insulina en el organismo y ayuda en el control de la hipertensión (Kumar et al., 2015).

La producción de biomasa es de 217.5 mg L⁻¹ d⁻¹ (Cuellar et al., 2015). El crecimiento en agua esterilizada es de 10.18 × 10⁶ cells ml⁻¹ (Durvasula et al., 2015). Lo cual se determina mediante la cinética de crecimiento mediante espectrofotometría a 680 nm (Sacristán de Alva et al., 2013).

Scenedesmus sp. ha sido utilizada para la reducción de cromo en aguas residuales con una efectividad del 10.4% (Pellón et al., 2003). Remueve alrededor del 50% de nitrógeno, 12.8% de lípidos, 27.4% de carbohidratos en una muestra diluida de aguas residuales a un 50% de pureza (Voltolina et al., 1998).

La remoción de carbono orgánico total aplicando es de 74% de CO₂ (Ji et al., 2015). La rapidez de remoción del fósforo es de 55% en 216 horas (González, Cañizares, & Baena, 1997). También se ha determinado que es capaz de tolerar alrededor de 0.5 mg/L a 2 mg/L de cobre, níquel, cadmio y zinc (Shehata & Badr, 1980). Se comprobó que puede remover 99% de los coliformes totales en una muestra (Kumar et al., 2015). Además, logra reducir hasta 91% de cloruros (Lekshmi et al., 2015).

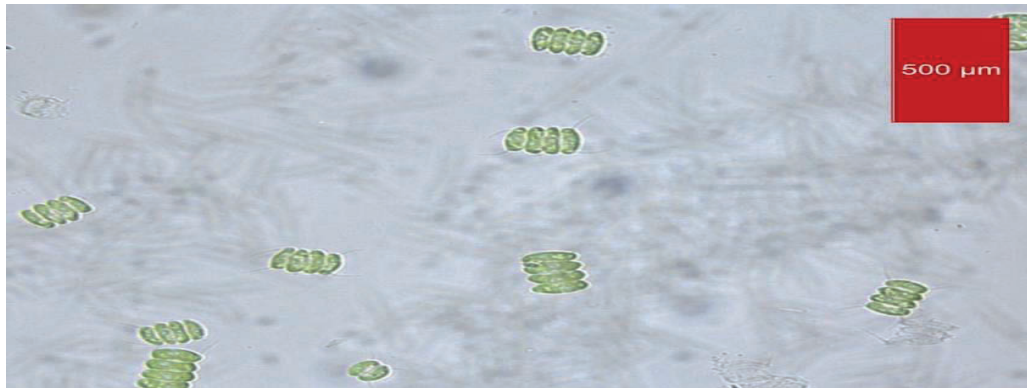


Figura 2. *Scenedesmus* sp. observada en el microscopio a 40X.

En este estudio el agua colectada fue de la planta de tratamiento “Dulces Nombres” ubicada en el estado de Nuevo León, México. Esta planta recibe agua de la zona urbana de Monterrey. En donde se sigue el siguiente proceso para tratar las aguas residuales: el agua cruda llega a la planta y pasa por la caja de recepción, después pasa por rejillas para separar la basura que pueda traer, después va al desarenador y posteriormente al clarificador primario. El agua pasa al reactor biológico y después al clarificador secundario. Al final se le realiza una cloración y es vertida en el río Pesquería.

En este estudio se pretendió analizar la efectividad de las micro algas *Chlorococcum littorale* y *Scenedesmus* sp. para la reducción de contaminantes y determinar la potencialidad para obtener productos de alto valor económico. Sin embargo, para realizar el tratamiento de aguas residuales utilizando micro algas de una manera eficiente, es necesario conocer las características físicas, químicas y biológicas del agua residual. Debido a que estas características pueden afectar el crecimiento de las microalgas.

El estudio buscó la generación de información acerca de la capacidad que tienen las algas para reducir la contaminación de aguas residuales y buscar alternativas a los métodos químicos que se utilizan en las plantas de tratamiento de aguas residuales. El agua se colectó en la planta de tratamiento “Dulces Nombres” debido a que es la planta de tratamiento de aguas residuales que recibe más del 50% del agua residual producida en la ciudad de Monterrey.

Los objetivos de este estudio fueron: i) Caracterizar las propiedades químicas y físicas del agua residual de tipo urbana de la ciudad de Monterrey, Nuevo León, México. ii) Determinar la disolución más apropiada de medio de crecimiento y agua residual para la reducción de contaminantes con el cultivo de *Chlorococcum littorale* y *Scenedesmus* sp. iii) Evaluar la efectividad individual de *Chlorococcum littorale* y *Scenedesmus* sp. en el tratamiento de agua residual. iv) Caracterizar la biomasa cuantificando la cantidad de carbohidratos, carotenoides, lípidos y proteínas que producen las algas en estas condiciones.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización del agua residual. Recolección de muestras: se tomaron dos muestras de agua residual de la planta tratadora de agua de Monterrey “Dulces Nombres” en envases de plásticos estériles, después del tratamiento de lodos activados y antes de la cloración, transportados hasta el laboratorio en un contenedor hermético y aislante. El agua residual se almacenó a 4 °C.

Para la caracterización de las propiedades físicas y químicas del agua residual se realizó la toma de los datos: pH con potenciómetro (Anexo 1), demanda química de oxígeno (DQO) mediante el método 8000 Hach (Figura 3 y Anexo 2), nitrógeno total mediante el kit TNT 827 de Hach (Anexo 3), fósforo total mediante el kit TNT 844 de Hach (Figura 4 y Anexo 4), sodio, estroncio y magnesio por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP masas y Anexo 5).



Figura 3. Medición de DQO, utilizando el reactor HACH.

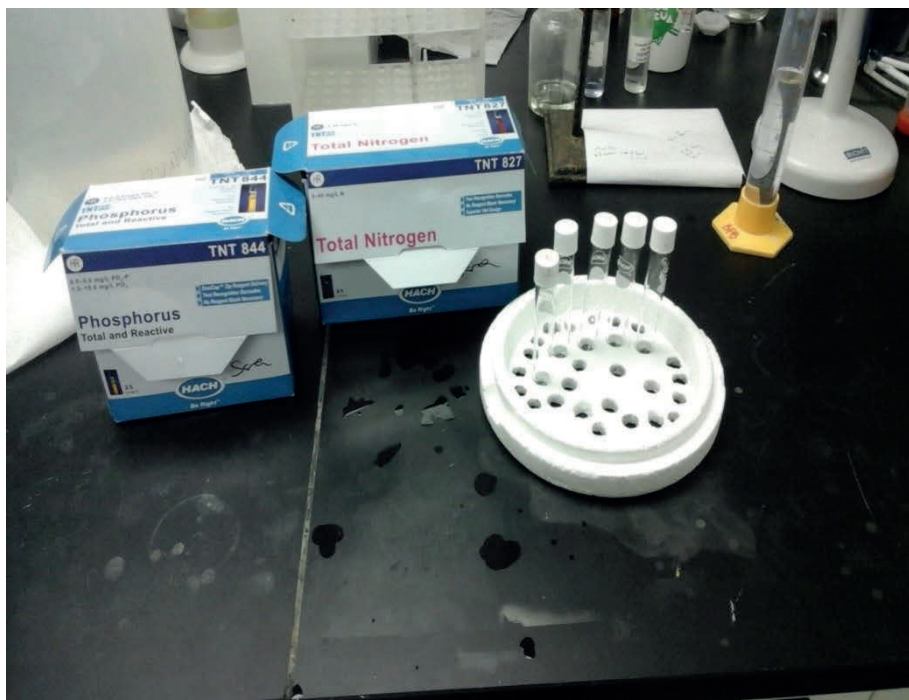


Figura 4. Uso de KIT para determinar nitrógeno total y fósforo total.

Cultivo del inóculo de microalga en medios óptimos. Las algas fueron compradas en la Universidad de Austin Texas. Se inoculó en una campana de flujo laminar, 200 μ L de alga en 200 ml de medio de cultivo pre establecido hasta que se alcanzó la densidad óptica mayor a 1 a 750 nm. El medio de cultivo para *Chlorococcum littorale* fue MC (Anexo 6) y para *Scenedesmus* sp. fue BG-11 (Anexo 7).

Cultivo de las microalgas en agua residual. Una vez obtenida la densidad óptica apropiada, se colocaron matraces de 250 ml con 150 ml de volumen útil, a diferentes concentraciones de medio de cultivo y agua residual a fin de determinar la concentración óptima. Para la suplementación de las seis diluciones volumétricas se utilizó la técnica de aforar.

Los medios de cultivo utilizados para las disoluciones fueron 3N BBM + V (Anexo 8) para *Scenedesmus* sp. y MC (Anexo 6) para *Chlorococcum littorale*. El agua residual fue decantada ocupando conos imhoff por 48 horas. Después, se inoculó 15 ml de cada alga en 135 ml de cada dilución.

Se realizaron seis tipos de diluciones divididas en dos bloques. Una de las muestras fue de 100% medio de cultivo. De cada tipo de disolución existió una réplica, para evitar la variabilidad extrema de los datos.

Bloque 1: Agua residual después de lodos activados (Figura 5 y 6):

- 25% agua residual, 75 % medio de cultivo (34 ml de agua residual, 101 de medio de cultivo y 15 ml de inóculo)
- 50% agua residual, 50% medio de cultivo (67.5 ml de agua residual, 67.5 de medio de cultivo y 15 ml de inóculo)
- 75% agua residual, 25% medio de cultivo (101 ml de agua residual, 34 ml de agua residual y 15 ml de inóculo)



Figura 5. Cultivo de *Chlorococcum littorale* en agua residual después de lodos activados.

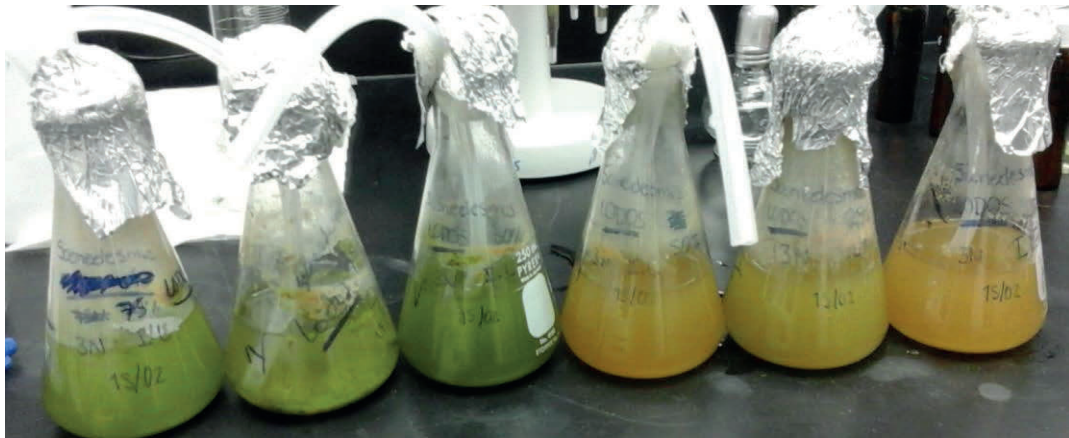


Figura 6. Cultivo de *Scenedesmus* sp. en agua residual después de lodos activados.

Bloque 2: Agua residual antes de cloración (Figura 7 y 8):

- 25% agua residual, 75 % medio de cultivo (34 ml de agua residual, 101 de medio de cultivo y 15 ml de inóculo)
- 50% agua residual, 50% medio de cultivo (67.5 ml de agua residual, 67.5 de medio de cultivo y 15 ml de inóculo)
- 75% agua residual, 25% medio de cultivo (101 ml de agua residual, 34 ml de agua residual y 15 ml de inóculo)

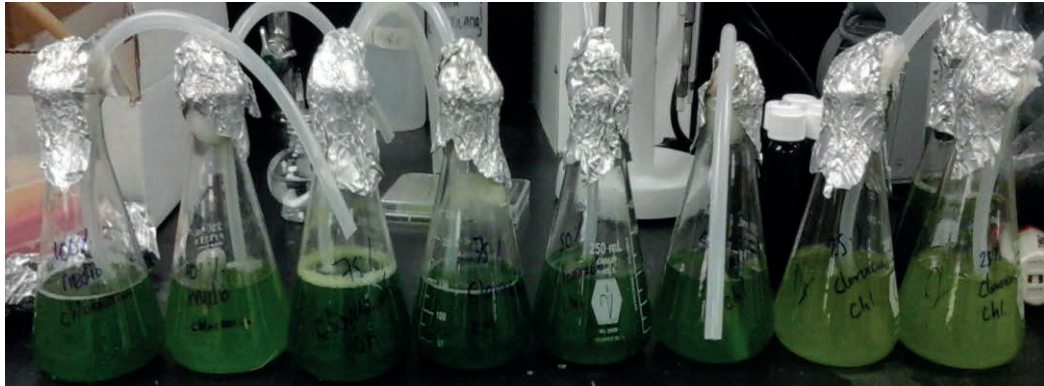


Figura 7. Cultivo de *Chlorococcum littorale* en agua residual antes de cloración.

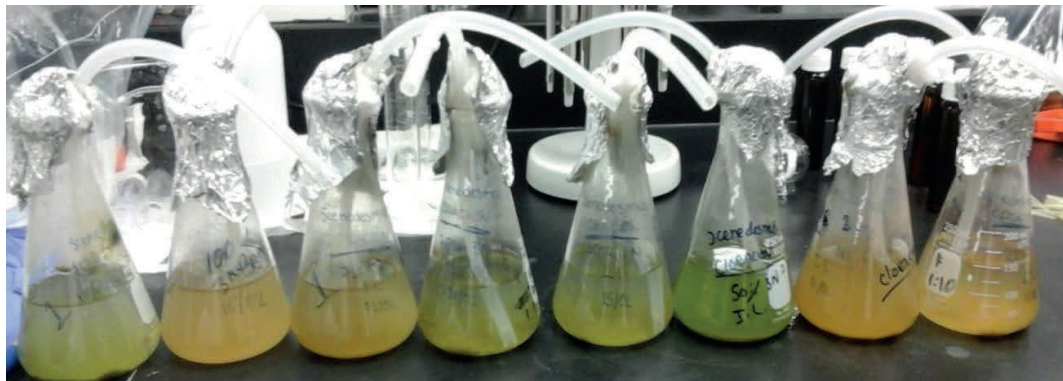


Figura 8. Cultivo de *Scenedesmus* sp. en agua residual antes de cloración.

