



INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE HUATUSCO

**“TRATAMIENTO DE RESIDUOS ORGÁNICOS PARA LA
OBTENCIÓN DE BIO-MASA MICROALGAR (*Chlorella vulgaris*)”**

TESIS

**QUE COMO REQUISITOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO AMBIENTAL**

PRESENTA:

MARIELA MARTÍNEZ TORRALBA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. NOEMÍ NAVA VALENTE

CO-DIRECTOR DE TESIS:

DR. OSCAR ANDRÉS DEL ÁNGEL CORONEL

HUATUSCO, VERACRUZ

MAYO 2020

Huatusco, Ver., a 12 de Mayo de 2020

C. Mariela Martínez Torralba
PASANTE DE LA CARRERA DE
Ingeniería Ambiental
PRESENTE.

En relación a su solicitud relativa, me es grato transcribir a usted a continuación que después de haber sido analizado exhaustivamente la **TESIS** titulada:

**“TRATAMIENTO DE RESIDUOS ORGÁNICOS PARA LA OBTENCIÓN DE BIOMASA
MICROALGAR *Chlorella vulgaris*”**

Se le notifica que a mi juicio este cumple con los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes de la **OPCIÓN DE TITULACIÓN**, por lo que se autoriza su impresión.

ATENTAMENTE.

M.M. VÍCTOR MANUEL ARCOS FERIA
DIRECTOR DEL ITSH.



Av. 25 Poniente Num. 100 Col. Reserva Territorial
Huatusco, Veracruz, México. C.P. 94100
Tel. (01 273-73-4-40-00), e-mail: tec_huatusco@hotmail.com
www.itshuatusco.edu.mx



Huatusco, Ver., a 19 de Marzo del 2020.
Asunto: **Liberación del Informe final**

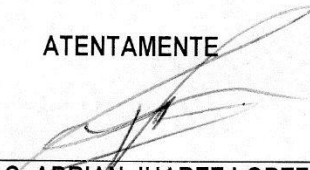
ING. CARINA ACOSTA SÁNCHEZ
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES
P R E S E N T E.

Por este medio les informo que ha sido liberado el siguiente proyecto para la Titulación Integral.

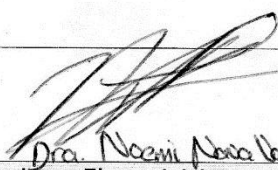
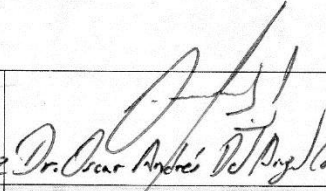
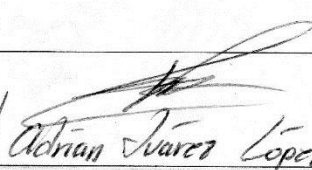
Nombre de la egresado	C. Mariela Martínez Torralba
Carrera:	Ingeniería Ambiental
No. de Control:	143Z0061
Nombre del Proyecto:	Tratamiento de residuos organicos para la obtencion de biomasa microalgar <i>Chlorella vulgaris</i> .
Producto:	I. Tesis

Agradezco de antemano su valioso apoyo en esta actividad para la formación profesional de nuestros(as) egresados(as).

ATENTAMENTE



M.C. ADRIAN JUAREZ LOPEZ
JEFE DE CARRERA DE ING. AMBIENTAL

 Dra. Naomi Novales	 Dr. Oscar Andrés Delgado	 Adrian Juarez Lopez
Nombre y Firma del Asesor (a)	Nombre y Firma del Revisor(a)	Nombre y Firma del Revisor(a)

C.C.P.- División de ** NOMBRE DE LA CARRERA- para su conocimiento.
Archivo..

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue elaborado durante el último semestre de la carrera de ingeniería Ambiental en el Instituto Tecnológico Superior de Huatusco, al cual agradezco por permitirme desarrollar el presente trabajo de residencia profesional haciendo un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente participaron distintas personas opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad. Este trabajo me ha permitido aprovechar la competencia y la experiencia de muchas personas que deseo agradecer en este apartado.

Dra. Noemí Nava Valente

Por darme la oportunidad de trabajar con ella en el desarrollo de este proyecto por su apoyo y sus asesorías y por el conocimiento transmitido durante las horas de clases, a lo largo de la carrera le agradezco al haber contribuido en mi formación y por ser una muy buena maestra y asesora, pero sobre todo me atrevo a decir una muy buena amiga, gracias por su confianza y apoyo es la mejor.

Dr. Oscar Andrés del Ángel Coronel

Por sus asesorías en este trabajo gracias a su tiempo, a sus aportaciones y conocimientos ayudándome a realizar cada una de las etapas propuestas y a la utilización del material para la culminación del presente trabajo gracias por ser un excelente maestro y asesor, pero sobre todo gracias por brindarme su confianza durante este tiempo y enseñarme el valor que tengo como persona. y que debo de tener perseverancia en todo para lograr mis metas y por mostrarme que debo de creer en mí misma, muchas gracias.

Dr. Luis Antonio López Escobar

Por brindarnos el apoyo necesario en las instalaciones de la UPH para la realización de la primera etapa del trabajo.

Docentes del ITSH

Gracias a cada uno de mis profesores que ayudaron a mi formación universitaria por su apoyo y dedicación en las aulas y fuera de ellas dándome grandes y diferentes experiencias con cada una de mis materias.

A mi compañera y amiga Heilyn

Gracias por haberme soportado durante este tiempo me doy cuenta que a veces no es la altura, ni el peso, ni los músculos, ni la belleza que hacen a una gran persona si no el corazón y la humildad y tú tienes un gran corazón súper grande y eso te hace una gran persona te quiero mucho, gracias por escucharme y darme tan buenos consejos cuando los necesitaba y por siempre ayudarme en lo que fuese del proyecto eres una gran chica y amiga.

A mi compañero Carlos

Te doy las gracias por ayudarme en mi proyecto y por las asesorías que algunas veces me dabas cuando no entendía sin ti no hubiera logrado algunas cosas de mi proyecto y mi escrito, gracias por salvarme, pero sobre todo gracias por convertirte en un buen mi amigo

DEDICATORIAS

Este trabajo se lo dedico a todas aquellas personas que forman parte importante de mi vida y que de una u otra forma hicieron posible la culminación de éste.

A mi familia

Por ser los principales motores de mi vida y de mi sueño porque todo lo que he conseguido en la vida se lo debo única y exclusivamente a mi familia, pues con su apoyo he podido ser una mujer de bien los quiero mucho.

A mi padre

Por darme la oportunidad de estudiar yo sé que, a habido momentos difíciles durante la universidad, pero le doy las gracias por apoyarme tenerme paciencia y por estar hoy y siempre en todo momento a mi lado lo quiero mucho.

A mi madre

Que es la persona que siempre me ha levantado los ánimos tanto en los momentos difíciles de mi vida estudiantil como personal. Gracias por su paciencia y esas palabras sabias que siempre tiene para mis enojos, mis tristezas y mis momentos felices, por ser mi amiga y creer en mí en todo momento incluso cuando a bases yo no creía que lo iba a lograr gracia por ayudarme a cumplir mis sueños mami la quiero mucho.

A mi hermano

por estar siempre a mi lado, y apoyarme como amigo siempre eres al que le cuento todo, confié en ti como en nadie gracias por todo, y a pesar de las peleas, somos hermanos y siempre estaremos juntos te quiero.

A mi amigo Eufra

Ya hace algo de tiempo que te conozco y en ese tiempo me he dado cuenta que en la vida hay cosas que nunca vuelven, las palabras, el tiempo y las oportunidades y tú siempre me das una palabra de aliento en mis días más difíciles me dedicas tu

tiempo y me diste una oportunidad al brindarme tu amistad tu compañía y tu apoyo en las buenas y en las malas muchas gracias por soportarme porque a veces puedo ser difícil y no sé cómo lo haces, pero lo que si se es que te quiero mucho.

A mi amigo Rey

Eres una gran persona y yo sé que a veces crecen miedos que nunca superamos, pero nadie te enseña hacer fuerte a veces la vida misma te obliga a serlo, pero tú me enseñaste que hay tantas personas con quien estar, pero no con quien podemos ser.

Amigo Borre

Sabes todos somos diferentes pero lo genial es que hay cosas que nos unen cuando hay voluntad y yo sé que eres de esos amigos que, aunque llueva o halla sol siempre estas cuando te necesito ya sea en los días malos o buenos, benditos cerrillos.

A mi amiga Inés

Siempre has estado conmigo desde que inicie esta otra etapa de mi vida a veces hemos tenido altas y bajas, pero siempre has estado ahí cuando más necesito que me escuchen el tiempo sigue pasando, y ahí estás, cerca de mi ofreciendo lo mejor que tienes gracias por tu apoyo y por cada uno de esos lindos momentos y detalles, que me has ofrecido en el transcurso de mi carrera y gracias por estos 5 años de amistad.