Parámetros a monitorear durante el cultivo. Los matraces Erlenmeyer se colocaron con bombas de aire marca OPTIMA de 4.5 Watt, con un filtro de 0.2 μm y con un fotoperíodo 12:12 con lámparas marca hydrogrow extreme LED, procurando que las condiciones no cambiaran durante todo el experimento (Figura 9). Restituyendo el agua que se evaporó con agua bidestilada. Se obtuvo una cinética de crecimiento realizando mediciones de densidad óptica diarias a 750 nm, con lo cual se obtuvo una curva de crecimiento. Se midió hasta la fase estacionaria y de descenso, determinadas hasta que la curva se mantuvo estable formando una línea recta y comenzaron a bajar los valores.



Figura 9. Cultivo de *Scenedesmus* sp.

La disolución adecuada para el crecimiento se determinó con las mediciones de densidad óptica (OD), es decir la que obtuvo la lectura más alta de densidad óptica en el tiempo de crecimiento, la cual se transformó en gramos de biomasa por litro de cultivo por medio de las ecuaciones de peso seco 1 y 2 predeterminadas en experimentos anteriores, la cual se obtiene de pesar un volumen de 100 ml de alga a diferentes densidades ópticas. Este procedimiento se desarrolló para cada microalga.

Para la microalga *Chlorococcum littorale* se utilizó la siguiente ecuación:

$$DW \text{ Chlorococcum littorale} = (0.7381 \times OD) - 0.0951 \quad [1]$$

DW= gramos de biomasa seca por litro de cultivo (g/L)

OD= densidad óptica promedio obtenida en el espectrofotómetro

Para la microalga *Scenedesmus* sp. se utilizó la siguiente ecuación:

$$DW \text{ Scenedesmus sp.} = (0.7859 \times OD) - 0.0132 \quad [2]$$

DW= gramos de biomasa seca por litro de cultivo (g/L)

OD= densidad óptica promedio obtenida en el espectrofotómetro

Herrera (2015) determinó las ecuaciones planteadas anteriormente.

Para evaluar la efectividad del tratamiento se determinaron nuevamente todos los parámetros físicos y químicos (pH, DQO, fósforo total y nitrógeno total) que se analizaron al inicio utilizando los mismos métodos, esto se hizo a los 10 días del experimento y a los 17 días para *Chlorococcum littorale* y a los 25 días para *Scenedesmus* sp. Cada muestra se centrifugó a 4000 rpm por 15 minutos, con el objetivo de separar el alga de la muestra y realizar los análisis.

La biomasa producida se analizó en diferentes fracciones, para obtener el rendimiento de las algas. La caracterización de carbohidratos (Figura 10), lípidos (Figura 11) y carotenoides se desarrolló mediante métodos colorimétricos cuyo procedimiento se describe en los anexos 9, 10 y 11, y proteínas mediante el KIT 23240 de Thermo Scientific, Modified Lowry Protein Assay Kit (Figura 12 y Anexo 12).



Figura 10. Cuantificación de carbohidratos por el método colorimétrico.

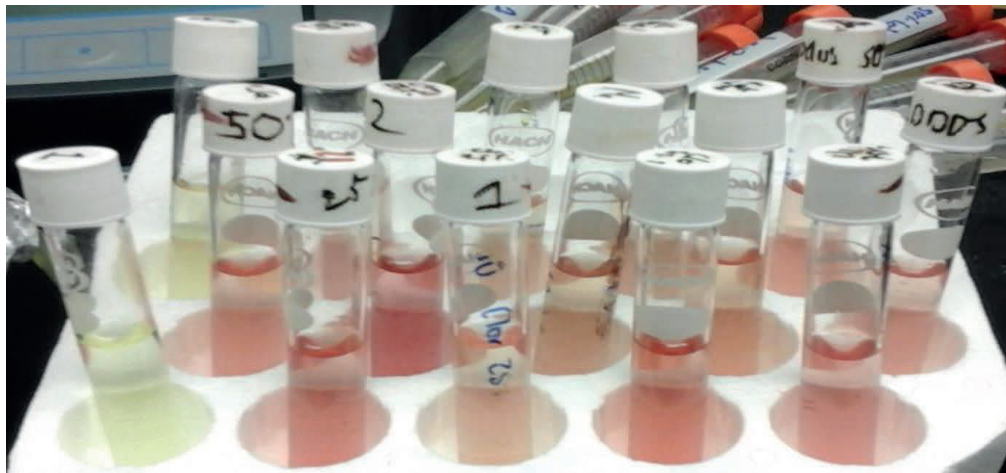


Figura 11. Cuantificación de lípidos por el método colorimétrico.

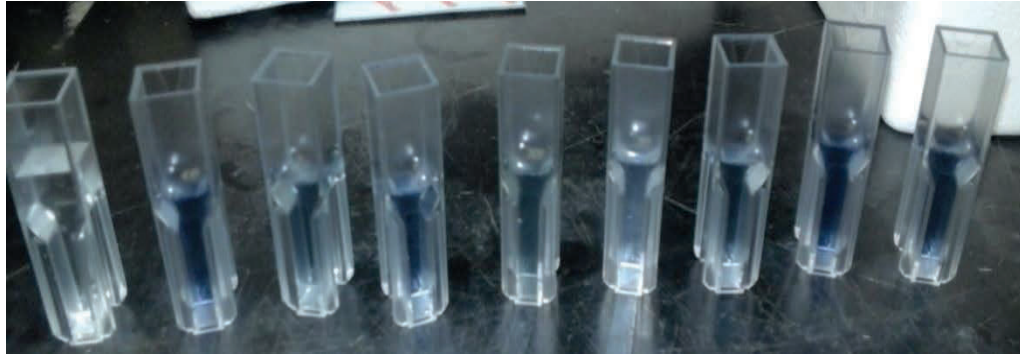


Figura 12. Cuantificación de proteínas por el método colorimétrico.

Las pruebas estadísticas realizadas fueron ANOVA y Tukey en el programa SPSS, versión 19.0 con el fin de determinar si los resultados fueron estadísticamente significativos entre ellos. En el caso de los parámetros físicos y químicos del agua (pH, DQO, fósforo total y nitrógeno total), se hizo la prueba con los resultados del día cero, con los resultados del día 10 y el día 17 o 25, según fuera el caso. En el caso de la caracterización de la biomasa (Carbohidratos, carotenoides, lípidos y proteínas) se determinó comparando la muestra de 100% medio y las demás disoluciones. En los resultados que si fueron estadísticamente diferentes, se hizo una prueba de Tukey para conocer que disolución tuvo mejores resultados, es decir, que resultados eran más diferentes entre ellos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de las variables físicas y químicas de las muestras obtenidas de la planta de tratamiento expresan valores muy diferentes en ambos tipos de efluentes, especialmente en los parámetros de DQO y fósforo total (cuadro 1).

Cuadro 1. Caracterización de aguas residuales.

Agua residual	Parámetro			
	pH	DQO (mg/L)	Fósforo total (mg/L-PO ₄)	Nitrógeno total (mg/L-N)
Agua residual después de lodos activados	7.75	260	23.00	6.5
Agua residual antes de cloración	8.17	95	0.45	4.5

Todas las variables analizadas bajan en la caracterización de aguas residuales antes de cloración en comparación al agua residual después de lodos, debido a que el agua pasa por un clarificador después del proceso de lodos activados. Lo que permite que el agua se decante, separando los lodos activados del agua residual en gran medida (Keefer & Meisel, 1951).

La caracterización de aguas residuales de la planta “Dulces Nombres”, está dentro de las normas de la república mexicana, ya que los valores están por debajo del valor permisible (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales y Pesca [SEMARNAT], 1996). Aun cuando esto sucede, la importancia del estudio radica en bajar aún más los niveles de contaminantes y aprovechar el recurso antes de verterlo a un efluente.

Curva de peso seco de *Chlorococcum littorale*. La realización de la curva de peso seco de *Chlorococcum littorale* fue mediante la ecuación 1.

En este bloque de disoluciones la mejor disolución se observó en la mezcla 75% medio 25% de agua residual después de lodos, esta disolución tuvo técnicamente los mismos resultados que la muestra de 100% medio de cultivo. La disolución que obtuvo menos resultados fue la disolución de 50% medio de cultivo y 50% de agua residual después de lodos (Figura 13).

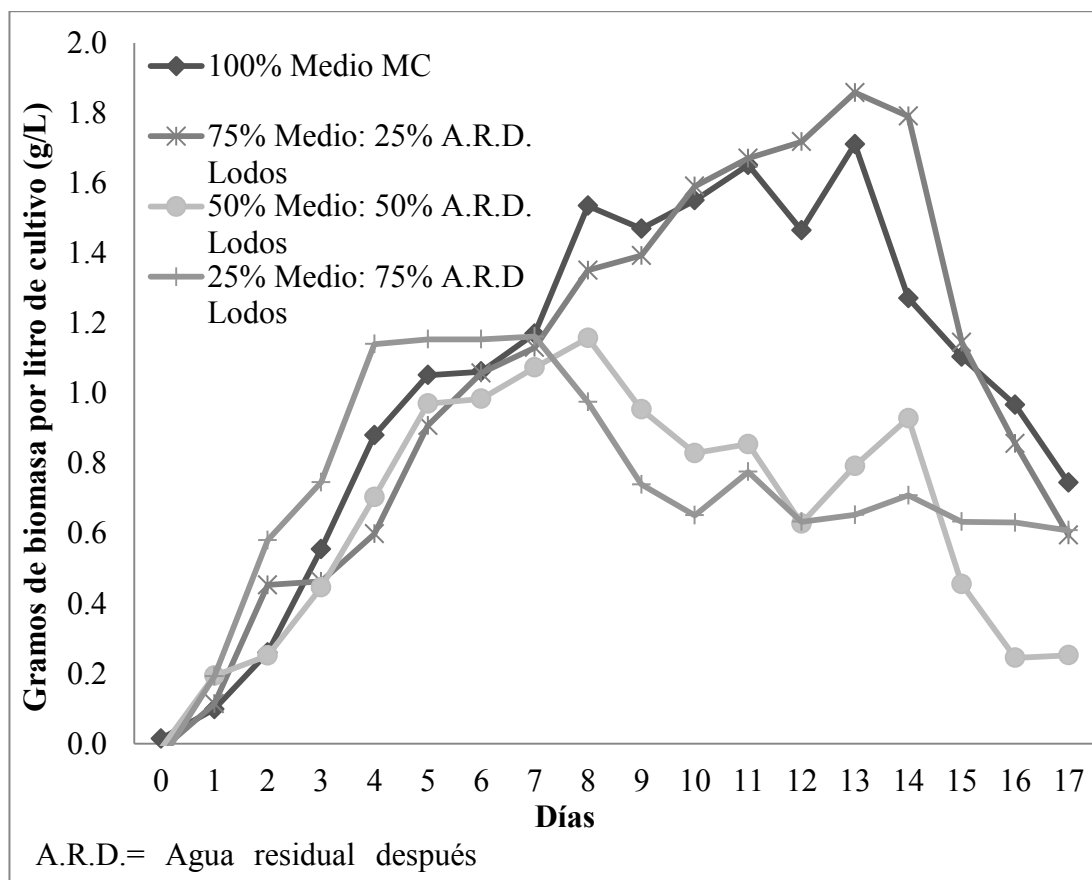


Figura 13. Peso seco de *Chlorococcum littorale* en las disoluciones de agua residual después de lodos activados.

En este bloque de disoluciones la mejor disolución se observó en la mezcla 50% medio 50% de agua residual antes de cloración, esta disolución tuvo técnicamente los mismos resultados que la muestra de 100% medio de cultivo (Figura 14).

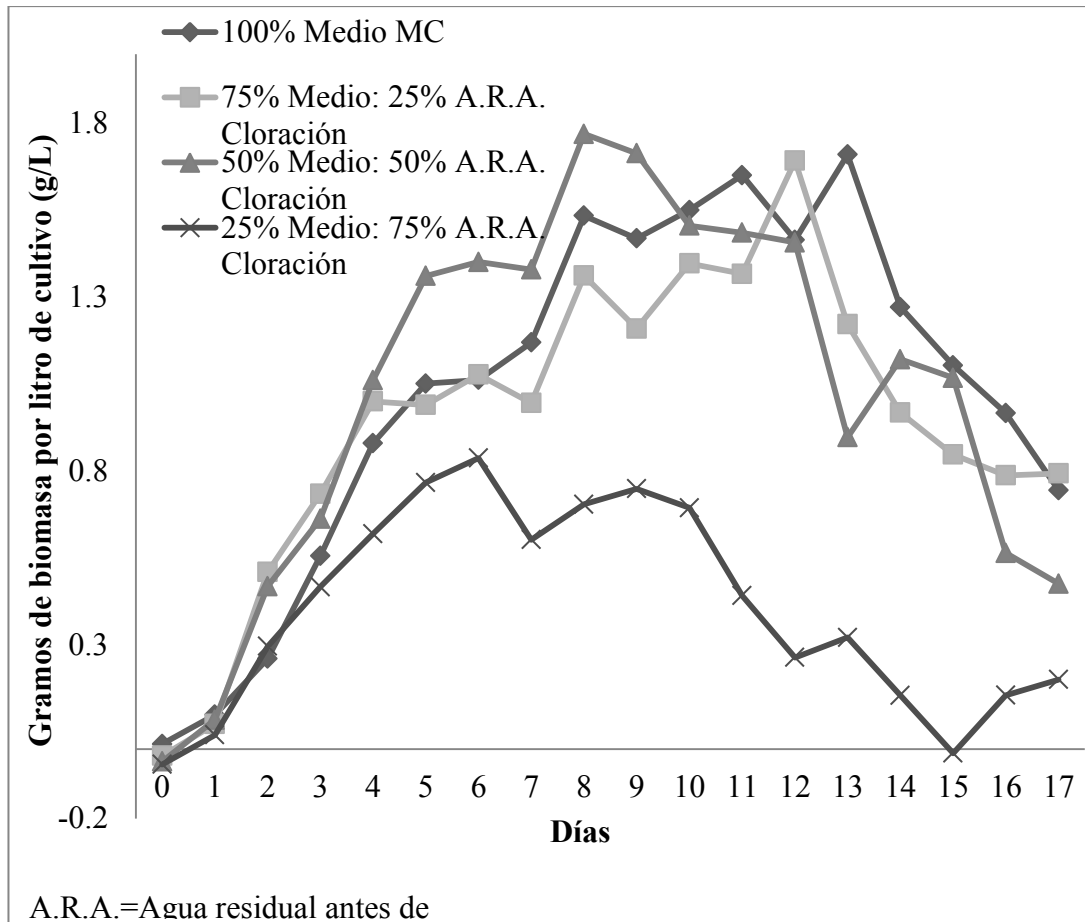


Figura 14. Peso seco de *Chlorococcum littorale* en las disoluciones de agua residual antes de cloración.

En cuanto al crecimiento de la biomasa de la especie *Chlorococcum littorale* se manifestó de una mejor manera en la dilución de 75% medio MC y 25% de agua residual después de lodos activados, consiguiendo un 1.8 g/L de biomasa al día 13. La disolución en donde se obtuvo menos crecimiento fue la de 25% medio MC y 75% de agua residual antes de cloración. Con respecto a la disolución del 100% medio MC, la única disolución que supera el crecimiento del alga es la de 75% medio MC y 25% de agua residual después de lodos activados.

En las disoluciones de agua residual después de lodos activados, el mejor resultado se manifiesta en la disolución de 75% medio MC y 25% de agua residual y la disolución en donde se obtuvo menos crecimiento fue en la de 50% de medio MC y 50% de agua residual. En las disoluciones de agua residual antes de cloración el mejor resultado se manifiesta en la disolución de 50% medio MC y 50% de agua residual y la disolución en donde se obtuvo menos crecimiento fue en la de 25% de medio MC y 75% de agua residual.

Curva de peso seco de *Scenedesmus* sp. La realización de la curva de peso seco de *Scenedesmus* sp. fue mediante la ecuación 2.

En este bloque de disoluciones la mejor disolución se observó en la mezcla 75% medio 25% de agua residual después de lodos. La disolución que obtuvo menos resultados fue la muestra de 100% medio de cultivo (Figura 15).

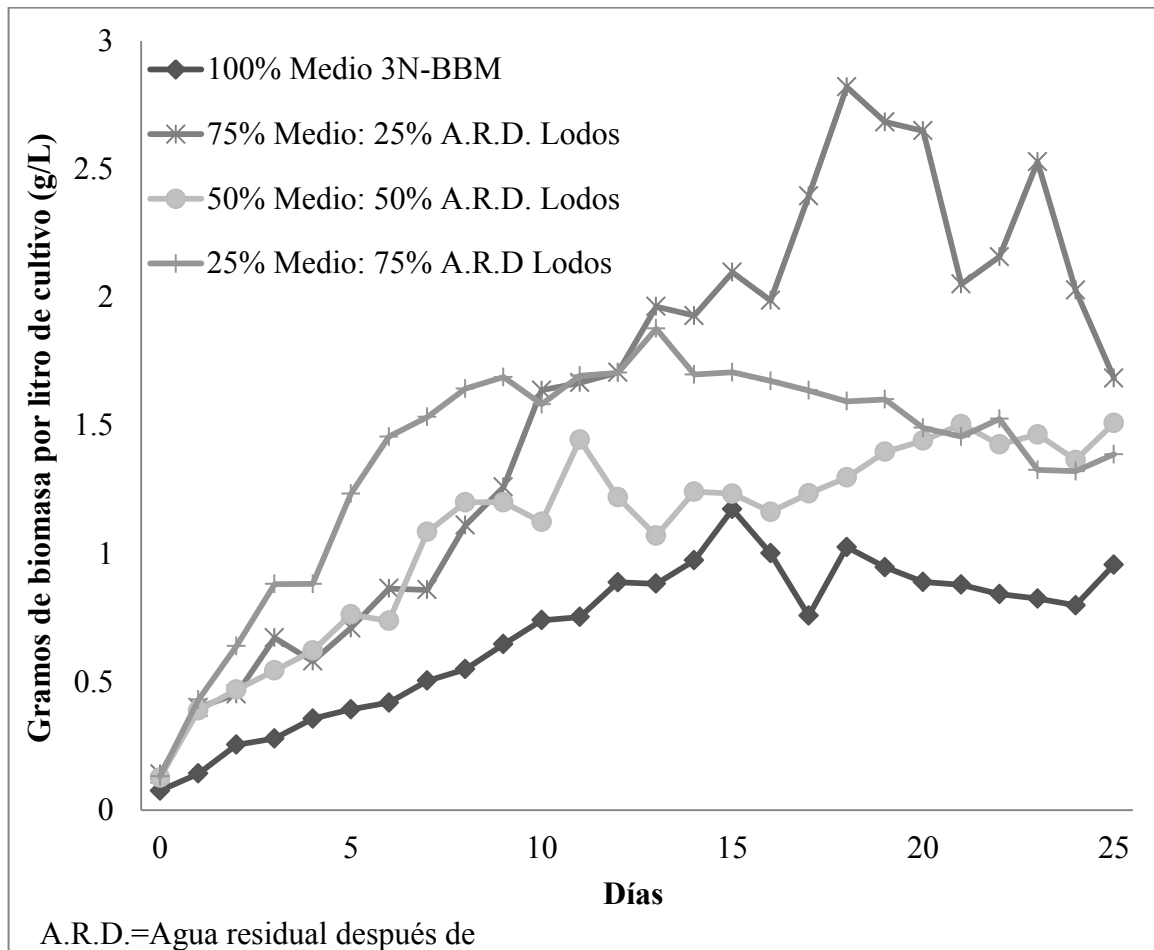


Figura 15. Peso seco de *Scenedesmus* sp. en las disoluciones de agua residual después de lodos activados.

En este bloque de disoluciones la mejor disolución se observó en la mezcla 75% medio 25% de agua residual después de lodos. La disolución que obtuvo menos resultados fue la muestra de 75% medio de cultivo, 24% de agua residual antes de cloración (Figura 16).

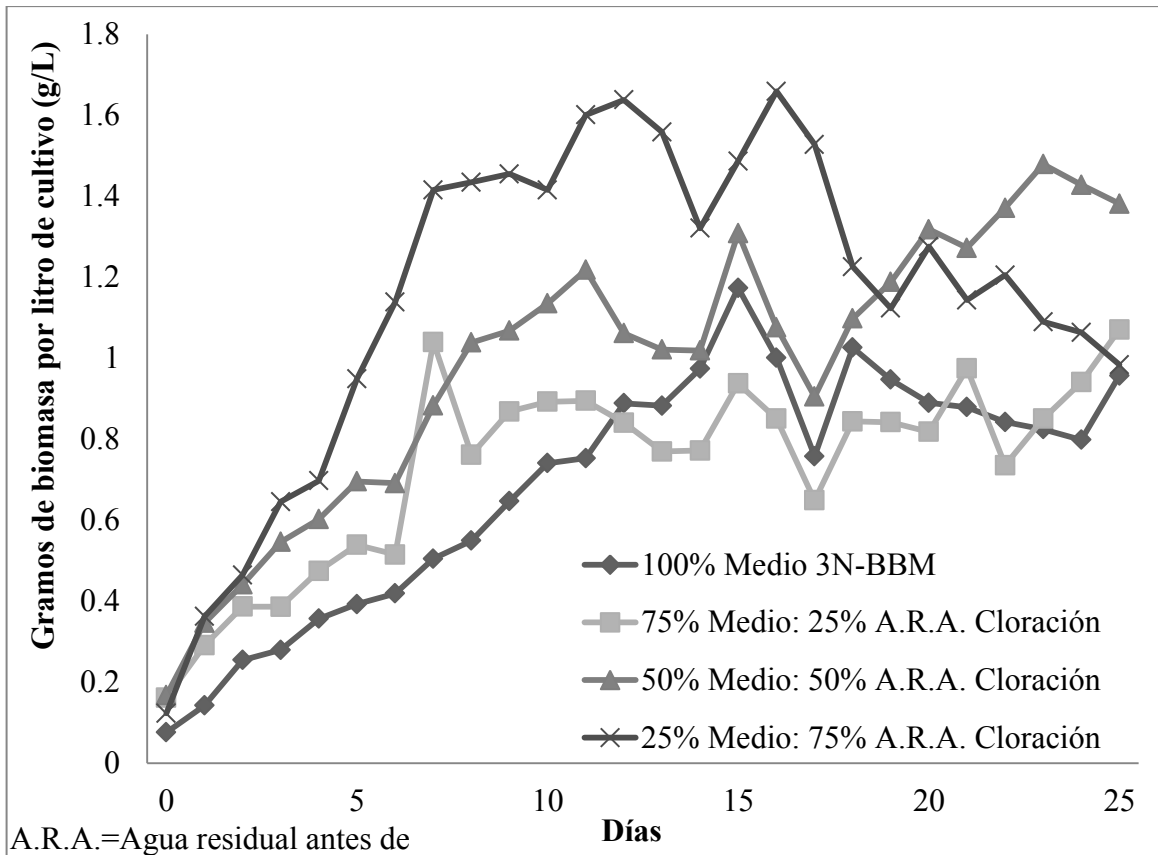


Figura 16. Peso seco de *Scenedesmus* sp. en las disoluciones de agua residual antes de cloración.

En cuanto al crecimiento de la biomasa de la especie *Scenedesmus* sp. se manifestó de una mejor manera en la dilución de 75% medio y 25% de agua residual después de lodos activados, consiguiendo un 2.8 g/L de biomasa al día 18. La disolución en donde se obtuvo menos crecimiento fue la de 75% medio y 25% de agua residual antes de cloración. La mayoría de las disoluciones superaron la respuesta de la disolución de 100% de medio 3N-BBM.

En las disoluciones de agua residual después de lodos activados, el mejor resultado se manifestó en la disolución de 75% medio 3N-BBM y 25% de agua residual y la disolución en donde se obtuvo menos crecimiento fue en la de 50% de medio 3N-BBM y 50% de agua residual. En las disoluciones de agua residual antes de cloración el mejor resultado se manifiesta en la disolución de 25% medio 3N-BBM y 75% de agua residual y la disolución en donde se obtuvo menos crecimiento fue en la de 75% de medio 3N-BBM y 25% de agua residual.

En ambas especies, en la disolución donde se obtuvo mayor biomasa fue porque se tenía la mayor cantidad de fósforo total y nitrógeno total de todo el experimento. Definitivamente, la concentración de estos elementos afecta significativamente el crecimiento de las especies *Chlorococcum littorale* y *Scenedesmus* sp.

Los resultados de las variables físicas y químicas fueron positivos en muchas de las disoluciones (Cuadro 2 al 9), debido a que se encontró una reducción de las variables de DQO, nitrógeno total y fósforo total. Obteniendo en una reducción hasta del 94% en la variable de nitrógeno total en la especie de *Chlorococcum littorale*. El pH se determinó debido a que para descargar a un efluente es necesario que este en un rango de 5 a 10.

Cuadro 2. Medición de pH del experimento de *Chlorococcum littorale*.

Muestra	pH		
	0 días	10 días	17 días
75% Medio: 25% A.R.A. Cloración	8.2	7.42	7.88
50% Medio: 50% A.R.A. Cloración	8.2	7.50	8.21
25% Medio: 75% A.R.A. Cloración	8.2	7.71	8.25
75% Medio: 25% A.R.D. Lodos activados	7.8	7.75	7.75
50% Medio: 50% A.R.D. Lodos activados	7.8	7.54	7.90
25% Medio: 75% A.R.D Lodos activados	7.8	7.49	8.12

En todas las disoluciones se cumple la norma que especifica que el agua residual debe estar en un rango de pH de 5 a 10 (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales y Pesca [SEMARNAT], 1996). Por lo cual, el uso del agua después de la incorporación de las algas es viable. Se hizo un análisis ANOVA, para conocer si existen diferencias significativas entre los resultados. En las muestras que si existieron diferencias significativas, se hizo una prueba de Tukey, comparando el día 0 con el resultado a los 10 y 17 días.

Cuadro 3. Resultados de la prueba Tukey para pH de *Chlorococcum littorale*.

Muestra	ANOVA	Tukey	
		10 días	17 días
75% Medio: 25% A.R.A. Cloración	0.009	0.008	0.095
50% Medio: 50% A.R.A. Cloración	0.006	0.009	0.993
25% Medio: 75% A.R.A. Cloración	0.101	-	-
75% Medio: 25% A.R.D. Lodos activados	0.224	-	-
50% Medio: 50% A.R.D. Lodos activados	0.044	0.208	0.189
25% Medio: 75% A.R.D Lodos activados	0.008	0.047	0.048

Estadísticamente significativo: $P < 0.05$

Donde se observaron más diferencias de pH es a los 10 días, sin embargo a los 17 días, se vuelve a estabilizar el pH y no hay una diferencia significativa con respecto al día 0. El pH se estabilizo conforme la microalga fue consumiendo el medio de cultivo, ya que el pH del medio de cultivo fue de 6 al inicio del experimento. A medida, que la microalga absorbió el medio de cultivo, el pH volvió a aumentar.