CONTENIDO TEMÁTICO

RESUMEN	xii
ABSTRAC.	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	3
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
III. ANTECEDENTES	4
IV. MARCO TEÓRICO.....	6
4.1. Residuos orgánicos	6
4.1.1. Alimentación animal	6
4.1.2. Compostaje	6
4.1.3. Biofertilizantes.....	6
4.1.4. Biocombustibles o biomasa.....	7
4.2. Estiércol de cerdo.....	7
4.3. Biomasa como fuente de energía.....	8
4.3.1. Biomasa natural	8
4.3.2. Biomasa cultivada	8
4.3.3. Biomasa residual.....	9
4.4. Digestion anaerobia.....	9
4.5. Microalgas	12
4.6. <i>Chlorella vulgaris</i>	14
4.7. Cultivo de Microalgas.	14
4.7.1. pH.....	15

4.7.2.	Salinidad	15
4.7.3.	Nutrientes.....	15
4.7.4.	Agitación	16
4.7.5.	Temperatura.....	16
4.7.6.	Medio de Cultivo	16
4.7.7.	Sólidos Totales.....	17
4.7.8.	Sólidos Volátiles.....	17
4.7.9.	Espectrofotometría.....	18
4.8.	Crecimiento celular de las microalgas	18
V.	JUSTIFICACIÓN.....	20
VI.	HIPOTESIS	21
VII.	METODOLOGIA.....	22
7.1.	Etapa 1 Obtención y caracterización del sustrato.....	22
7.2.	Etapa 2 Operación del reactor anaerobio mesofílico.....	23
7.3.	Etapa 3 Obtencion de la biomasa microalgar.....	25
7.3.1.	Condiciones para el Crecimiento de la Microalga <i>chlorella vulgaris</i>	25
7.3.2.	Medio de cultivo	26
7.3.3.	Esterilización del material.....	27
7.3.4.	Cultivo y propagación de la microalga.....	28
7.3.5.	Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> en medio Bristol y biosólido	28
7.3.6.	Medición de la absorción en el espectrofotómetro.....	30
7.3.7.	Lectura espectrofotométrica.....	31
7.3.8.	Centrifugación del biosólido	32
7.3.9.	Conteo celular en la cámara de Neubauer	32
7.3.10.	Cámara de Neubauer	33

7.3.11.	Cálculo de concentración.....	36
7.3.12.	Diseño de bloques	37
VIII.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	38
8.1.	Etapa 1 Obtención y caracterización de residuos.....	38
8.2.	Etapa 2 Operación del reactor anaerobio mesofílico	39
8.3.	Etapa 3 Obtención de biomasa microalgar.....	43
8.3.1.	Conteo celular <i>chlorella vulgaris</i> en la cámara de Neubauer	46
8.3.2.	Comparación de absorbancia de <i>chlorella vulgaris</i> y conteo celular en la cámara de neubauer	48
IX.	CONCLUSIONES.....	53
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	55
Anexos		64

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Proceso de digestión anaerobia (Silvestre, 2016) ainia.es.....	11
Figura 2 Metodología experimental.	22
Figura 3 Reactor anaerobio.....	24
Figura 4 Microlaga obtenida de la UNAM.....	25
Figura 5 Condiciones del crecimiento del cultivo.....	26
Figura 6 Autoclave modelo SM360-A.....	27
Figura 7 Cultivo inicial y escalamiento del cultivo inicial.....	28
Figura 8 Alimentación Inicial con el biosólido Durante 24 horas	29
Figura 9 Tratamiento al 100%, 50-50 % y 70-30%.....	29
Figura 10 Microalga bajo condiciones de luz y aireación en la campana para la medición de la absorbancia.....	30
Figura 11 Pipeteo de la muestra y réplica de la microalga.....	30
Figura 12 Espectrofotómetro	31
Figura 13 Centrifuga eppendorf Utilizada para la centrifugación del biosólido.	32
Figura 14 microscopio binocular marca BioBlue S/N- EU 1910302	33
Figura 15 Cámara de neubauer (Marienfeld, s.f.).....	34
Figura 16 cuadrícula de la cámara de neubauer (quercuslab.es).....	35
Figura 17 Conteo celular en forma de meandro (quercuslab.es).	35
Figura 18 Remoción de SV operación nivel piloto.....	39
Figura 19 Producción de biogás nivel piloto	40
Figura 20 Rendimiento de biogás y de metano operación nivel piloto	41
Figura 21 Rendimiento del pH operación a nivel piloto	42
Figura 22 Crecimiento celular mediante absorbancias de <i>chlorella vulgaris</i>	46
Figura 23 Crecimiento mediante conteo celular de <i>chlorella vulgaris</i>	48
Figura 24 Resultados de análisis de correlación entre absorbancia y conteo celular mediante regresión lineal. en cada panel se muestra la ecuación de la recta resultante, así como el valor de R ²	50
Figura 25 Diagrama de dispersión.	51
Figura 26 Coeficiente de correlación lineal.....	52

Figura 27 Valores del coeficiente de correlación.....	52
Figura 28 Crecimiento celular medido con espectrofotómetro durante 1 hr con mediciones cada 10 minutos.	64
Figura 29 Crecimiento celular medido con espectrofotómetro durante 12 hrs con mediciones cada hora.	65

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Composición Química del Biogás (Carrillo, L, 2003)	9
Cuadro 2 Residuos Orgánicos utilizados Para la operación del reactor.....	23
Cuadro 3 Condiciones de operación de los R.O. y R.P.....	23
Cuadro 4 Composición Química del Medio Bristol (Lara-Isass, 1998) Rev. Soco Mex. Hisl.....	27
Cuadro 5 Cinética de 24 horas con la cámara de Neubauer	33
Cuadro 6 Caracterización físico-química de la mezcla de residuos.	38
Cuadro 7 Resumen de parámetros operación nivel piloto.....	43
Cuadro 8 Coeficientes de correlación de Pearson entre absorbancia vs conteo celular.....	49
Cuadro 9 Análisis de varianza de dos vías para crecimiento (absorbancia) con tratamiento (tipo de medio de cultivo) y tiempo (horas de cultivo) como fuentes de variación	66
Cuadro 10 Análisis de varianza para N°cel/mil, utilizando SC ajustada para pruebas, con tratamiento (tipo de medio de cultivo) y tiempo (horas de conteo de células) como fuentes de variación.....	66
Cuadro 11 Análisis de varianza absorbancia vs tratamiento.....	67
Cuadro 12 Análisis de varianza conteo celular vs tratamiento.	67
Cuadro 13 Análisis de varianza absorbancia vs tiempo.	67
Cuadro 14 Análisis de varianza conteo celular vs tiempo.	68

INDICE DE FORMULAS

Fórmula 1 Cálculo para obtener solidos totales (ST).	17
Fórmula 2 Ecuación para obtener solidos volátiles (SV).	17
Formula 3 Calculo para el recuento celular en la cámara de neubauer	36
Formula 4 Cálculo para el recuento celular en la cámara de neubauer al plicar Alguna Dilución.	36
Formula 5 Coeficiente de correlación	51

RESUMEN

Los cambios socio económicos de las últimas décadas han propiciado la producción de grandes cantidades de residuos de naturaleza orgánica, los cuales pueden ocasionar graves problemas ambientales o incluso en la salud humana. Una alternativa de tratamiento es la digestión anaerobia, que puede describirse como un proceso de múltiples etapas mediante la cual se degrada la materia orgánica por la acción de una serie de microorganismos, transformándola en una mezcla gaseosa que se conoce como Biogás. Los efluentes generados en este proceso han sido aprovechados en la remediación de suelos, sin embargo, se considera que pueden darse otros usos como lo es la obtención de biomasa algar. Por ello, el objetivo del presente proyecto es desarrollar técnicas de cultivo algar (*Chlorella vulgaris*) a partir del tratamiento de residuos orgánicos (residuos porcícolas y residuos orgánicos municipales) vía cogestión anaerobia. Se plantearon 3 etapas metodológicas para alcanzar los objetivos propuestos: Etapa 1 obtención y caracterización de los sustratos, etapa 2 operación del reactor anaerobio mesofílico y la etapa 3 obtención de la biomasa algar. Los residuos se acondicionaron para obtener una concentración de sólidos totales de 2.5-3.0%, ideales para el proceso de digestión anaerobia y presentó un valor de 87.3 % de sólidos totales volátiles siendo por tanto ricos en materia orgánica. Durante el proceso de digestión anaerobia, se presentó un porcentaje de remoción de SV de 45.9% y la producción de biogás promedio fue de 2502.3 mL/d. Una vez obtenidos los biosólidos del proceso de digestión anaerobia, se cultivó *chorella vulgaris* en tres condiciones diferentes; en medio Bristol al 100%, una combinación de medio Bristol 50% y Biosólido 50% (50-50 Bristol-Biosólido) y Bristol 70% y Biosólido 30% (70-30 Bristol-Biosólido). Los tratamientos tuvieron diferencias estadísticamente significativas únicamente durante el periodo de medición del crecimiento a 24 horas. En contraste los cultivos con combinaciones 50-50% y 70-30% de Bristol-Biosólido, tienen un desempeño muy similar durante las primeras 15 horas, a partir de las 16 horas se observa una clara tendencia de crecimiento acelerado del cultivo 70-30% Bristol-Biosólido, alejándose completamente de la tendencia del cultivo 50-50% observándose una

tendencia de crecimiento de menor magnitud que la de 70-30% Bristol-Biosólido. Por lo cual, el mejor medio de cultivo fue el 70-30% Bristol-Biosólido.

ABSTRAC.