El tiempo de centrifugación permitido es de 15 minutos con el fin de que las algas no se dañen, la reducción de DQO en este caso se observa con mayor eficiencia en la solución de 50% medio MC y 50% agua residual después de lodos activados con un 77% de eficiencia a los 17 días (Cuadro 4).

Cuadro 4. Medición de DQO del experimento de *Chlorococcum littorale*.

Muestra	DQO (mg/L)			Eficiencia (%)	
	0 días	10 días	17 días	10 días	17 días
75% Medio: 25% A.R.A. Cloración	95	332	160	-249.47	-68.42
50% Medio: 50% A.R.A. Cloración	95	303	100	-219.47	-5.26
25% Medio: 75% A.R.A. Cloración	95	341	150	-258.95	-57.89
75% Medio: 25% A.R.D. Lodos	260	320	160	-23.08	38.46
50% Medio: 50% A.R.D. Lodos	260	264	60	-1.35	76.92
25% Medio: 75% A.R.D Lodos	260	263	180	-0.96	30.77

Se hizo un análisis ANOVA, para conocer si existen diferencias significativas entre los resultados. En las muestras que si existieron diferencias significativas, se hizo una prueba de tukey, comparando el resultado en el día 0 con el tiempo a los 10 y 17 días (Cuadro 5).

Cuadro 5. Resultados de la prueba Tukey para DQO de *Chlorococcum littorale*.

Muestra	ANOVA	Tukey	
		10 días	17 días
75% Medio: 25% A.R.A. Cloración	0.082	-	-
50% Medio: 50% A.R.A. Cloración	0.038	0.048	0.994
25% Medio: 75% A.R.A. Cloración	0.034	0.034	0.585
75% Medio: 25% A.R.D. Lodos activados	0.029	0.262	0.089
50% Medio: 50% A.R.D. Lodos activados	0.000	0.801	0.000
25% Medio: 75% A.R.D Lodos activados	0.003	0.980	0.004

Estadísticamente significativo: $P < 0.05$

Se observaron más diferencias de DQO es en la comparación de 0 días y 17 días, en las disoluciones de medio MC y el agua residual después de lodos activados. El aumento de la DQO, se debe a que a que *Chlorococcum littorale* es una alga relativamente pequeña, y no se pudo separar por completo ya que cuando se realiza la centrifugación para hacer los análisis, no se puede colocar por más de 15 minutos, pues la biomasa se empieza a degradar. Este problema se presentó en especial a los 10 días ya que la cantidad de biomasa es mucha, y a los 17 días se reduce por que la cantidad de biomasa baja, sin contar la absorción que realiza la microalga. La mayor reducción de fósforo total se observó en la disolución de 75% de medio MC y 25% de agua residual después de lodos activados, con un 57% de remoción a los 17 días (Cuadro 6).

Cuadro 6. Medición de fósforo total (mg/L PO₄) del experimento de *Chlorococcum littorale*.

Muestra	Fósforo total (mg/L PO ₄)			Eficiencia (%)	
	0 días	10 días	17 días	10 días	17 días
75% Medio: 25% A.R.A. Cloración	68.7	49.5	44.1	27.9	35.7
50% Medio: 50% A.R.A. Cloración	46.0	47.8	39.2	-3.9	14.7
25% Medio: 75% A.R.A. Cloración	23.2	34.4	25.8	-48.1	-11.3
75% Medio: 25% A.R.D. Lodos	91.3	48.6	39.6	46.7	56.5
50% Medio: 50% A.R.D. Lodos	68.5	48.6	38.7	29.0	43.4
25% Medio: 75% A.R.D Lodos	45.8	42.1	32.9	8.0	28.1

Debido a que el crecimiento de la microalga está directamente relacionado con la concentración de fósforo total, no es extraño observar que esta disolución es la que realiza más remoción de fósforo total. Debido a que existió más biomasa en esta concentración, hubo más absorción de este elemento. En los resultados de la prueba ANOVA en todas las disoluciones existieron diferencias significativas entre el día cero y los días posteriores. Aunque en otras disoluciones hubo diferencias importantes entre el día 0, el día 10 y el día 17. En la disolución que hubo mayor remoción y significancia según la prueba Tukey fue la de 75% Medio de MC y 25% de agua residual después de lodos activados (Cuadro 7).

Cuadro 7. Resultados ANOVA y prueba Tukey para fósforo total de *Chlorococcum littorale*.

Muestra	ANOVA	Tukey	
		10 días	17 días
75% Medio: 25% A.R.A. Cloración	0.000	0.000	0.000
50% Medio: 50% A.R.A. Cloración	0.008	0.346	0.016
25% Medio: 75% A.R.A. Cloración	0.018	0.018	0.428
75% Medio: 25% A.R.D. Lodos activados	0.000	0.001	0.000
50% Medio: 50% A.R.D. Lodos activados	0.000	0.000	0.000
25% Medio: 75% A.R.D Lodos activados	0.003	0.081	0.003

Estadísticamente significativo: P<0.05

La mayor reducción de nitrógeno total se observó en la disolución de 75% de medio MC y 25% de agua residual antes de cloración y la disolución de 75% de medio MC y 25% de agua residual después de lodos, con un 94% de remoción a los 17 días. Aunque ambas tienen el mismo resultado a los 17 días, la disolución que tiene resultados más rápidos fue la de 75% de medio MC y 25% de agua residual después de lodos activados, con un 81% de eficiencia a los 10 días, contra un 74% de la disolución de 75% de medio MC y 25% de agua residual antes de cloración (Cuadro 8).

Cuadro 8. Medición de nitrógeno total (mg/L N) del experimento de *Chlorococcum littorale*.

Muestra	Nitrógeno total(mg/L N)			Eficiencia (%)	
	0 días	10 días	17 días	10 días	17 días
75% Medio: 25% A.R.A. Cloración	22.0	5.8	1.3	73.6	94.1
50% Medio: 50% A.R.A. Cloración	16.2	3.7	1.1	77.1	93.2
25% Medio: 75% A.R.A. Cloración	10.3	2.6	0.7	74.3	93.2
75% Medio: 25% A.R.D. Lodos	24.0	4.6	1.3	80.6	94.2
50% Medio: 50% A.R.D. Lodos	18.2	3.7	1.3	79.3	92.3
25% Medio: 75% A.R.D Lodos	12.3	2.2	1.0	82.1	91.8

El crecimiento de la microalga está directamente relacionado con la concentración de nitrógeno total, no es extraño observar que las disoluciones que tienen más concentración de nitrógeno son las que realizan más remoción con un 94%. Según el resultado de la prueba ANOVA, todos los resultados son estadísticamente significativos. Es decir, que el valor inicial es estadísticamente menor que el final. Según la prueba Tukey, todas las disoluciones tienen resultados estadísticamente diferentes, lo que significa que *Chlorococcum littorale* es efectivo para la remoción de nitrógeno total en aguas residuales (Cuadro 9).

Cuadro 9. Resultados ANOVA y prueba Tukey para nitrógeno total de *Chlorococcum littorale*.

Muestra	ANOVA	Tukey	
		10 días	17 días
75% Medio: 25% A.R.A. Cloración	0.001	0.002	0.001
50% Medio: 50% A.R.A. Cloración	0.000	0.000	0.000
25% Medio: 75% A.R.A. Cloración	0.000	0.000	0.000
75% Medio: 25% A.R.D. Lodos activados	0.000	0.000	0.000
50% Medio: 50% A.R.D. Lodos activados	0.000	0.000	0.000
25% Medio: 75% A.R.D Lodos activados	0.000	0.000	0.000

Estadísticamente significativo: $P < 0.05$

Los resultados de las variables físicas y químicas fueron positivos en muchas de las disoluciones (Cuadro 10 al 14), debido a que se encontró una reducción de las variables de DQO, nitrógeno total y fósforo total. Obteniendo en una reducción hasta del 100% en la variable de nitrógeno total en la especie de *Scenedesmus* sp. El pH se determinó debido a que para descargar a un efluente es necesario que el pH este en un rango de 5 a 10.

En todas las disoluciones se cumple la norma que especifica que el agua residual debe estar en un rango de pH de 5 a 10 (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales y Pesca [SEMARNAT], 1996). Por lo cual, el uso del agua después de la incorporación de las algas es viable solo en la disolución de 25% Medio 3N-BBM: 75% aguas residuales después de lodos activados (Cuadro 10).

Cuadro 10. Medición de pH del experimento de *Scenedesmus* sp.

Muestra	pH		
	0 días	10 días	25 días
75% Medio: 25% A.R.A. Cloración	8.2	10.7	10.6
50% Medio: 50% A.R.A. Cloración	8.2	10.7	10.5
25% Medio: 75% A.R.A. Cloración	8.2	10.6	10.4
75% Medio: 25% A.R.D. Lodos activados	7.8	10.3	10.1
50% Medio: 50% A.R.D. Lodos activados	7.8	10.7	10.5
25% Medio: 75% A.R.D Lodos activados	7.8	9.8	9.8

Se hizo un análisis ANOVA, para conocer si existieron diferencias significativas entre los resultados. En las muestras que si existieron diferencias significativas, se hizo una prueba de Tukey, comparando el resultado en el tiempo 0 con el tiempo a los 10 y 17 días.

Todos los resultados, fueron estadísticamente diferentes entre el día 0, el día 10 y el día 25. Excepto la disolución de 25% Medio y 75% de aguas residuales después de lodos activados. Lo que implica un gran cambio en el pH, en la mayoría de muestras. El pH del medio de cultivo al inicio es de 7, *Scenedesmus* sp. tiene la capacidad de poder sobrevivir y adaptarse a diferentes pH, aunque se coloque a diferentes pH en la mayoría al pasar el día 10 de crecimiento, el pH oscila entre 10 y 11. Por ejemplo, si se coloca a un pH de 3, la microalga consigue llevar el pH al valor de 10 (Xin et al., 2010).

El tiempo de centrifugación permitido es de 15 minutos con el fin de que las algas no se dañen, la reducción de DQO en este caso se observa con mayor eficiencia en la solución de 25% medio 3N-BBM y 75% agua residual después de lodos activados con un 21% de eficiencia a los 25 días (Cuadro 11).

Cuadro 11. Medición de DQO del experimento de *Scenedesmus* sp.

Muestra	DQO (mg/L)			Eficiencia (%)	
	0 días	10 días	25 días	10 días	25 días
75% Medio: 25% A.R.A. Cloración	95	260	250	-173.68	-163.16
50% Medio: 50% A.R.A. Cloración	95	245	240	-157.89	-152.63
25% Medio: 75% A.R.A. Cloración	95	330	170	-247.37	-78.95
75% Medio: 25% A.R.D. Lodos	260	290	260	-11.54	0.00
50% Medio: 50% A.R.D. Lodos	260	280	225	-7.69	13.46
25% Medio: 75% A.R.D Lodos	260	215	205	17.31	21.15

El aumento de la DQO se debió a que a que *Scenedesmus* sp. es una alga relativamente pequeña, y no se pudo separar por completo ya que cuando se realiza la centrifugación, no se puede colocar por más de 15 minutos, pues la biomasa se empieza a degradar. Este problema se presentó en especial a los 10 días ya que la cantidad de biomasa es mucha y a los 25 días se reduce la DQO, por que la cantidad de biomasa baja, sin contar la absorción que realiza la microalga de esta manera se logró reducir hasta un 21% de DQO.

Se hizo un análisis ANOVA para conocer si existen diferencias significativas entre los resultados. El resultado en todas las disoluciones fue que no existen diferencias significativas entre los resultados al día 0 y los resultados a los días 10 y 25. Por lo cual no se hizo una prueba de Tukey

La mayor reducción de fósforo total se observó en la disolución de 75% de medio 3N-BBM y 25% de agua residual después de lodos activados, con un 52% de remoción a los 25 días. El mayor aumento se observó en la disolución de 25% de Medio 3N-BBM y 75% agua residual antes de cloración (Cuadro 12), esto se debió debido al tiempo de centrifugación para la separación del alga y del agua residual.

Cuadro 12. Medición de fósforo total (mg/L PO₄) del experimento de *Scenedesmus* sp.

Muestra	Fósforo total (mg/L PO ₄)			Eficiencia (%)	
	0 días	10 días	25 días	10 días	25 días
75% Medio: 25% A.R.A. Cloración	16.9	51.8	50.7	-206.23	-199.73
50% Medio: 50% A.R.A. Cloración	11.4	49.2	45.8	-330.56	-301.25
25% Medio: 75% A.R.A. Cloración	5.9	40.6	37.1	-584.52	-524.74
75% Medio: 25% A.R.D. Lodos	39.5	36.4	18.7	7.64	52.49
50% Medio: 50% A.R.D. Lodos	34.0	49.6	48.9	-45.98	-44.07
25% Medio: 75% A.R.D Lodos	28.5	34.5	30.6	-21.10	-7.41

Debido a que el crecimiento de la microalga está directamente relacionado con la concentración de fósforo total, no es raro obtener el resultado que esta disolución es la que

realiza más remoción de fósforo total. Debido a que existió más biomasa en esta concentración, hay más absorción de este elemento. El resultado de la prueba ANOVA, demuestra que en 5 tipos de las disoluciones existió una diferencia significativa. Sin embargo, en donde existió mayor diferencia de los resultados es en la disolución 75% medio de 3N-BBM y 25% de agua residual antes de cloración (Cuadro 13).

Cuadro 13. Resultados ANOVA y prueba Tukey para fósforo total de *Scenedesmus* sp.