The socio-economic changes of the last decades have led to the production of large amounts of organic waste, which can cause serious environmental problems or even human health. An alternative treatment is anaerobic digestion, which can be described as a multi-stage process through which organic matter is degraded by the action of a series of microorganisms, transforming it into a gaseous mixture known as Biogas. The effluents generated in this process have been used in soil remediation, however, it is considered that other uses may be given, such as obtaining algal biomass. For this reason, the objective of this project is to develop algal cultivation techniques (*Chlorella vulgaris*) from the treatment of organic waste (pig waste and municipal organic waste) via anaerobic co-management. Three methodological stages were proposed to achieve the stated objectives: Stage 1 obtaining and characterizing the substrates, stage 2 operation of the anaerobic mesophilic reactor and stage 3 obtaining the algal biomass. The residues were conditioned to obtain a total solids concentration of 2.5-3.0%, ideal for the anaerobic digestion process and presented a value of 87.3% of total volatile solids, being therefore rich in organic matter. During the anaerobic digestion process, a SV removal percentage of 45.9% was presented and the average biogas production was 2502.3 mL / d. Once the biosolids from the anaerobic digestion process were obtained, *chorella vulgaris* was grown under three different conditions; in 100% Bristol medium, a combination of 50% Bristol and 50% Biosolids (50-50 Bristol-Biosolids) and Bristol 70% and 30% Biosolids (70-30 Bristol-Biosolids). The treatments had statistically significant differences only during the 24-hour growth measurement period. In contrast, the cultures with 50-50% and 70-30% combinations of Bristol-Biosolids, have a very similar performance during the first 15 hours, from 16 hours a clear trend of accelerated growth of the 70-30 culture is observed. % Bristol-Biosolide, completely moving away from the 50-50% culture trend, observing a growth trend of less magnitude than that of 70-30% Bristol-Biosolide. Therefore, the best culture medium was 70-30% Bristol-Biosolid.

I. INTRODUCCIÓN

El agotamiento de los combustibles fósiles lleva a las industrias y científicos a investigar el desarrollo de tecnologías para obtener fuentes energéticas renovables (Zah et al., 2007). En México, el objetivo del programa especial para el aprovechamiento de energías renovables es fomentar dichas fuentes energéticas y la producción de biocombustibles con un enfoque técnico económico, ambiental y socialmente viable. El programa plantea aumentar el porcentaje de la capacidad instalada en el país de estas alternativas de energía limpia en 29 % de la capacidad de generaciones previstas para el 2018 (SENER, 2013).

Si bien toda la sociedad requiere, ineludiblemente, producir y consumir la energía para sus procesos productivos, es importante considerar que los patrones de producción y consumo de energía tienen incidencia en las transformaciones del medio ambiente. Los cambios socioeconómicos de las últimas décadas; las altas concentraciones de población en núcleos urbanos, el desarrollo de la industria agroalimentaria, etc., han propiciado la producción de grandes cantidades de residuos de naturaleza orgánica, los cuales pueden ocasionar graves problemas ambientales o incluso en la salud humana.

Una alternativa de tratamientos es la digestión anaerobia, que puede describirse como un proceso de múltiples etapas mediante la cual se degrada la materia orgánica por la acción de una serie de microorganismos, transformándola en una mezcla gaseosa constituida principalmente de CH_4 y CO_2 , que se conoce como Biogas, sin embargo, este tratamiento genera efluentes que si bien pueden ser aprovechados como remediadores de suelos, en la actualidad hay estudios relacionados con sistemas basados en análisis desarrollados sobre el cultivo de microalgas de una sola especie, usando un medio enriquecido, a escala de laboratorio y piloto.

Pero la evaluación del cultivo de microalgas en efluentes provenientes de la co-digestión anaerobia de residuos orgánicos y excretas porcinas para la acumulación de lípidos para producir biodiésel hasta hoy no ha sido muy explorada.

El desarrollo de microalgas en desechos de diferentes residuos animales fue descrito por (Hill 1977) y Lincoln *et al.*, (1980). En pocos estudios realizados se demostró que el residual porcino digerido anaeróbicamente puede utilizarse como medio nutritivo para el cultivo de *Spirulina platensis* y que concentraciones de 0.6-3.0% (19.8-98.8 mg N-NH₄/L 1.7-8.3 MG PO₄ L, Y 46.4-231.7 mg DQO L). Las especies de *Chlorella* mostraron una mayor capacidad de remoción de N-NH₄ Y P-PO₄ a la mayor concentración de residual dirigido (Pi-Hsin., 1980.).

En los estudios hechos por (Cañizares., *et al.*, 1993) (Cañizares- Villanueva, *et al.*, 1994) utilizando las cianobacterias *Phormidium sp.* Y *spirulina* máxima sobre el tratamiento terciario de residual porcinos previamente estabilizados y digeridos, se encontró que la demanda química de oxígeno (DQO) disminuyo a concentraciones que el efluente terciario obtenido permitió su vertimiento a cuerpos de agua, o su utilización en actividades de regadío y de limpieza.

En las investigaciones llevadas a cabo por (Gonzalez, *et al.*, 1997) incluyeron que las microalgas *Scenedesmus dimorphus* y *Chlorella vulgaris* fueron capaces de fijar fosforo y amoniaco en la misma proporción. Utilizando agua residual porcina proveniente de un tratamiento secundario diluida en una relación 1:1. Escalaron una laguna de 3000 m³ para el tratamiento terciario de efluentes porcinos, misma que fue inoculada con *Chlorella vulgaris* y se evaluó su comportamiento por 130 días, con un tiempo de retención hidráulica de tres días. Los autores observaron que la DQO, la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), el nitrógeno y los fosfatos, disminuyeron después de la adición de la microalga. Asimismo, observaron una disminución en la cantidad de microorganismos nativos, debido a la competencia con las microalgas. El agua tratada en la laguna fue utilizada para ingestión porcina y después de 90 días, se concluyó que este tipo de aplicación resulto viable.

II. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar técnicas de cultivo alga (*Chlorella vulgaris*) a partir del tratamiento de residuos orgánicos (residuos porcícolas y residuos orgánicos municipales) vía cogestión anaerobia.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Monitorear el proceso de co-digestión anaerobia de residuos porcinos y residuos orgánicos municipales.
- Evaluar el crecimiento de la microalga *chlorella vulgaris* a partir de los biosólidos obtenidos en el proceso de co-digestión anaerobia.
- Determinar las condiciones y concentraciones de sustratos recomendables para la obtención de Biomasa *chlorella vulgaris*.

III. ANTECEDENTES

Diferentes autores han propuesto alternativas de uso y aprovechamiento de la biomasa algar, ya sea resultante del proceso de biodigestor anaerobia o bien resultante del proceso de obtención de biodiesel para mejorar los rendimientos del proceso anaerobio.

El efecto de varias estrategias de pretratamientos sobre los rendimientos de metano después de la digestión anaeróbica (DA) de cinco cepas de microalgas diferentes. *Pavlova_ef sp.*, *Tetraselmis sp.* Y *Thalassiosira Weissflogii* exhibió rendimientos sustanciales de metano de 0.4-0.5 g/L de solidos volátiles sin pretratamiento, proporcionando hasta 75-80 % de los valores teóricos. Por el contrario, los rendimientos de metano de *Chlorella sp.* Y *Nannochloropsis sp.* Fueron alrededor de 0.35 g/L, o 55-60% de valores teóricos, respectivamente. El tratamiento con álcali no fue efectivo y el pretratamiento térmico solo mejoro los rendimientos de metano de *Nannochloropsis* (Bohutskyi, 2014).

Se realizó un estudio que tuvo como objetivo investigar la efectividad del cultivo de *parachlorrela kessleri* y *acutodesmus obliquus* en efluentes de digestión anaerobia (EDA) derivados de la co-digestión de productos lácteos con mezcla de desechos agroindustriales. Para este fin, se evaluó su rendimiento bajo condiciones estériles y no estériles y diferentes cargas (EDA), en términos de producción de biomasa y lípidos, eficientes de eliminación de nutrientes y vitalidad del aparato fotosintético. La asimilación de n de 49.7 mg/L y 32.3 mg/L. entre todos los tratamientos basados en (EDA) probados, p. *Kessleri* supero a *Obliquus*, sin que se observaran diferencias entre (EDA) esterilizado y no esterilizado (Koutra, 2016) .

Se demostró que la digestión anaerobia de la biomasa residual de algas de la producción de Biodiesel puede proporcionar nutrientes y energía adicional. La digestión anaerobia de *Chlorella sorokiniana* 1412 algas celulares enteras, algas sonicadas y sometidas a extracción de lípidos en reactores discontinuos a escala de laboratorio operados a 30 ± 2 °C durante 42 días liberaron una cantidad considerable de nitrógeno y fosforo en las células de algas (Ayala-Parra, 2017).

Se asegura que la co-digestion anaerobia tiene el potencial de mejorar la produccion de biogas, pero se dispone de informacion cinetica limitada para la co-digestion. En su estudio introdujo modelos basados en regresion para estimar los parametros cineticos para la co-digestion de microalgas y lodos activados. Los modelos se desarrollaron usando las relaciones de cosustratos y los parametros cineticos para el sustrato individual como indicadores. Los modelos pueden usarse para estimar parametros cineticos no solo para la co- digestion de microalgas lodos activados si no tambien para la co-digestion de otros sustratos, como el estiercol de cerdo y microalgas de las plantas de tratamientos de aguas residuales. (Lee, 2017)

Se demostro que el residual porcino dirigido anaerobicamente puede utilizarse como medio nutritivo para el cultivo de *Spirulina platensis* y que concentraciones de 3-6 mg/Kg de $\text{NH}_3\text{-H}$ en el residual fermentado, fueron las optimas para su crecimiento (Pi- Hsin T., 1980). Por otro lado se realizaron Bio-tratamiento con microalgas utilizando residual porcino dirigido anaerobiamente, el cual fue diluido en concentraciones de 0.6-3.0% (19.8-98.8 mg $\text{N-NH}_4\text{ L}$, 1.7-8.3 mg $\text{P-PO}_4\text{ L}$, y 46.4-231.7 mg DQO/L). Las especies de *chlorella* demostraron una mejor capacidad de remoción de N-NH_4 Y P-PO_4 (Basséres N. y., 1989).

Se evaluaron las características de las microalgas cultivadas en experimentos continuos a escala de laboratorio combinados con la co-digestion anaerobica de lodos residuales y microalgas por hasta 10 meses. Y asegura que la codigestion anaerobia conbinada de lodos residuales y microalgas, es un enfoque prometedor de recuperacion de energia (Hidaka, 2017).

El efluente digerido anaerobicamente a partir de residuos de cocina (EDA-RC) es un medio potencial para el cultivo de microalgas por que contiene abundantes nutrientes. En este estudio, se utilizó (EDA-RC) para cultivar las microalgas aisladas *Chlorella sorokiniana sdee-18* y *scenedesmus sdec-8*, que mostraron producciones de biomasa aptimas de 0.42 g/L y 0.55 g/L, respectivamente, con (EDA) diluido 1/15. Kw. los contenidos de lipidos de *Chlorella sorokiniana adec-8* (35.97-47.39%) en este medio tenian ventajas obvias sobre los controles cultivados en medio bg 11 (Zhang, 2018).

IV.MARCO TEÓRICO

4.1. Residuos orgánicos

En la mayoría de los países de América latina, la cantidad de residuos presentes en los residuos sólidos urbanos recolectados diariamente supera el 50 % del total, del cual solo un 2% recibe algún tipo de tratamiento, el resto termina en rellenos sanitarios o en tiraderos a cielo abierto (Jaramillo G. *et al.*, 2008).

Los residuos orgánicos no tienen un valor económico como tal, es por eso que su valorización es un poco, complicada, sin embargo, de acuerdo con Perdomo, (2008) estos crean problemas de manera casi inmediata, que suele afectar a la población, tales como: propagación de plagas en los cultivos, proliferación de vectores tales como moscas, ratas, cucarachas entre otros, malos olores y el impacto visual y paisajístico.

Existen diferentes alternativas para disminuir el tan creciente problema de los residuos que terminan siendo desechados, (Jaramillo G. *et al.*, 2008) destacan 4 principales alternativas de uso a los residuos orgánicos

A continuación, se presenta un análisis de las alternativas

4.1.1. Alimentación animal

En varias partes de México y principalmente en las zonas rurales, esto es muy frecuente, sin embargo, dado a que el residuo orgánico presente grandes cantidades de humedad, es necesario no dejar pasar varios días para su consumo y así evitar la descomposición de los mismos y después ser apto para consumo animal.

4.1.2. Compostaje

Es un abono orgánico que se forma por la degradación microbiana de materiales acomodados en cepas y sometidos a un proceso de descomposición (Torres, 2005)

4.1.3. Biofertilizantes

Fertilizantes que provienen de la naturaleza y que incrementan el contenido nutricional del suelo.

4.1.4. Biocombustibles o biomasa

Cualquier tipo de combustible sin importar el estado en el que se encuentre (líquido, sólido o gaseoso) que proviene de la biomasa (es la utilización de la materia orgánica como fuente energética, abarca un amplio conjunto de materias orgánicas que se caracteriza por su heterogeneidad, tanto por su origen como por su naturaleza) (Renobables, 2016).

4.2. Estiércol de cerdo

A nivel mundial, México ocupa el lugar número 10 en producción de carne de cerdo (Agriculture, April 2010). Los seis principales estados de producción porcícola son Jalisco, con 265 mil 217 toneladas; sonora, 234 mil 639 toneladas; puebla, 166 mil 947 toneladas; Yucatán, 135 mil 442 toneladas; Veracruz, 122 mil 329 toneladas, y Guanajuato, 110 mil 489 toneladas (SAGARPA, 2009-2017).

La crianza extensiva de cerdos en confinamiento impacta de forma significativa al medio ambiente en el que se desenvuelve, mayormente por la presencia de estiércol porcino, principal componente de las aguas residuales generadas en las granjas porcinas como resultado del proceso productivo. En los últimos años se viene observando el crecimiento del tamaño de las granjas y la implementación de nuevas, en la costa central, lo cual ha traído consigo el aumento del volumen de estiércol producido, el mismo que en la mayoría de las granjas no están siendo adecuadamente manejada, lo cual impacta negativamente al medio ambiente, perjudicando el medio hídrico, atmosférico y suelo (Pinos, *et al.*, 2012).

El proceso mas utilizado de aprovechamiento para los desechos de las granjas y que se lleva de manera natural, es la descomposición de la materia organica. Este, cuando es aplicado por el hombre mediante el conocimiento de los mecanismos fisicos y bioquimicos que en el interbienen, le ha permitido tratar sus desechos y poder reutilizarlos, esto es incorporar al suelo el potencial nutritivo del material tratado. Este metodo de tratamiento, recibe el nombre de composteo o ensilado y ha sido utilizado por muchos paises, donde por medios naturales les ha sido posible tratar sus desechos organicos a bajos costos y utilizado para la fertilizacion de las

tierras de cultivo y en la actualidad para mejorar la producción de peces en la acuicultura.

4.3. Biomasa como fuente de energía.

La sustentabilidad en el crecimiento económico requiere de recursos adecuados para la producción industrial. El sector industrial ha iniciado la búsqueda de tecnologías que permitan la obtención de fuentes alternativas de energía renovable, este crecimiento significativo en el interés por fuentes alternativas de energía genera un enorme potencial para explotar la Biomasa como fuentes energéticas.

La biomasa es una fuente de energía prometedora, la cual incluye desechos orgánicos, desechos animales, desechos de plantas de tratamiento de aguas, residuos industriales y agrícolas, así como cultivos energéticos los cuales pueden ser usados como para la producción de Biocombustibles (Antonopoulou, *et al.*, 2008). En la Biomasa, la concentración de cada clase de compuesto varía dependiendo de la especie, el tipo de tejido de la planta, la etapa de crecimiento y las condiciones de crecimiento (Stevens, *et al.*, 2011).

Atendiendo a su origen la biomasa se puede clasificar en:

4.3.1. Biomasa natural

Producida en los ecosistemas naturales, aunque es una de las principales fuentes energéticas en los países en vías de desarrollo, no es la más adecuada para un aprovechamiento energético masivo ya que podría originar una rápida degradación de los ecosistemas.

4.3.2. Biomasa cultivada

Producida con fines energéticos y no alimentarios (leñosa o herbácea), se pueden diferenciar dos tipos, los orientados a la producción de materiales leñosos con especies de arbóreas de crecimiento rápido y los orientados a la producción de especies vegetales anuales.

4.3.3. Biomasa residual

Generada como residuo en los procesos productivos de los sectores agrícola, forestal o industrial y residuos urbanos.

El presente proyecto de investigación brinda una alternativa de tratamiento de residuos organicos y estiercol de cerdo con la finalidad de obtener biomasa, ademas de emplear el biol resultante del proceso de digestion como sustrato para la obtencion de biomasa algar y su posible aprovechamiento para la produccion futura de biodiesel.

4.4. Digestion anaerobia

La digestión anaerobia es una fermentación microbiana en ausencia de oxígeno que da lugar a una mezcla de gases (principalmente metano y dióxido de carbono), conocida como "Biogás" y a una suspensión acuosa o "lodo" que contiene los microorganismos responsables de la degradación de la materia orgánica. La materia prima preferentemente utilizada para ser sometida a este tratamiento es cualquier biomasa residual que posea un alto contenido en humedad, como restos de comida, restos de hojas y hierbas al limpiar un jardín o un huerto, residuos ganaderos, lodos de plantas depuradoras de aguas residuales urbanas y aguas residuales domésticas e industriales (Blaco, *et al.*, 2011).

El rendimiento del proceso depende de las características físicas y químicas del sustrato, tal como pH, temperatura, potencial redox, y la retención del agua y solidos

Dependiendo de la materia prima y la calidad del proceso, la composición del biogás es como se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1 Composición Química del Biogás (Carrillo, L, 2003)

Componente	Fórmula química	Porcentaje
Metano	CH ₄	50 – 80
Dióxido de carbono	CO ₂	30 – 50
Hidrógeno	H ₂	0-2
Nitrógeno	N ₂	0-1

Monóxido de carbono	CO	0-1
Oxígeno	O ₂	0-1
Ácido sulfhídrico	H ₂ S	0.0001-0.007

La digestión anaerobia está caracterizada por la existencia de varias fases consecutivas diferenciadas en el proceso de degradación del sustrato.

En el proceso de degradación del sustrato intervienen 5 grupos principales de bacterias.

Estas poblaciones se caracterizan por estar compuestas por organismos con diferentes velocidades de crecimiento y diferentes sensibilidades a cada compuesto intermedio como inhibidor (por ejemplo, H₂, ácido acético o amoníaco producido de la acidogénesis). Esto implica que cada etapa presentará diferentes velocidades de reacción según la composición del sustrato y que el desarrollo estable del proceso global requiera de un equilibrio que evite la acumulación de compuestos intermedios inhibidores o la acumulación de ácidos grasos volátiles (AGV's), que podría producir una disminución del pH. Para la estabilidad del pH es importante del equilibrio CO₂-bicarbonato. para hacer posible algunas reacciones es necesario la asociación sintrofica entre bacterias acetogenicas y metanogenicas, creando agregados de bacterias de esta población (Vergine *et al.*, 2014.). por lo que, tratamientos previos a la digestión anaerobia podrían favorecer el hidrolisis macromolecular, y por tanto la capacidad del proceso anaerobio incrementando su capacidad de tratamiento, la eficiencia del proceso y el rendimiento del metano en la figura 1 se muestra el proceso de la digestión anaerobia.