Muestra	ANOVA	Tukey	
		10 días	25 días
75% Medio: 25% A.R.A. Cloración	0.000	0.000	0.000
50% Medio: 50% A.R.A. Cloración	0.001	0.001	0.001
25% Medio: 75% A.R.A. Cloración	0.072	-	-
75% Medio: 25% A.R.D. Lodos activados	0.200	-	-
50% Medio: 50% A.R.D. Lodos activados	0.014	0.018	0.020
25% Medio: 75% A.R.D Lodos activados	0.941	-	-

Estadísticamente significativo: $P < 0.05$

La mayor reducción de nitrógeno total se observó en la cuatro disoluciones con un 100% de remoción a los 25 días. Las disoluciones que funcionaron con mayor rapidez fueron la de 25% medio 3N-BBM y 75% de agua residual antes de cloración y después de lodos activados, obteniendo ya el 100% de remoción a los 10 días (Cuadro 14).

Cuadro 14. Medición de nitrógeno total (mg/L N) del experimento de *Scenedesmus* sp.

Muestra	Nitrógeno total(mg/L N)			Eficiencia (%)	
	0 días	10 días	25 días	10 días	25 días
75% Medio: 25% A.R.A. Cloración	17.0	5.3	2.4	68.8	85.59
50% Medio: 50% A.R.A. Cloración	12.8	2.3	PDV	81.6	100.00
25% Medio: 75% A.R.A. Cloración	8.7	PDV	PDV	100.0	100.00
75% Medio: 25% A.R.D. Lodos	19.0	1.8	1.5	90.2	91.85
50% Medio: 50% A.R.D. Lodos	14.8	4.1	PDV	72.3	100.00
25% Medio: 75% A.R.D Lodos	10.7	PDV	PDV	100.0	100.00

PDV*= Por debajo del valor

En todas las disoluciones, hay una remoción de un gran porcentaje de nitrógeno total. Aunque en la concentración de 75% medio de 3N-BBM y 25% de agua residual después de lodos activados, no se remueve el 100% del nitrógeno total presente, si es la disolución en donde más se remueve el elemento. *Scenedesmus* sp. logra reducir hasta un 17.5 mg/L de nitrógeno total en una muestra de agua residual.

Contenido de carbohidratos, carotenoides, lípidos y proteínas

Carbohidratos. Existió un poco más de producción en la disolución de 25% medio MC y 75% de agua residual antes de cloración, en el caso de *Chlorococcum littorale* (Figura 17). Se hizo una prueba ANOVA, obteniendo un $p=0.474$. Por lo cual, no hay diferencias significativas en la cantidad de carbohidratos en las diferentes disoluciones de *Chlorococcum littorale*.

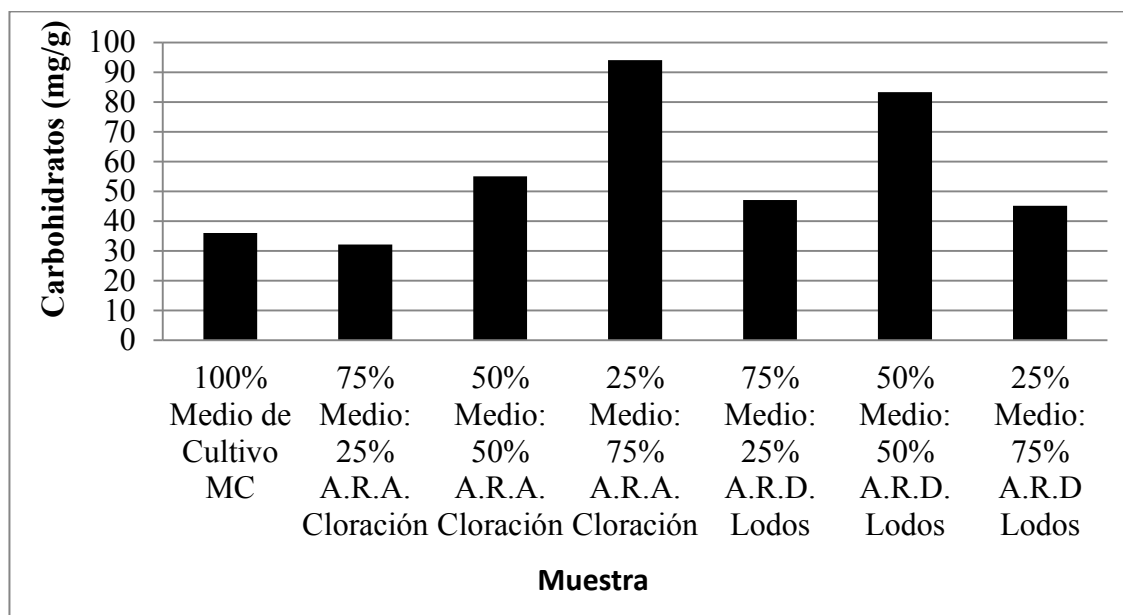


Figura 17. Cuantificación de carbohidratos de *Chlorococcum littorale*.

Se debe de observar en el caso de *Scenedesmus* sp. que existe un poco más de producción de carbohidratos en la disolución de 25% medio MC y 75% de agua residual antes de cloración (Figura 18). Se hizo una prueba ANOVA, obteniendo un $p=0.669$. Por lo cual, no hay diferencias significativas en la cantidad de carbohidratos en las diferentes disoluciones de *Chlorococcum littorale*.

Estos resultados, son importantes debido a la posibilidad de producir bioetanol (Subhadra & Edwards, 2010). Se ha demostrado que la cantidad de lípidos y carbohidratos que hay en las microalgas tienen una relación proporcional, es decir, mayor acumulación de carbono, las microalgas tienden a almacenar más cantidad de lípidos (Cheirsilp, Kitcha, & Torpee, 2012). Por tanto, la disolución en donde se obtiene mayor cantidad de lípidos también tiene una mayor cantidad de carbohidratos.

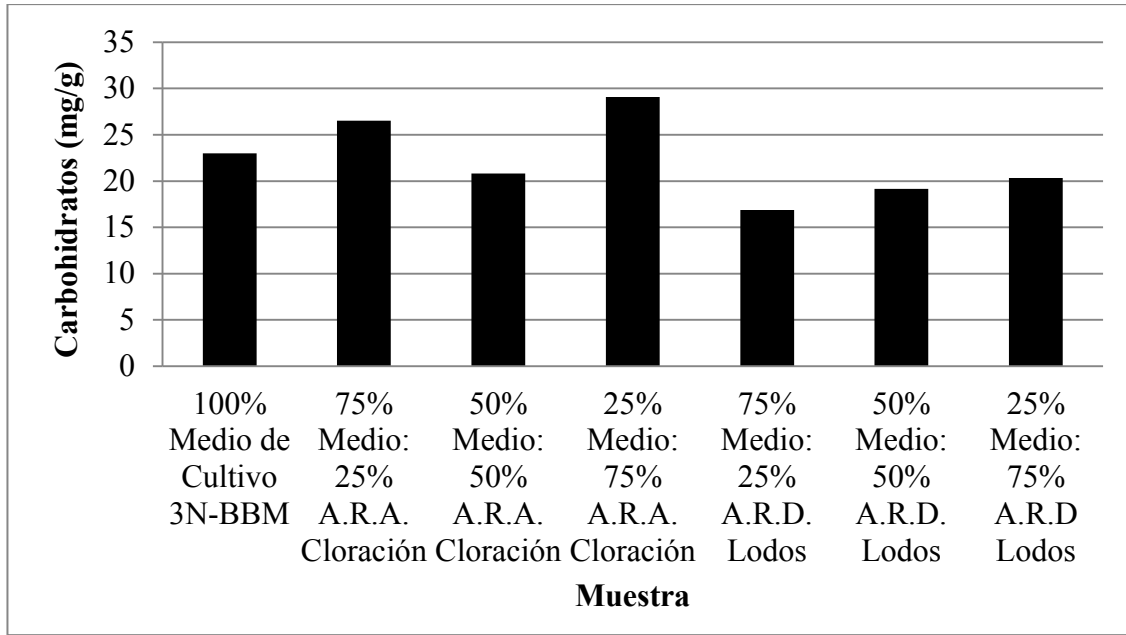


Figura 18. Cuantificación de carbohidratos de *Scenedesmus* sp.

Carotenoides. Hubo más producción en la disolución de 75% medio MC y 25% de agua residual después de lodos activados en el caso de *Chlorococcum littorale* (Figura 19). Este resultado, es importante debido a la posibilidad de producir suplementos alimenticios para animales (Guedes, Amaro, & Malcata, 2011). Se hizo una prueba ANOVA, obteniendo un $p= 0.196$. Por lo cual, no hay diferencias significativas en la cantidad de carotenoides en las diferentes disoluciones.

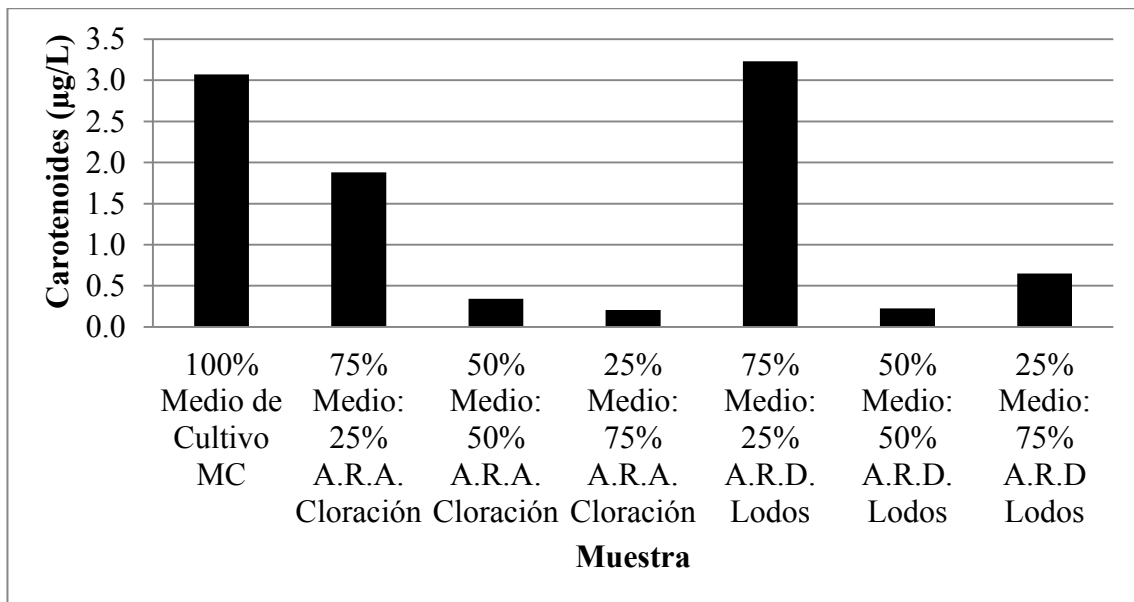


Figura 19. Cuantificación de carotenoides de *Chlorococcum littorale*.

Existió más producción en la disolución de 75% medio 3N-BBM y 25% de agua residual antes de cloración (Figura 20), en el caso de *Scenedesmus* sp. Se hizo una prueba ANOVA, obteniendo un $p= 0.196$. Por lo cual, no hay diferencias significativas en la cantidad de carotenoides en las diferentes disoluciones. Se hizo una prueba ANOVA, obteniendo un $p=0.274$. Por lo cual, no hay diferencias significativas en la cantidad de carotenoides en las diferentes disoluciones.

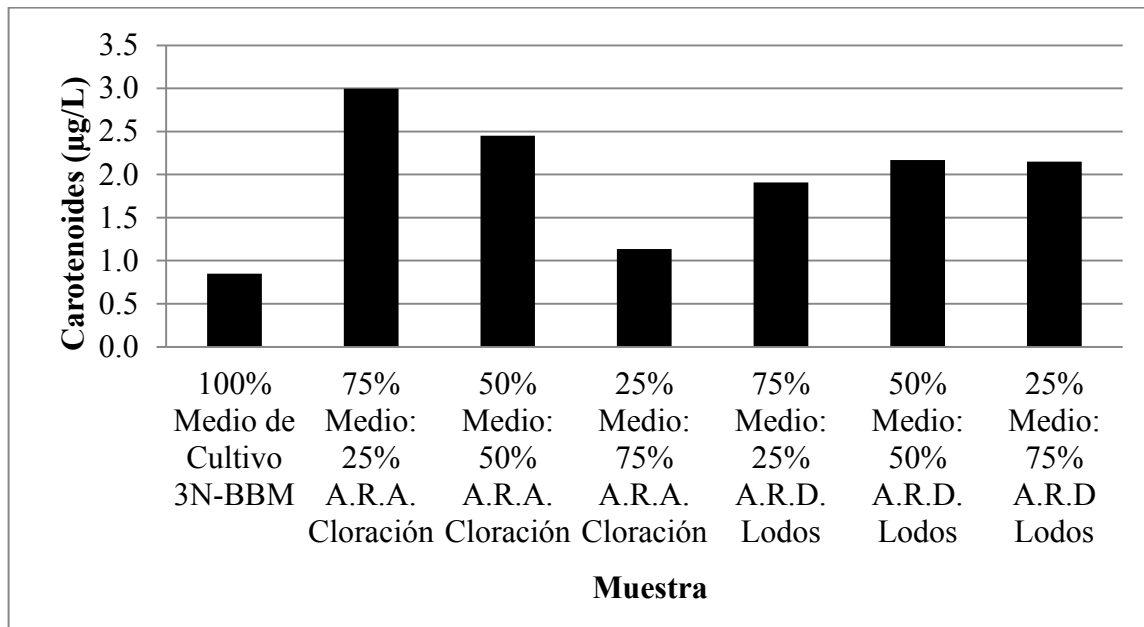


Figura 20. Cuantificación de carotenoides de *Scenedesmus* sp.

La cantidad de carotenoides, está relacionada con el color de las algas. Debido a que los carotenoides son pigmentos que reflejan un color rojo y amarillo. La cantidad de nitrógeno presente en el medio de crecimiento está directamente relacionado con la producción de carotenoides (Del Campo et al., 2000). A mayor cantidad de biomasa y menor cantidad de nitrógeno total al final del experimento, existe mayor cantidad de carotenoides. Es por eso, que en las disoluciones que tuvieron mayor cantidad de nitrógeno total y un crecimiento mayor, existió una mayor cantidad de producción de carotenoides.