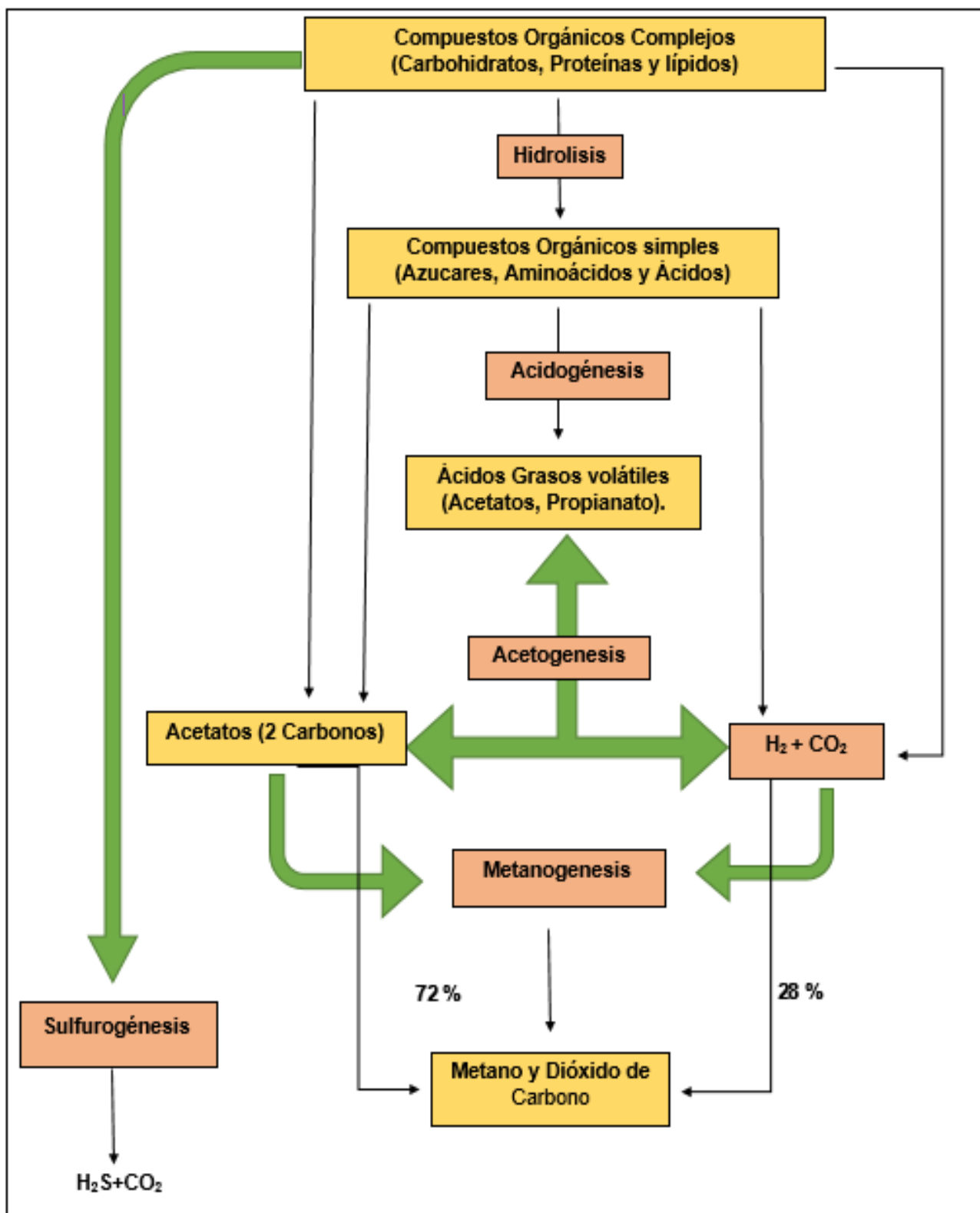


Figura 1 Proceso de Digestión Anaerobia (Silvestre, 2016) ainia.es

4.5. Microalgas

Son microorganismos que pertenecen al reino protista, que es aquel en el cuál se agrupan todos aquellos organismos, que no pueden categorizarse dentro de los animales plantas u hongos (Abalde, 1995) Están presentes en cualquier medio natural donde existe una fuente de carbono, nutrientes y luz suficiente, junto con un intervalo apropiado de temperatura. La primera microalga aislada y mantenida en condiciones anóxicas fue *Chlorella vulgaris*, en 1890, aunque hasta la década de 1940, no se iniciaron estudios sobre la fisiología y bioquímica de estos microorganismos. La idea de producir microalgas a gran escala tuvo su origen en Alemania durante los años 40 utilizando diatomeas (Harder, 1942) Hasta la fecha se han descrito más de 40,000 especies (Elliott, *et al.*, 2012.) aunque algunos autores refieren números muy superiores (más de 100,000) (Demirbas, 2010)

Las microalgas se han considerado buenos organismos modelo para el estudio de complejos procesos biológicos como la morfogénesis y diferenciación, el reconocimiento celular, los ritmos biológicos, la evaluación de procesos y rutas metabólicas la fisiología y bioquímica de la fotosíntesis. Por otro lado, en las microalgas se combinan propiedades metabólicas típicamente vegetales con características propias de células microbianas tales como la capacidad de crecimiento rápido en cultivo líquido, simplicidad de requerimientos nutritivos, plasticidad metabólica, tolerancia a condiciones extremas, capacidad de sintetizar y secretar algunos metabolitos y potencialidad de manipulación genética, que les confiere interés biotecnológico (Borowitzka, 2013).

La importancia y las aplicaciones de estos microorganismos es que son el primer eslabón de la cadena alimenticia en el mar; se utilizan como fuente de biocombustibles, fertilizantes, alimentación animal y otros usos en la industria alimentaria, y en la industria de medicamentos; son utilizados también en el tratamiento de aguas residuales; gracias a su capacidad de absorber CO₂ y otros gases de efecto invernadero (Velasquez, 1981) se han descrito microalgas con capacidad de degradar crudo (Ramakrishnan, 2013) Diversas microalgas excretan carbohidratos y otros compuestos orgánicos complejos con capacidad de adsorber

caciones, haciéndolas especialmente interesantes para la remoción de metales pesados generados en los efluentes de actividades industriales como minería y metalurgia, evitando su dispersión y acumulación en el medio ambiente y en la cadena trófica con el consiguiente riesgo para la salud humana. (Orandi, 2013)

La idea inicial de producir lípidos a partir de microalgas para su transformación en combustibles alternativos a los derivados del petróleo es muy antigua (Harder, *et al.*, 1942) la situación energética actual ha dado un nuevo impulso a estas iniciativas buscando reducir la dependencia del petróleo y la emisión de gases de efecto invernadero.

El uso de cultivos vegetales con fines energéticos no es nuevo (Brennan, 2010) La primera aproximación fue el uso de azúcares y aceites derivados de plantas. Mediante la digestión y fermentación del almidón provenientes de granos de cereales como maíz, trigo o cebada o de caña de azúcar se genera bioetanol. Aceites de plantas oleaginosas como palma, soja o colza se utilizan para la producción de biodiesel. Sin embargo, estas materias primas son la base de la nutrición mundial planteándose la disyuntiva de su uso como alimento o como combustible.

Por otra parte, las grandes extensiones de tierra y agua necesarias para estos cultivos han impulsado la búsqueda de otras materias primas más sostenibles (Borowitzka, *et al.*, 2010)

En el potencial de la biomasa de microalgas como fuente de materias primas para Biocombustible se basa en su rápido crecimiento y alta productividad, no competencia con la agricultura tradicional, posibilidad de utilización de agua residual, salobre o marina y elevado contenido en aceite y/o azúcares (Douskova, 2009). Se estima que, para cubrir la demanda global de combustibles, debería destinarse a cultivos de microalgas unos 6 millones de hectáreas, lo que supone, menos del 0.4% de la superficie cultivable (Gressel, 2008).

Para el establecimiento de un proceso de producción de microalgas para la obtención de un compuesto de interés, es de crucial importancia la selección de la

microalga más idónea para el fin propuesto atendiendo a factores como la elevada productividad, tolerancia a temperatura, pH e irradiación, elevado rendimiento en el compuesto de interés y facilidad de recolección. Igualmente es necesario definir las condiciones de operación y el sistema de cultivo.

4.6. *Chlorella vulgaris*

Su taxonomía es la siguiente:

Reino: Protista, Division: Chlorophyta, Clase: Chlorophyceae Orden: Chlorococcales, Familia: Oocystaceae, Genero: Chlorella, Especie: vulgaris.

Esta es una microalga unicelular de color verde, de forma esférica, con un diámetro que está entre 100 y 1000 veces menor a 1 milímetro. El color verde lo obtiene gracias a los cloroplastos que son las estructuras encargadas de hacer la fotosíntesis, no presenta flagelo y en la mayoría de veces se encuentra en los cuerpos de agua dulce; se reproduce de forma acelerada y de forma asexual (WANG, 2009)

Su composición química es de 51-58% de proteína, 12-17% de carbohidratos, 14-22% de lípidos, estos porcentajes se presentan en materia seca. Cuando sus células alcanzan su tamaño máximo, el núcleo se divide en cuatro u ocho partes y en el interior de la célula madre se forman de cuatro a ocho células más pequeñas idénticas a la célula madre, estas son las autoesporas que son liberadas por la célula madre por eclosión, transformándose entonces en nuevas *chlorellas* al crecer; estas microalgas pueden resistir temperaturas de hasta 36°C.

4.7. Cultivo de microalgas.

Los factores que influyen en el crecimiento de las microalgas son similares, sin embargo, cada especie y subespecie de microalga presenta sus propias características respecto a sus condiciones óptimas de crecimiento, así como unas productividades máximas alcanzadas en diferentes configuraciones de sistemas de cultivo.

En promedio, las microalgas duplican su Biomasa en 24 horas. Sin embargo, en la fase exponencial algunas microalgas pueden doblar su biomasa en tiempos tan cortos como tres horas y media. (Abalde., 1995).

4.7.1. pH

Cada especie de microalga tiene un rango de pH en el cuál su crecimiento es óptimo, dependiendo de qué especies químicas este más habituada a asimilar. El pH en la mayoría de los cultivos de microalgas se encuentra entre 7-9 unidades, siendo entre 8.2 – 8.7 unidades, el óptimo.

El proceso fotosintético de fijación de CO₂ provoca un aumento gradual del pH en el medio debido a la acumulación de OH⁻, lo que puede promover la eliminación de nitrógeno en forma de amoníaco a la atmósfera y la eliminación de fósforo por precipitación de ortofosfatos. El control de pH se logra mediante la aireación o inyección controlada de CO₂, aunque también mediante la adición de ácidos o bases.

El descenso del pH puede ser letal para el crecimiento de la microalga, sin embargo, los aumentos de pH suelen resistirlos. (Malgas., 2013)

4.7.2. Salinidad

La salinidad del medio de cultivo tiene una gran influencia en el crecimiento de las microalgas, así como en la productividad de lípidos para biodiesel u otras sustancias de valor. Araujo en el 2011 hizo un estudio con 10 cepas de microalgas diferentes donde observo como cada especie respondía de modo distinto ante los cambios en la salinidad del medio cambiando de 25 g/L a 35 g/L, calculando los resultados de rendimiento y productividad de biomasa. Aunque algunas especies de microalgas no respondieron frente a los cambios en la salinidad la mayor productividad se alcanzó con *Chlorella vulgaris*, la cual alcanzó una relación de Bio-masa inicial: final de 1:10 (Moronta, *et al.*, 2006).

4.7.3. Nutrientes

A medida que hay crecimiento, las algas requieren mas reactantes en la reaccion fotosintetica. Dos de los mejores nutrientes son nitrógeno y fósforo, ambos juegan

un rol en controlar la velocidad de crecimiento y la producción de lípidos. Otros nutrientes esenciales son: carbón, hidrógeno, sodio, potasio y cloro.

4.7.4. Agitación

La agitación facilita la eficiencia en el transporte, impidiendo la sedimentación de las microalgas y su adherencia a las paredes del recipiente que lo contiene, homogeniza el pH y asegura la distribución de los gases y de la luz. Con una correcta agitación se somete a las microalgas a ciclos rápidos de mezclado en las que en cuestión de milisegundos pasan de una zona oscura a una zona iluminada. La agitación incide debido a que en primer lugar ésta garantiza una distribución homogénea de las células y los nutrientes dentro del cultivo, mejora la distribución de la luz y evita que las células se sedimenten en el medio de cultivo. (Acosta, 2004)

4.7.5. Temperatura

La producción algal se incrementa proporcionalmente con la temperatura hasta llegar a una temperatura óptima de cada especie. Cuando se está por encima de esta temperatura, se aumenta la respiración y la fotorrespiración reduce la productividad global. La temperatura óptima varía entre las especies; pero en general está entre 28°C y 35°C. (Abalde., 1995)

4.7.6. Medio de cultivo

Para el crecimiento de las microalgas el medio de cultivo es de vital importancia, éste va a contribuir con los macronutrientes y micronutrientes necesarios para el crecimiento adecuado de la microalga, por ello se debe tener en cuenta que existen diferentes tipos documentados en la literatura; el tipo de medio de cultivo que se va a utilizar depende de la clase de microalga la cual se quiere hacer crecer (Angel, *et al.*, 2012) utiliza como medio de cultivo el Medio Bristol sugerido por (Gomez., 1997) a partir de soluciones patrón, de las que se tomaron alícuotas correspondientes con los macronutrientes y micronutrientes necesarios que requieren las microalgas para lograr un buen crecimiento celular.

4.7.7. Sólidos totales

Los sólidos totales (ST) se definen como la materia que permanece como residuo luego de una evaporación y secado a 103°C-105°C. El valor obtenido de los sólidos totales incluye tanto materia disuelta (porción de sólidos totales que pasa a través del filtro), como materia no disuelta (porción de sólidos totales que es retenida por el filtro). (Carpio, 2007). y el cálculo para realiza los ST se muestra en la fórmula 1

Fórmula 1 Cálculo para obtener solidos totales

$$\% ST = \frac{P3 - P1}{P2 - P1} * 100$$

Los análisis de sólidos son de importancia en el proceso de tratamiento biológico y físico de aguas residuales, para evaluar el cumplimiento de las limitaciones que regulan vertimiento.

4.7.8. Sólidos volátiles

Los sólidos volátiles (SV) son aquellos que se volatilizan a una temperatura de 550°C. Cuando los sólidos totales se someten a combustión bajo una temperatura de 550°C durante 20 minutos, la materia orgánica se convierte en dióxido de carbono y agua. Esta pérdida de peso se interpreta en términos de materia orgánica o volátil. (Associatio, 2012) para obtener el peso de los sólidos volátiles se puede utilizar la siguiente ecuación como se muestra en la figura 2.

Fórmula 2 Ecuación para obtener solidos volátiles (SV).

$$\% SV = \frac{P3 - P4}{P3 - P1} * 100$$

4.7.9. Espectrofotometría

Es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma.

4.8. Crecimiento celular de las microalgas

El crecimiento y desarrollo general de las microalgas viene dado por cinco fases. Éstas se definen en función del número de células a lo largo del tiempo.

- La primera fase corresponde a un período de adaptación del metabolismo celular a las condiciones del cultivo y está caracterizado por bajos incrementos en la densidad celular. Esta fase es conocida como fase de adaptación. Una vez que las microalgas han logrado adaptarse al medio, se produce una rápida y constante división celular en la que el crecimiento se da de forma exponencial sin ningún tipo de factor limitante para la multiplicación celular. Finalizada la fase exponencial.
- El crecimiento de la población microalgar continua, pero en menor proporción, ya que existe una limitada disponibilidad de los factores que regulan el crecimiento (nutrientes, pH, dióxido de carbono) dando lugar a una fase de declinación de la fase exponencial.
- A continuación, se produce una fase estacionaria donde la natalidad producida es igual a la mortalidad, en consecuencia, las densidades celulares se mantienen más o menos sin cambios relevantes.
- Finalmente, se produce la fase muerte, en la que las microalgas comienzan a morir ante la escasez de nutrientes, liberando sustancias inhibitorias al medio que dificultan el crecimiento.

- Con lo cual, al incrementarse el número de células muertas y, ante las condiciones desfavorables, se genera un colapso final del cultivo.

V. JUSTIFICACIÓN

La generación de residuos orgánicos municipales y residuos porcinos es un problema, las grandes cantidades de nutrientes y metales pesados que generalmente están presentes en las aguas residuales municipales, agrícolas e industriales pueden constituir una amenaza potencial para los ecosistemas naturales y bienestar humano, en caso de que terminen en cuerpos de agua (Eleni Koutra *et al.*, 2016).

Los residuos porcinos poseen una gran cantidad de materia orgánica, que es 100 veces superior al que contienen los efluentes municipales, además de compuestos de carácter fertilizantes (como nitrógeno orgánico, amoníaco, nitratos, fósforo y potasio), metales, ácidos grasos, bifenilos policlorados (PBC por sus siglas en inglés), microorganismos patógenos, fenoles e indoles generados por efecto de la degradación bacteriana de proteínas en el intestino del cerdo así como cualquier otro producto implicado en la gestión de una granja, como medicamentos y plaguicidas (Alemana *et al.*, 2001). Los generadores de dichos residuos los consideran paralelos a sus actividades y no como una posible fuente de ingresos.

Por ello la realización del presente proyecto beneficia sin duda alguna a los generadores de residuos orgánicos (municipios y sectores porcícolas como casos particulares), brindándoles una alternativa del tratamiento de estos residuos utilizando el proceso de la digestión anaerobia de un biorreactor como una generación de fuente alterna de energía (Biogás).

Por otra parte, el aprovechamiento de los biosólidos producidos en el proceso de digestión anaerobia como sustrato para el crecimiento de biomasa microalga, resulta una alternativa atractiva como suplemento de requerimientos nutritivos y fuente de proteína en alimentos para ganado y aves, además de su posible aprovechamiento en la generación de fuentes alternas de energía (biodiesel) o posible uso como pigmentos.