Lípidos. Hubo más producción en la disolución de 25% medio MC y 75% de agua residual antes de cloración (Figura 21) en el caso de *Chlorococcum littorale*. Se hizo una prueba ANOVA, obteniendo un $p= 0.612$. Por lo cual, no hay diferencias significativas en la cantidad de lípidos en las diferentes disoluciones.

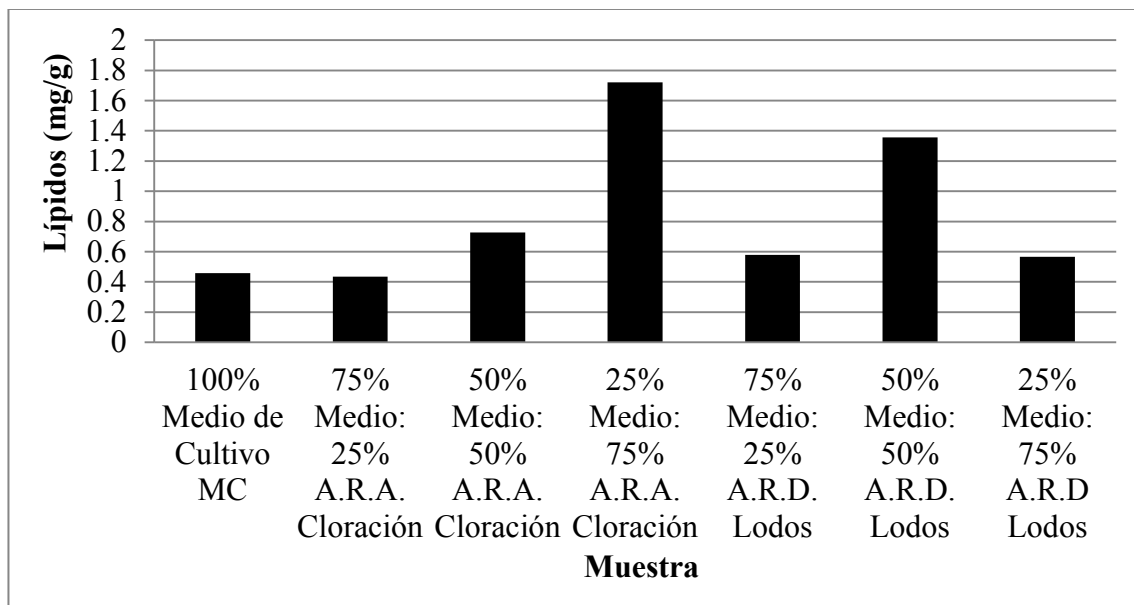


Figura 21. Cuantificación de lípidos de *Chlorococcum littorale*.

Una DQO alta estimula la producción de lípidos (Ling et al., 2014). En la mayoría de los disoluciones la DQO a los 10 días es mayor a 300 en el caso de *Chlorococcum littorale*. Existió más producción en la disolución de 100% medio 3N-BBM (Figura 22) en el caso de *Scenedesmus* sp. Se hizo una prueba ANOVA, obteniendo un $p= 0.554$. Por lo cual, no hay diferencias significativas en la cantidad de lípidos en las diferentes disoluciones.

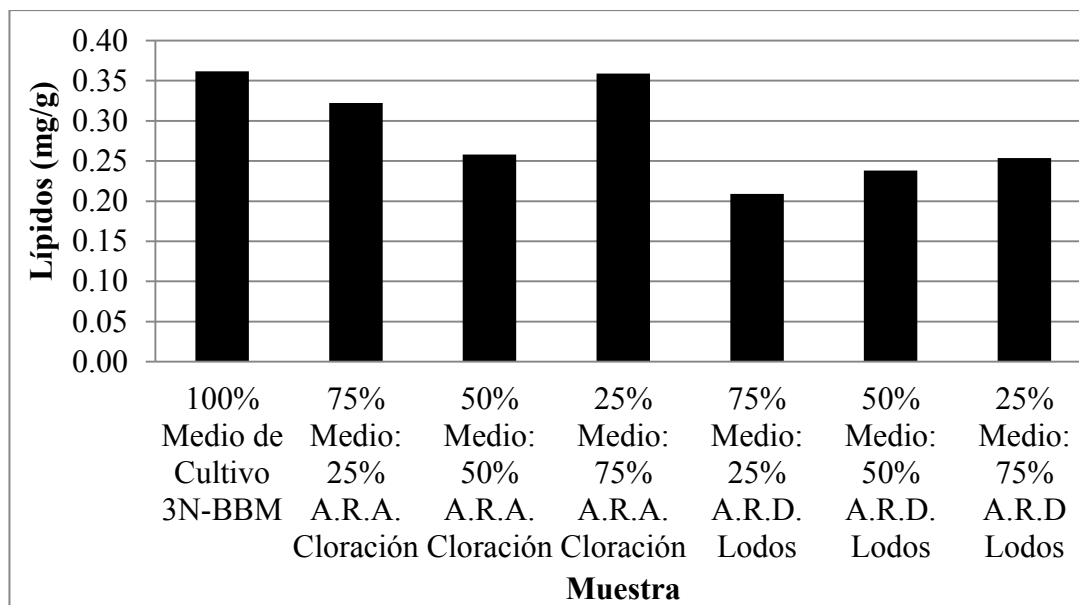


Figura 22. Cuantificación de lípidos de *Scenedesmus* sp.

Estos resultados son importantes debido a la posibilidad de producir biodiesel (Ho et al., 2012). Se ha demostrado que una falta de nutrientes estimula la acumulación de lípidos, al igual que una presencia baja de nitrógeno (Cheirsilp et al., 2012).

También se ha demostrado que pH de 7 a 8 del medio de crecimiento, fomenta la producción de lípidos (Cheirsilp et al., 2011). Por lo tanto, en las disoluciones donde hay un crecimiento más rápido y consumo de nutrientes se espera mayor cantidad de lípidos.

Proteínas. Existió mayor producción en la disolución de 50% medio MC y 50% de agua residual después de lodos en el caso de *Chlorococcum littorale* (Figura 23). Se hizo una prueba ANOVA, obteniendo un $p = 0.447$. Por lo cual, no hay diferencias significativas en la cantidad de proteínas en las diferentes disoluciones. La producción de proteínas tiene una relación directa con la cantidad de nitrógeno y biomasa existente en el medio.

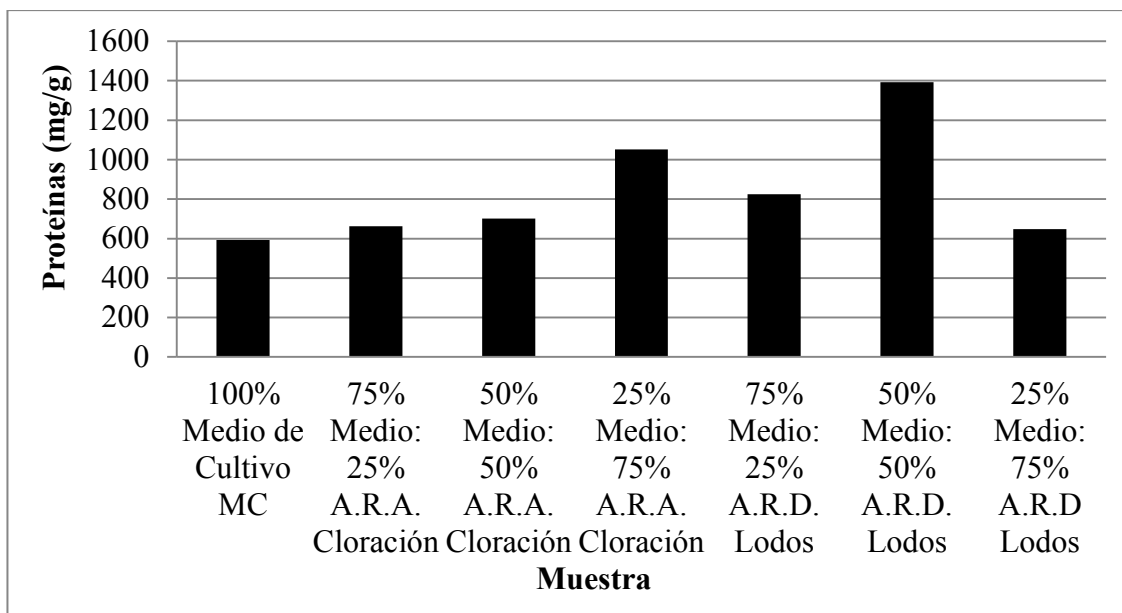


Figura 23. Cuantificación de proteínas de *Chlorococcum littorale*.

En el caso de *Scenedesmus* sp. existió más de producción en la disolución de 100% medio 3N-BBM (Figura 24). Se aplicó una prueba ANOVA de una vía, obteniendo un $p=0.566$. Por lo cual, no hay diferencias significativas en la cantidad de proteínas en las diferentes disoluciones. Estos resultados, son importantes debido a la posibilidad de producir suplementos alimenticios para animales (Guedes et al., 2011). Por lo cual, las proteínas hacen de utilidad el crecimiento de la biomasa.

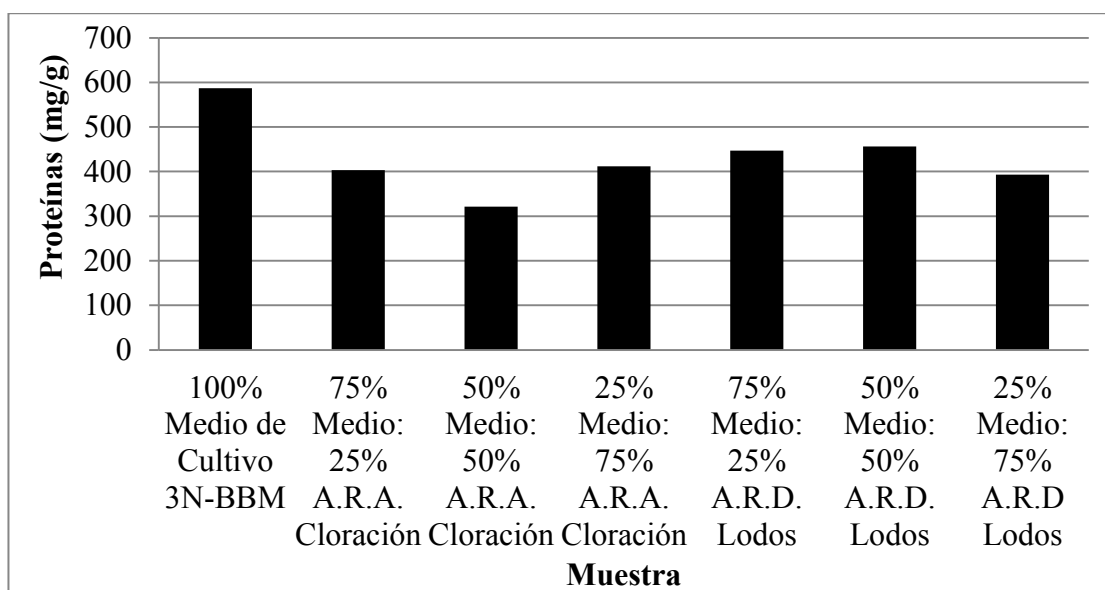


Figura 24. Cuantificación de proteínas de *Scenedesmus* sp.

4. CONCLUSIONES

- Las algas *Chlorococcum littorale* y *Scenedesmus* sp. pueden ser utilizadas como una alternativa para utilizar las aguas residuales después de un tratamiento primario y secundario. Debido a que son eficientes en la reducción de contaminantes y en la producción de biomasa para diversos fines.
- La planta de tratamiento “Dulces Nombres”, ubicada en el estado de Nuevo León, México. Cumple con los requerimientos plasmados en la norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996.
- Los mayores rendimientos de biomasa al utilizar las especies *Chlorococcum littorale* y *Scenedesmus* sp. se observan en las disoluciones con mayor presencia de medio de cultivo después del tratamiento de lodos activados.
- El pH obtenido al utilizar el tratamiento con las algas fue variable, solo *Chlorococcum littorale* lo mantuvo dentro de los rangos permitidos por la norma.
- La DQO de las disoluciones aumentan a los 10 días debido a la cantidad de biomasa presente en los experimentos, sin embargo, al final de los experimentos se reduce hasta en un 77%.
- La cantidad de fósforo y nitrógeno total ese reducido por ambas especies, logrando una reducción de hasta 57% y 100% respectivamente.
- La producción de carbohidratos, carotenoides, lípidos y proteínas fue significativa para la elaboración de diferentes productos, además de estar relacionada con la cantidad de nitrógeno y fósforo total presente en las disoluciones.

5. RECOMENDACIONES

- Para futuras investigaciones, se recomienda hacer un triplicado en las repeticiones con el fin de obtener datos más exactos. Además, de poder obtener los datos de carbohidratos, carotenoides, lípidos y proteínas diarios, con el fin de conocer el día exacto en donde se obtiene la mayor concentración.
- Se recomienda realizar un estudio para determinar la mejor manera de extraer los subproductos que se pueden obtener de la experimentación, como lo son biodiesel, bioetanol y suplementos alimenticios para animales. Así como, continuar realizando estudios de este enfoque con otras especies que casi no se han estudiado en este ámbito, como lo fue *Chlorococcum littorale* y *Scenedesmus* sp.
- Para estudios con algas en el laboratorio de microbiología ambiental de la carrera de Ambiente y Desarrollo de la Escuela Agrícola Panamericana; Zamorano, se recomienda establecer un lugar o cuarto especial con las condiciones de extracción de aire y lámparas LED para proporcionar a las microalgas un ambiente adecuado. Así como la compra de bombas de aire, focos y mangueras para poder desarrollar los cultivos.
- Se recomienda, que en la medida de lo posible se realice y se implemente un diseño de tanques en la planta de tratamiento de aguas residuales “Dulces Nombres” en donde se pueda establecer el cultivo de microalgas y así obtener subproductos y utilidades de esta actividad.