VI.HIPOTESIS

Es posible inducir un aumento de la Biomasa microalgar *chlorella vulgaris* mediante la aplicación de nutrientes de origen orgánico (Biosólidos producidos vía co-digestión anaerobia de heces porcinos y desechos Orgánicos municipales)

VII. METODOLOGIA

El siguiente apartado describe las etapas metodologicas para cumplir con los objetivos y metas planteadas para el presente proyecto de investigación (Figura 2)

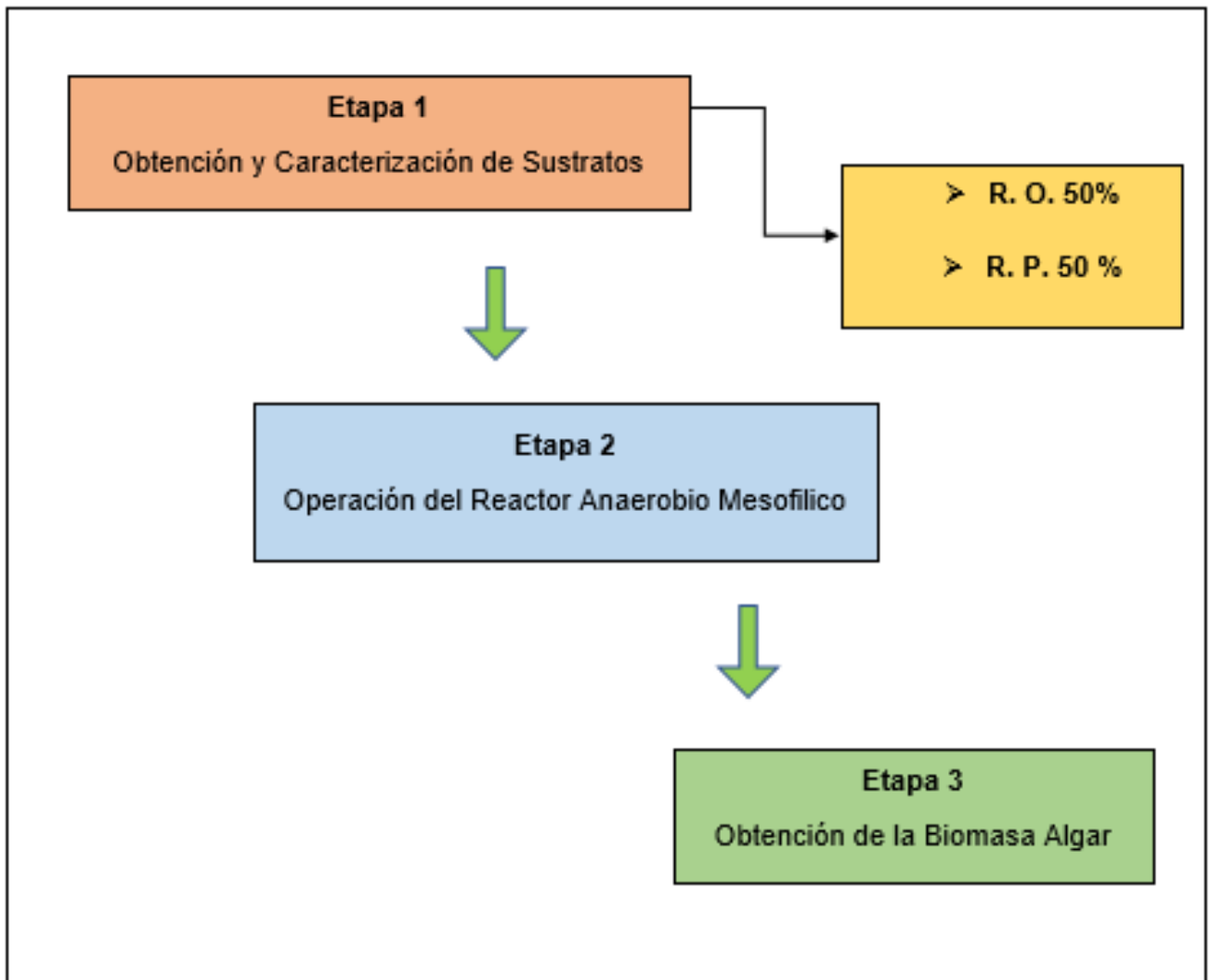


Figura 2 Metodología Experimental.

7.1. Etapa 1 Obtención y caracterización del sustrato.

Los residuos orgánicos fueron recolectados en centros de distribución de verduras y legumbres locales, así como en algunos domicilios aledaños a la institución en el cuadro 2 se muestran los residuos utilizados para la elaboración de la mezcla.

Cuadro 2 Residuos Orgánicos utilizados Para la operación del reactor

Residuos Orgánicos	Peso
Lechuga	1 kg
Plátano	0.7 Kg
Papa	0.3 Kg
Jitomate	1.4 kg
Rábano	0.1 Kg
Sandía	0.5 Kg

Los residuos porcícolas fueron obtenidos de familias lugareñas que tienen crianza de cerdos tras patio.

Posterior al acondicionamiento de los residuos, se realizó una mezcla de ellos con proporción 50% residuo porcícola y 50% residuo orgánico volumen / volumen para la alimentación del reactor como se muestra en el cuadro 3.

Cuadro 3 Condiciones de operación de los R.O. y R.P

Sustrato	% v/v
R.O.	50 %
R.P.	50%

7.2. Etapa 2 Operación del Reactor Anaerobio mesofílico

Para la operación de esta etapa los residuos orgánicos (R.O.) y los residuos porcícolas (R.P.) recolectados en el municipio de Huatusco fue añadido un lodo proveniente de una PTAR situada en la ciudad de Ixtaczoquitlán, Ver. La cual fue utilizada para acelerar el proceso de arranque del reactor.

El volumen del reactor anaerobio fue de 5 litros con un volumen útil de 4 L, el cual, operó en modo batch hasta que se alcanzó el de remoción del 38% de SV para el cumplimiento de los requisitos de reducción de atracción de vectores indicados por los EE.UU. EPA.

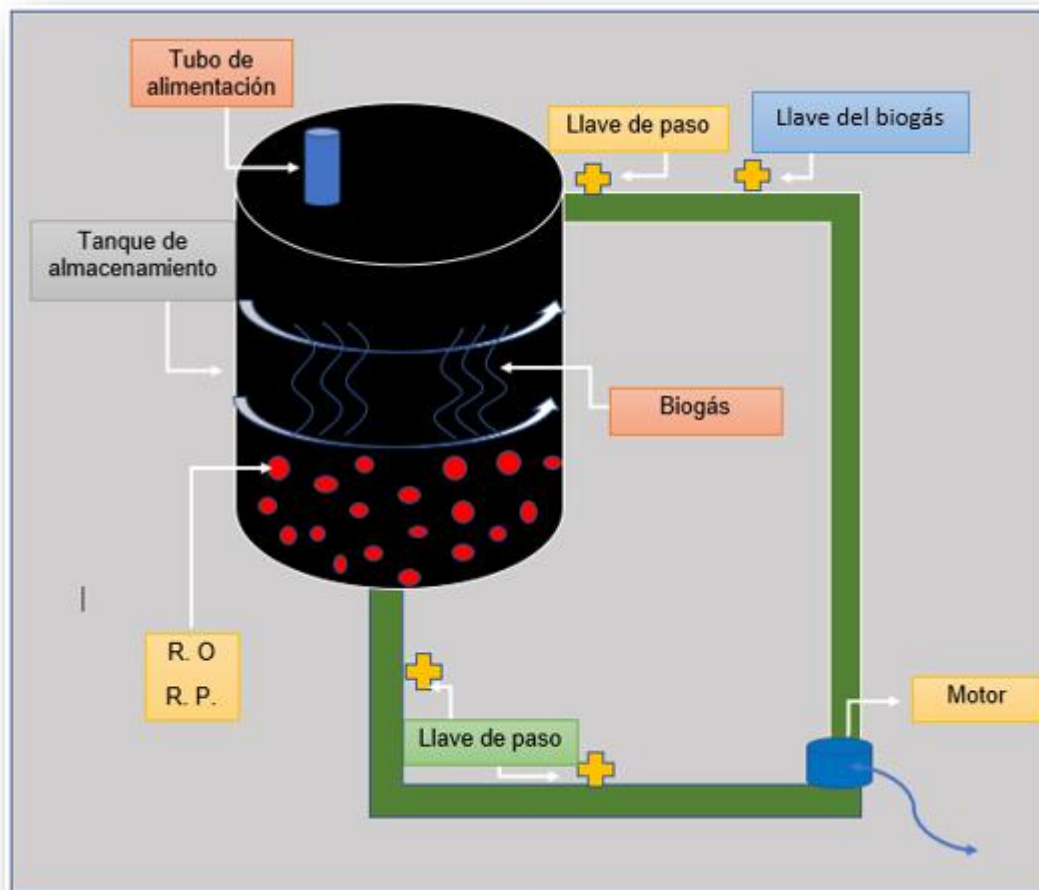


Figura 3 Reactor anaerobio

Una vez alcanzado el criterio de remoción de 38% de SV y para asegurar la calidad de los Biosólidos producidos, se procedió a alimentar el reactor en forma semi-continua, los primeros 15 días de operación se alimentó el reactor con la mezcla de residuos con una carga orgánica de 1 Kg SV/m^3 y se realizó un aumento de carga orgánica de $(0.5 \text{ kg SV/m}^3 \cdot \text{d})$ cada 15 días hasta alcanzar una carga orgánica de $2.5 \text{ kg SV/m}^3 \cdot \text{d}$.

Las variables de operación monitoreadas fueron: % de remoción de SV, producción de biogás, rendimientos de biogás y de metano, porcentaje de metano, pH, AGV's y alcalinidad.

7.3. Etapa 3 Obtencion de la biomasa microalgar.

En la figura 4 se muestran la microalga *Chlorella vulgaris* que se obtuvo del Laboratorio de Algas Continentales, Ecología y Taxonomía de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, la cual fue aislada un estante del laboratorio de microbiología de las instalaciones del Instituto Tecnológico Superior de Huatusco, estas fueron acondicionadas con todos los factores que son de vital importancia como por ejemplo Luz como fuente de energía, aireación para evitar que las partículas se sedimenten o peguen a las paredes del frasco obteniendo así una buena distribución de luz y la alimentación con el medio Bristol el cual transporta nutrientes inorgánicos que necesitan las microalgas para su crecimiento, y así poder obtener más biomasa alga.