6. LITERATURA CITADA

- Álvarez Díaz, P., Ruiz, J., Arbib, Z., Barragán, J., Garrido-Pérez, M., & Perales, J. (2015). Wastewater treatment and biodiesel production by *Scenedesmus obliquus* in a two-stage cultivation process. *Bioresource Technology*, 90-96.
- Amaro, H., Guedes, A., & Malcata, F. (2011). Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*, 88, 3402–3410.
- Amores Sanchez, I., Terrón, M., Gonzáles, A., & Gonzáles, T. (2015). Potential of microalgae and cyanobacteria in bioremediation of distillery wastewaters. *ICIDCA.Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 49, 58-70.
- Aravantinou, A., Theodorakopoulos, M., & Manariotis, I. (2013). Selection of microalgae for wastewater treatment and potential lipids production. *Bioresource Technology*, 147, 130-134.
- Barba, L. (2002). *Conceptos básicos de la contaminación del agua y parámetros de medición*. Tesis de licenciatura, Universidad del Valle: Santiago de Cali.
- Bhatnagar, A., Chinnasamy, S., Singh, M., & Das, K. (2011). Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Applied Energy*, 88, 3425–3431.
- Cavonius, L., Albers, E., & Undeland, I. (2015). pH-shift processing of *Nannochloropsis oculata* microalgal biomass to obtain a protein-enriched food or feed ingredient. *Algal Research*, 95-102.
- Cheirsilp, B., Kitcha, S., & Torpee, S. (2012). Co-culture of an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and a microalga *Chlorella vulgaris* for biomass and lipid production using pure and crude glycerol as a sole carbon source. *Annals of Microbiology*, 987-993.
- Cheirsilp, B., Suwannarat, W., & Niyomdecha, R. (2011). Mixed culture of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and microalga *Chlorella vulgaris* for lipid production from industrial wastes and its use as biodiesel feedstock. *New Biotechnology*, 362-368.
- Chen, X., He, G., Deng, Z., Wang, N., Jiang, W., & Chen, S. (2014). Screening of Microalgae for Biodiesel Feedstock. *Advances in Microbiology*, 4, 365-376.

- Chihara, M., Nakayama, T., Inouye, I., & Kodama, M. (1994). Chlorococcum littorale, a New Marine Green Coccoid Alga (Chlorococcales, Chlorophyceae). *Arch. Protistenkd*, 144, 227-235.
- Comisión Nacional del Agua. (2014). *Atlas del agua en México 2014*. México: Gobierno de la república.
- Corcoran, E., Nellemann, E.; Baker, R. (2010). *Sick Water? The central role of wastewater management in sustainable development. A rapid response assesment*. Noruega: United Nations Environment Programme, UN-HABITAT, Arendal.
- Cuellar Bermudez, S., Garcia-Perez, J., Rittmann, B., & Parra-Saldivar, R. (2015). Photosynthetic bioenergy utilizing CO₂: an approach on flue gases utilization for third generation biofuels. *Cleaner Production*, 98, 53-65.
- Del Campo, J., Moreno, J., Rodríguez, H., Vargas, M., Rivas, J., & Guerrero, M. (2000). Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in Muriellopsis sp. (Chlorophyta). *Journal of Biotechnology*, 51-59.
- Demirbas, A. (2011). Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: A solution to pollution problems. *Applied Energy*, 88, 3541–3547.
- Déniz , F. (2010). *Análisis estadístico de los parámetros DQO, DBO Y SS de las aguas residuales urbanas en el ensuciamiento de las membranas de ósmosis inversa*. Tesis doctoral, Universidad de las palmas de Gran Canaria: Las palmas de la gran Canaria.
- Durvasula, R., Hurwitz, I., Fieck, A., & Subba Rao, D. (2015). Culture, growth, pigments and lipid content of Scenedesmus species, an extremophile microalga from Soda Dam, New Mexico in wastewater. *Algal Research*, 128-133.
- Dwivedi, S. (2012). Bioremediation of Heavy Metal by Algae: Current and Future Perspective. *Journal of Advanced Laboratory Research in Biology*, 3, 195-199.
- Fanés, I. (2009). *Estudios taxonómicos en algas verdes cocales del sur de España*. Tesis doctoral, Universidad de Granada: Granada, España.
- Food and Agriculture organization. (Septiembre de 2014). *AQUASTAT*. Recuperado el 14 de Septiembre de 2015, de Food and agriculture organization of the united nations: <http://www.fao.org/nr/water/aquastat/wastewater/index.stm>
- Gani, P., Mohamed Sunar, N., Matias-Peralta, H., Abdul Latiff, A., Kalthsom Parjo, U., & Ab. Razak, A. (2015). Phycoremediation of Wastewaters and Potential Hydrocarbon from Microalgae: A Review. *Advances in Environmental Biology*, 9, 1-8.

- González, L., Cañizares, R., & 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, 259-262.
- Guedes, A., Amaro, H., & Malcata, F. (2011). Microalgae as Sources of Carotenoids. *Mar. Drugs*, 625-644.
- Herrera, S. (2015). *Determinación de las fracciones lipídicas en las microalgas Scenedesmus sp, Chlorococcum littorale y Botryococcus braunii*. México: Tesis de licenciatura, Instituto tecnológico de Durango.
- Ho, S., Chen, C., & Chang, J. (2012). Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology*, 244-252.
- Hutchinson, J., Campbell, C., & Desjardins, R. (2007). Some perspectives on carbon sequestration in agriculture. *Agricultural and Forest Meteorology*, 142, 288–302.
- Ji, M., Yun, H., Park, Y., Kabra, A., Oh, I., & Choi, J. (2015). Mixotrophic cultivation of a microalga *Scenedesmus obliquus* in municipal wastewater supplemented with food wastewater and flue gas CO₂ for biomass production. *Environmental Management*, 115-120.
- Jiang, Luo, Fan, Yang, & Guo. (2011). Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO₂. *Applied Energy*, 88, 3336–3341.
- Keefer, C., & Meisel, J. (1951). Activated sludge studies.iii. effect of ph of sewage on the activated sludge process. *Sewage and Industrial Wastes*, 982-991.
- Kumar, S., Magnusson, M., Ward, L., Paul, N., & Brown, L. (2015). A Green Algae Mixture of *Scenedesmus* and *Schroederiella Attenuates Obesity-Linked Metabolic Syndrome* in Rats. *Nutrients*, 7, 2771-2787.
- Kumar-Gupta, S., Ahmad-Ansari, F., Shriwastav, A., Kumar Sahoo, N., Rawat, I., & Bux, F. (2015). Dual Role of *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus obliquus* for Comprehensive Wastewater Treatment and Biomass Production for Bio-fuels. *Cleaner Production*.
- Lekshmi, B., Joseph, R., Jose, A., Abinandan, S., & Shanthakumar, S. (2015). Studies on reduction of inorganic pollutants from wastewater by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus abundans*. *Alexandria Engineering Journal*.
- Ling, J., Nip, S., Cheok, W., Alves de Toledo, R., & Shim, H. (2014). Lipid production by a mixed culture of oleaginous yeast and microalga from distillery and domestic mixed wastewater. *Bioresource Technology*, 132-139.

- Luka, Y., Usman, F., Tya, T., & Joseph, C. (2014). Kinetics of bioremediation of lake Gerio in Jimeta-Yola using *Pseudomonas aeruginosa*. *International Refereed Journal of Engineering and Science (IRJES)*, 3, 54-59.
- Miceli, Nájera, Rojas, Quintero, & Orantes. (2014). Revisión de tecnologías para el tratamiento de aguas residuales incluyendo algunos fármacos. *Innovación más Desarrollo*, 3, 73-95.
- Mishra, S., I. Suh, W., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M., & Yang, J.-W. (2014). Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource Technology*, 330–333.
- Murakami, M., & Ikenouchi, M. (1997). The biological CO₂ fixation and utilization project by rite (2). Screening and Breeding of Microalgae with High Capability in Fixing CO₂. *Energy convers*, 38, 493-497.
- Ota, M., Kato, Y., Watanabe, M., Sato, Y., Smith, R., Rosello-Sastre, R., . . . Inomata, H. (2011). Effects of nitrate and oxygen on photoautotrophic lipid production from *Chlorococcum littorale*. *Bioresource Technology*, 102, 3286-3292.
- Pellón, A., Benítez, F., Frades, J., García, L., Cerpa, A., & Alguacil, F. (2003). Empleo de microalga *scenedesmus obliquus* en la eliminación de cromo presente en aguas residuales galvánicas. *Rev.Metal.Madrid*, 39, 9-16.
- Quevedo, C., Morales, S., & Acosta, A. (2008). Crecimiento de *Scenedesmus* sp en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal. *Revista de la facultad de química farmacéutica*, 15, 25-31.
- 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.
- Rehman, A., & Shakoori, A. (2004). Tolerance and Uptake of Cadmium and Nickle by *Chlorella* sp., Isolated from Tannery Effluents. *Pakistan J. Zool*, 36, 327-331.
- Rodríguez, J., & Durán de Bazúa, C. (2006). Remoción de nitrógeno en un sistema de tratamiento de aguas residuales usando humedales artificiales de flujo vertical a escala de banco. *Tecnol.Ciencia Ed (IMI) UNAM*, 21(1), 25-33.
- Ruiz, J., Arbib, Z., Álvarez-Díaz, P., Garrido-Pérez, C., Barragán, J., & Perales, J. (2014). Influence of light presence and biomass concentration on nutrient kinetic removal from urban wastewater by *Scenedesmus obliquus*. *Journal of Biotechnology*, 178, 32-37.
- Sacristán de Alva, M., Luna-Pabello, V., Cadena, E., & Ortiz, E. (2013). Green microalga *Scenedesmus acutus* grown on municipal wastewater to couple nutrient removal with lipid accumulation for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 744-748.

- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales y Pesca [SEMARNAT]. (1996). *Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. [recurso electrónico]*. México: Diario Oficial de la Federación (6 enero 1997).
- Skjanes, K., Lindblad, P., & Muller, J. (2007). BioCO₂ – A multidisciplinary, biological approach using solar energy to capture CO₂ while producing H₂ and high value products. *Biomolecular Engineering*, 24, 405-413.
- Sonune, N., & Garode, A. (2015). Bioremediation potential of bacterial isolates for municipal wastewater treatment. *Current world environment*, 10, 619-625.
- Subhadra, B. (2011). Water management policies for the algal biofuel sector in the Southwestern United States. *Applied Energy*, 88, 3492–3498.
- Subhadra, B., & Edwards, M. (2010). An integrated renewable energy park approach for algal biofuel production in United States. *Energy Policy*, 4897–4902.
- Sydney, E., da Silva, T., Tokarski, A., Novak, A., de Carvalho, J., Woiciechowski, A., . . . Soccol, C. (2011). Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. *Applied Energia*, 88, 3291–3294.
- Tu, R., Jin, W., Xi, T., Yang, Q., Han, S., & Abomohra, A. (2015). Effect of static magnetic field on the oxygen production of *Scenedesmus obliquus* cultivated in municipal wastewater. *Water Research*.
- Ueno, Y., Kurano, N., & Miyachi, S. (1999). Purification and characterization of hydrogenase from the marine green alga, *Chlorococcum littorale*. *FEBS Letters*, 443, 144-148.
- Usui, N., & Ikenouchi, M. (1997). The Biological CO₂ Fixation and Utilization Project by RITE(1) Highly-effective Photobioreactor System. *Energy convers*, 38, 487-492.
- Voltolina, D., Cordero, B., Nieves, M., & Soto, L. (1998). Growth of *Scenedesmus* sp. in artificial wastewater. *Bioresource technology*, 68, 265-268.
- Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y., . . . Ruan, R. (2009). Cultivation of Green Algae *Chlorella* sp. in Different Wastewaters from Municipal Wastewater Treatment Plant. *Biochem Biotechnol*.
- Williams, J. (2002). Keys to Bioreactor selection. *CEP Magazine*, 34-41.
- Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., & Jia, Y. (2010). Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. LX1 under different kinds of nitrogen sources. *Ecological Engineering*, 379–381.

Zhang, C., Zhang, Y., Zhuang, B., Zhou, X. (2014). Strategic enhancement of algal biomass, nutrient uptake and lipid through statistical optimization of nutrient supplementation in coupling *Scenedesmus obliquus*-like microalgae cultivation and municipal wastewater treatment. *Bioresource Technology*.

7. ANEXOS

Anexo 1. Medición de pH con potenciómetro.

Para pH menores a 7

- Encender el equipo, esperar cinco minutos.
- Enjuagar el electrodo con agua destilada.
- Presionar el botón de calibrar.
- Colocar el electrodo en la solución de pH 4 y esperar a que muestre el valor de pH indicado.
- Sin retirar el electrodo, presionar el botón de calibrar.
- Retirar el electrodo de la solución, enjuagar con agua destilada. Secar el exceso.
- Colocar el electrodo en la solución de pH 7 y esperar a que muestre el valor de pH indicado.
- Presionar measure, para guardar la calibración.
- Anotar la pendiente, que aparece en pantalla.
- Retirar el electrodo de la solución de pH y enjuagar el electrodo y secar el exceso de agua.
- Colocar el electrodo en la muestra a medir y esperar a que el valor sea estático.

Para pH mayores a 7

- Encender el equipo, esperar cinco minutos.
- Enjuagar el electrodo con agua destilada.
- Presionar el botón de calibrar.
- Colocar el electrodo en la solución de pH 10, esperar a que muestre el valor de pH indicado.
- Sin retirar el electrodo, presionar el botón de calibrar.
- Retirar el electrodo de la solución, enjuagar con agua destilada. Secar el exceso.
- Colocar el electrodo en la solución de pH 7, esperar a que muestre el valor de pH indicado.
- Presionar measure, para guardar la calibración.
- Anotar la pendiente, que aparece en pantalla.
- Retirar el electrodo de la solución de pH, enjuagar el electrodo y secar el exceso de agua.
- Colocar el electrodo en la muestra a medir, esperar a que el valor sea estático.

Anexo 2. Medición de Demanda Química de Oxígeno (DQO) por el método 8000 Hach

Por cada muestra, se hizo una réplica.

- Diluir la muestra 1:10.
- Homogenizar la muestra con un agitador magnético.
- Encender el reactor DBR 200 y precalentar a 150 ° C.
- Quitar las tapas de dos tubos de digestión de DQO.
- Colocar el tubo a 45 grados y añadir 2 ml de la muestra diluida.
- Colocar el segundo tubo a 45 grados y añadir 2 ml de agua bidestilada, el cual funcionara como blanco.
- Cerrar y limpiar los tubos con papel.
- Invertir varias veces para mezclar.
- Colocar los tubos en el reactor por espacio de dos horas a 150° C.
- Apagar el reactor y esperar alrededor de 20 minutos para que baje la temperatura.
- Invertir los tubos varias veces, colocarlos en una gradilla para que se enfríen.
- Insertar el blanco en el espectrofotómetro (DR5000), seleccionar medición de DQO.
- Presionar Zero y esperar a que marque 0 mg/L de DQO.
- Insertar el tubo con la muestra. anotar el resultado.
- Multiplicar por 10, debido a la disolución que se hizo.

Anexo 3. Medición de nitrógeno total mediante el KIT TNT 827 Hach.

Por cada muestra, se hizo una réplica.

- Homogenizar la muestra con un agitador magnético.
- Encender el reactor DBR 200 y precalentar a 100 ° C.
- Quitar las tapas de dos tubos de alrededor de 20 ml de capacidad.
- Colocar el tubo a 45 grados, añadir 0.5 ml de la muestra, agregar 2 ml de solución A y una tableta del frasco B.
- Colocar el segundo tubo a 45 grados, añadir 0.5 ml de agua bidestilada, agregar 2 ml de solución A y una tableta del frasco B.
- Cerrar y limpiar los tubos con papel.
- Colocar los tubos en el reactor por espacio de una hora a 100° C.
- Apagar el reactor y esperar alrededor de 20 minutos para que baje la temperatura.
- Invertir los tubos varias veces, colocarlos en una gradilla para que se enfríen, cambiar la tapa.
- Agregar 0.5 ml de la muestra del tubo en el tubo TNT.
- Agregar 0.2 ml de la solución D y voltear tres veces.
- Esperar 15 minutos.
- Insertar el blanco en el espectrofotómetro (DR5000), seleccionar medición de nitrógeno total.
- Presionar Zero y esperar a que marque 0 mg/L de N.
- Insertar el tubo con la muestra y anotar el resultado.

Anexo 4. Medición de fósforo total mediante el KIT TNT 844 Hach

Por cada muestra, se hizo una réplica.

- Homogenizar la muestra con un agitador magnético.
- Encender el reactor DBR 200 y precalentar a 100 ° C.
- Retirar la tapa de aluminio de dos tubos TNT.
- Colocar el tubo TNT a 45 grados y añadir 0.5 ml de la muestra.
- Colocar el segundo tubo a 45 grados y añadir 0.5 ml de agua bidestilada.
- Verter el contenido de la tapa en la muestra.
- Cerrar y limpiar los tubos con papel e invertirlos tres veces.
- Colocar los tubos en el reactor por espacio de una hora a 100° C.
- Apagar el reactor y esperar alrededor de 20 minutos para que baje la temperatura.
- Invertir los tubos varias veces, colocarlos en una gradilla para que se enfríen.
- Agregar 0.2 ml de la solución B.
- Agregar la pastilla C, invirtiéndola.
- Voltear tres veces la muestra.
- Esperar 10 minutos.
- Invertir tres veces la muestra.
- Insertar el blanco en el espectrofotómetro (DR5000), seleccionar medición de fósforo total.
- Presionar Zero y esperar a que marque 0 mg/L de PO₄.
- Insertar el tubo con la muestra y anotar el resultado.

Anexo 5. Medición de Metales por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP masas).

Digestión de las muestras

- Colocar 50 ml de la muestra en un vaso de precipitados.
- Añadir 1.5 ml de ácido nítrico concentrado.
- Evaporar hasta que se observen 5 ml.
- Enfriar el vaso de precipitados.
- Agregar 1.5 ml de ácido nítrico concentrado.
- Colocar un vidrio de reloj, esperar a que la reacción deje de ocurrir., lo que sucede cuando deja de cambiar de color y agregar más ácido nítrico si es necesario.
- Cuando la reacción este completa, evaporar hasta llegar a los 3 ml.
- Remover el vaso de precipitados de la parrilla y agregar 10 ml de agua.
- Mezclar y colocar el vaso de nuevo en la parrilla por 10 minutos más.
- Aforar a 50 ml, guardar a 4°C.
- Uso del equipo ICP-masas

Anexo 6. Medio MC

Componente	Cantidad(g/L)
KNO ₃	1.25
KH ₂ PO ₄	1.25
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.25
FeSO ₄ ·7H ₂ O	.02
Solución A	1 ml/L
NaCl	15

Solución A

Componente	Cantidad(g/L)
H ₃ B ₃ O	2.9
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81
ZnCl ₂	0.11
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.08
3(NH ₄) ₂ O·7MoO ₃ ·4H ₂ O	0.018

Anexo 7. Medio BG-11

Componente	Cantidad	Solución Stock
NaNO ₃	10 mL/L	30 g/ 200 mL dH ₂ O
K ₂ HPO ₄	10 mL/L	0.8 g/ 200 mL dH ₂ O
MgSO ₄	10 mL/L	1.5 g/ 200 mL dH ₂ O
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	10 mL/L	0.72 g/ 200 mL dH ₂ O
Ácido cítrico • H ₂ O	10 mL/L	0.12 g/ 200 mL dH ₂ O
Citrato de amonio férrico	10 mL/L	0.12 g/ 200 mL dH ₂ O
Na ₂ EDTA • 2 H ₂ O	10 mL/L	0.02 g/ 200 mL dH ₂ O
Na ₂ CO ₃	10 mL/L	0.04 g/ 200 mL dH ₂ O
BG-11 Solución de metales	1 mL/L	
H ₃ BO ₃	/	2.86 g/L dH ₂ O
MnCl ₂ • 4 H ₂ O	/	1.81 g/L dH ₂ O
ZnSO ₄ • 7 H ₂ O	/	0.22 g/L dH ₂ O
NaMoO ₄ • 2 H ₂ O	/	0.39 g/L dH ₂ O
CuSO ₄ • 5 H ₂ O	/	0.08 g/L dH ₂ O
Co(NO ₃) ₂ • 6 H ₂ O	/	0.05 g/L dH ₂ O

Anexo 8. Medio 3N-BBM+ V

Compuesto	Cantidad	Concentración de la solución
NaNO ₃	30 mL/L	10 g/ 400 mL dH ₂ O
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	10 mL/L	1 g/ 400 mL dH ₂ O
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	10 mL/L	3 g/ 400 mL dH ₂ O
K ₂ HPO ₄	10 mL/L	3 g/ 400 mL dH ₂ O
KH ₂ PO ₄	10 mL/L	7 g/ 400 mL dH ₂ O
NaCl	10 mL/L	1 g/ 400 mL dH ₂ O
P-IV Solución de metal	6 mL/L	/
Vitamina B1	1 mL/L	/
Vitamina B12	1 mL/L	/

P-IV Solución de metal

Compuesto	Cantidad
FeCl ₃ .6H ₂ O	97 mg
MnCl ₂ .4H ₂ O	41 mg
ZnCl ₂ .6H ₂ O	5 mg
CoCl ₂ .6H ₂ O	2 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	4 mg

Anexo 9. Cuantificación de lípidos mediante método colorimétrico (Mishra et al., 2014)

Preparación del reactivo fosfovanilina:

- Pesar 0.6 gr de vanilina.
- Diluir en 10 ml de etanol.
- Agregar 90 ml de agua bidestilada, agitar continuamente.
- Agregar 400 ml de ácido fosfórico concentrado (98%-100%).
- Almacenar en un recipiente color ámbar.

Se recomienda realizar la preparación del reactivo en una campana de extracción y con material de vidrio.

Procedimiento:

- Colocar 10 ml del cultivo de alga.
- Centrifugar a 4000 rpm por 15 minutos.
- Retirar el sobrenadante, y re suspender en 10 ml de agua bidestilada.
- Colocar 100 μ L de la muestra en un tubo de vidrio.
- Agregar 2 ml de ácido sulfúrico concentrado (98%-100%).
- Incubar a 100 ° C por 10 minutos.
- Colocar por cinco minutos en un baño con hielo.
- Agregar 5 ml de fosfovanilina.
- Incubar por 15 minutos a 37°C.
- Leer la absorbancia a 530 nm y utilizar agua bidestilada como blanco.

Se recomienda que la absorbancia no sea mayor a 1.

Procedimiento para realizar la curva de calibración:

- Medir 10 μ L de aceite canola comercial.
- Disolver en 10 ml de alcohol isopropílico.
- Realizar el procedimiento con un rango de muestra de 3 a 5 μ L.

Anexo 10. Cuantificación de carbohidratos mediante método colorimétrico (Cavonius et al., 2015).

Preparación de la solución fenol al 5%:

- Diluir 5 ml de fenol en Diluir en 100 ml de agua Mili Q.
- Almacenar en un recipiente color ámbar.

Se recomienda realizar la preparación del reactivo en una campana de extracción.

Procedimiento:

- Colocar 10 ml del cultivo de microalga.
- Centrifugar a 4000 rpm por 15 minutos.
- Retirar el sobrenadante, y re suspender en 10 ml de agua bidestilada.
- Colocar 200 μ L de la muestra en un tubo de Eppendorf de 2 ml.
- Agregar 200 μ L de la solución de fenol al 5%.
- Mezclar por 5 segundos.
- Inmediatamente agregar 1 ml de ácido sulfúrico concentrado (98%-100%)
- Mezclar por 5 segundos.
- Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Leer densidad óptica a 488 nm y utilizar agua bidestilada como blanco.

Se recomienda dejar 10 segundos entre preparación de muestras.

Procedimiento para realizar la curva de calibración:

- Medir 10 mg de glucosa.
- Disolver en 10 ml de agua bidestilada.
- Realizar el procedimiento con un rango de muestra de 2 a 20 μ L.

Anexo 11. Cuantificación de carotenoides mediante método colorimétrico

Preparación de la solución hexano: acetona (80:20):

- Agregar 80 ml de hexano concentrado al 96%.
- Agregar 20 ml de acetona.

Se recomienda realizar la preparación del reactivo en una campana de extracción y en material de vidrio.

Procedimiento:

- Colocar 5 ml del cultivo de microalga.
- Centrifugar a 4000 rpm por 15 minutos.
- Retirar el sobrenadante.
- Pesar 0.06 gr del alga aproximadamente, anotar el peso exacto.
- Resuspender en 10 ml de la solución hexano: acetona.
- Leer densidad óptica a 450 nm y utilizar el hexano concentrado como blanco.
- Se recomienda usar cubetas de cuarzo para realizar la medición de absorbancia.

Utilizar la siguiente fórmula para la determinación de concentración:

$$\text{Concentración } \left(\frac{mg}{L} \right) = \left(\frac{Abs_{450nm} \times D}{E} \right) [3]$$

D=gr de alga/volumen en ml.

E=0.2592

Anexo 12. Cuantificación de proteínas mediante el KIT 23240 de Thermo Scientific, Modified Lowry Protein Assay Kit

Preparación del reactivo 1X Folin- Ciocalteu:

- Agregar 5 ml de 2X Folin-Ciocalteu.
- Agregar 5 ml de agua bidestilada.

Se recomienda no almacenar la solución, utilizarla el mismo día de elaboración.

Extracción de proteínas:

- Centrifugar 10 ml del cultivo micro alga, por 15 minutos a 4000 rpm.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender la micro alga con hidróxido de sodio a 1 M.
- Colocar a baño maría por una hora a 100° C.
- Enfriar las muestras a temperatura ambiente.
- Centrifugar por 10 minutos a 4000 rpm.

Procedimiento:

- Agregar 200 μ L del sobrenadante en un tubo Eppendorf.
- Agregar 1.0 ml del reactivo Lowry modificado. Mezclar perfectamente.
- Incubar por 10 10 minutos exactos a temperatura ambiente. Se recomienda dejar 15 segundos entre la preparación de muestras.
- Agregar 100 μ L de la solución preparada del reactivo 1X Folin- Ciocalteu.
- Inmediatamente colocarlo en el vortex con el fin de mezclar perfectamente.
- Cubrir y dejar incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Leer la absorbancia a 750 nm y utilizar como Zero agua destilada.

Realizar la curva de calibración:

Utilizar la solución stock de Estándar de albumina y realizar las siguientes diluciones.

Muestra	Volumen de NaOH	Volumen de BSA	Concentración final de BSA
A	250 μ L	750 μ L del stock	1500 μ g/mL
B	625 μ L	625 μ L del stock	1000 μ g/mL
C	310 μ L	310 μ L de la solución A	750 μ g/mL
D	625 μ L	625 μ L de la solución B	500 μ g/mL
E	625 μ L	625 μ L de la solución D	250 μ g/mL
F	625 μ L	625 μ L de la solución E	125 μ g/mL
G	800 μ L	200 μ L de la solución F	25 μ g/mL
H	800 μ L	200 μ L de la solución G	5 μ g/mL
I	800 μ L	200 μ L de la solución H	1 μ g/mL