Figura 4 Microalga obtenida de la UNAM

Se inició con la selección de las condiciones de crecimiento, para la reproducción y adaptación de la microalga con base en fuentes bibliográficas y como se describe en los apartados siguientes.

7.3.1. Condiciones para el crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris*

Para cumplir el objetivo de obtener volumen suficiente de microalga es necesario seleccionar las condiciones de crecimiento adecuadas. Con base en la literatura de

la microalga *chlorella vulgaris* no se ve significativamente influenciada a temperaturas de 25°C y 35°C; el crecimiento se llevó a cabo a una temperatura constante de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ y luz continua suministrada por lamparas flourecentes daylight 40 w. el medio esteril utilizado fue Bristol sugerido por (Gomez., 1997) utilizando nitrato de sodio (NaNO_3) como fuente de nitrogeno. En esta fase el cultivo se mantuvo en reactores de vídrio en cuyos extremo superior se adaptó un suministro de aire continuo por burbujeo (tubodifusor) con el fin de proveer aire a los cultivos y garantizar que todas las celulas esten expuestas a la luz y a los nutrientes del medio. El volúmen de operación fué de 200 mL como se puede apreciar en la figura 5.



Figura 5 Condiciones del crecimiento del cultivo

7.3.2. Medio de cultivo

El medio Bristol fue empleado para el crecimiento y propagación de la microalga, que se detalla a continuación en el cuadro 4.

Cuadro 4 Composición Química del Medio Bristol (Lara-Isass, 1998) Rev. Soco Mex. Hisl.

Compuesto	Bristol g/L	Elementos traza	mg /L
NaNO₃	0.25	CaCL ₂ . H ₂ O	26.5
MgSO₄. 7H₂O	0.075	FeCL ₃ . 6H ₂ O	5.0
K₂ HPO₄	0.075	MnCL ₂ . 4H ₂ O	0.3
KH₂. PO₄	0.175	CoCL ₂ .6H ₂ O	0.02
E. traza	10 mL/L	SuSO ₄	0.01
		ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.04
		EDTA	6.90

7.3.3. Esterilización del material.

Para garantizar un buen crecimiento de la microalga es importante contar con un ambiente estéril, por ello, es necesario la eliminación de cualquier agente contaminante o microorganismo indeseable en todos los materiales involucrados en el proceso, especialmente los que entran en contacto directo con la microalga *chlorella vulgaris*. Se esterilizaron los materiales junto con el medio de cultivo por medio de una autoclave de laboratorio Modelo SM 360-A a una temperatura de 120°C. para la previa esterilización como se muestra en la figura 6.



Figura 6 Autoclave modelo SM360-A

7.3.4. Cultivo y propagación de la microalga

Para el conteo y control del crecimiento se realizó la inoculación de la microalga en tres recipientes a los que se adicionó 50mL de medio de cultivo y 333.33 mL de microalga alimentando cada 7 días con medio adicionando 50 mL de medio a cada uno de los recipientes asta alcanzar un volumen de 420 mL ya que según la literatura la microalga tarda aproximadamente dos semanas en alcanzar su fase estacionaria una vez obtenido el volumen se realizó una separación en otros tres recipientes más previamente estériles obteniendo una réplica del recipiente 1, 2 y 3 como se muestra en la Figura 7.



Figura 7 Cultivo inicial y escalamiento del cultivo inicial

7.3.5. Cultivo de *Chlorella vulgaris* en medio bristol y biosólido

Posteriormente Se cultivó *chorella vulgaris* en tres condiciones diferentes como se muestra en la figura 8

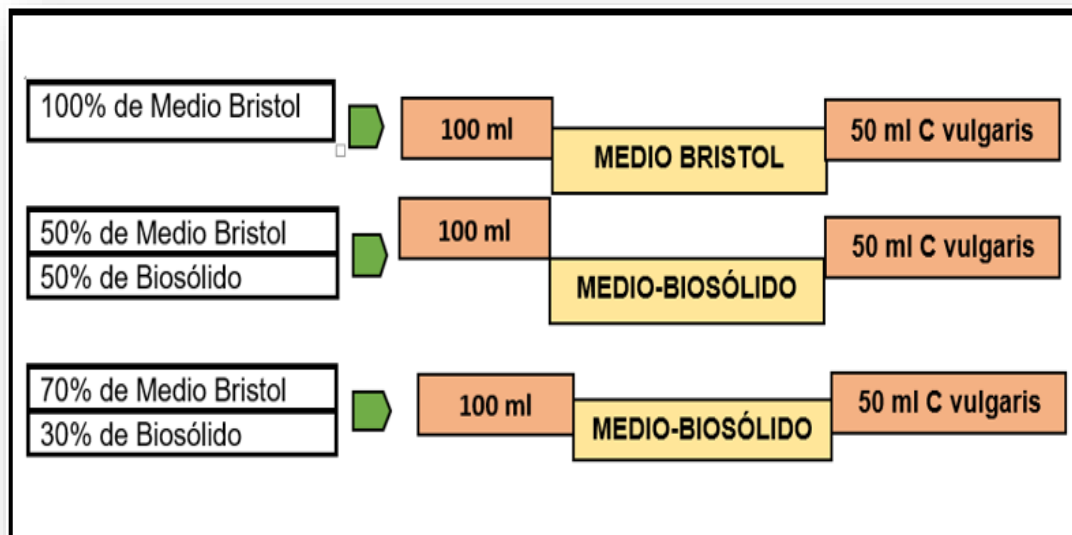


Figura 8 Alimentación inicial con el biosólido durante 24 horas

Posteriormente se procedió a esterilizar todo el material y acondicionadas con aireación y luz dentro de la campana durante 24 horas para mantenerlas en un área completamente estéril como se puede observar en la figura 9. Para poder realizar cada una de las cinéticas.



Figura 9 Tratamiento al 100%, 50-50 % y 70-30%

7.3.6. Medición de la absorción en el espectrofotómetro.

Con ayuda de una pipeta se tomaban pequeñas muestras del matraz Erlenmeyer que se encontraban en la campana para evitar su contaminación teniéndolas bajo condiciones de luz y aireación como se muestra en la figura 10.



Figura 10 Microalga bajo condiciones de luz y aireación en la campana para la medición de la absorbancia

Posteriormente se tomaban una pequeña muestra de 3 ml que se colocaban en unas celdas de cuarzo para poder medir la absorbancia este método se realizó por duplicado para cada una de las muestras, como se puede observar en la Figura 11.

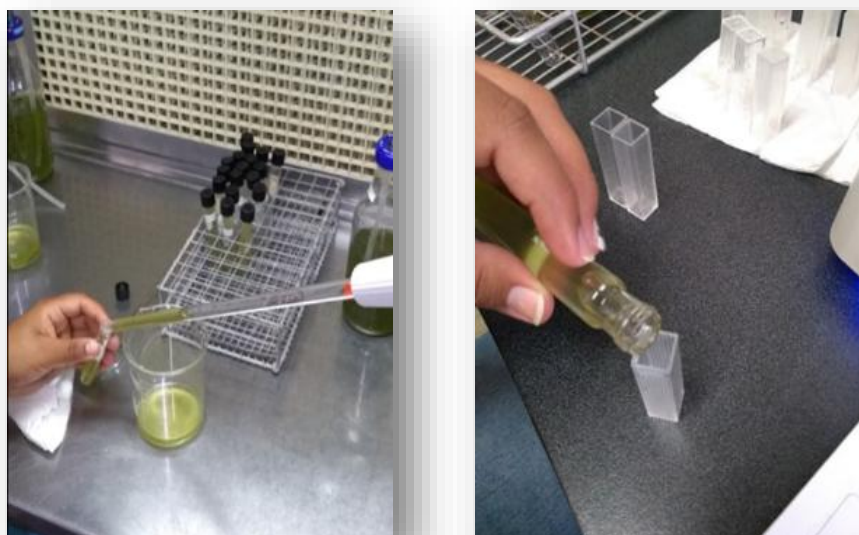


Figura 11 Pipeteo de la muestra y réplica de la microalga

La absorbancia se realizó en el espectrofotómetro como se muestra en la figura 12 marca Thermo scientific con una longitud de onda de 647 Nm, colocándose las 2 celdas de cuarzo que contenían la muestra y replica de cada uno de los tratamientos para poder realizar la cinética de 24 horas de absorbancia.



Figura 12 Espectrofotómetro

7.3.7. Lectura espectrofotométrica

Posteriormente se tomaron lecturas con el espectrofotómetro durante los diferentes tiempos, mencionados anteriormente. 1 hora, 12 horas y 24 horas. Obteniendo la absorbancia que es un concepto más relacionado con la muestra puesto que nos indica la cantidad de luz absorbida por la misma, la absorbancia de la solución es directamente proporcional a su concentración - a mayor número de moléculas mayor interacción de la luz con ellas; también depende de la distancia que recorre la luz por la solución – a igual concentración, cuanto mayor distancia recorra la luz por la muestra más moléculas se encontrara (Dias, 2014). El crecimiento celular no mostró diferencias significativas a la hora y a las 12 horas (ver Figura 22 y 23). Los tratamientos tuvieron diferencias estadísticamente significativas únicamente durante en el periodo de medición del crecimiento a 24 horas.

7.3.8. Centrifugación del biosólido

Para la realización de las cinéticas y poder llevar acabo cada uno de los tratamientos propuesto para la utilizacion del biosolido se llevó a cabo la separación de la fase acuosa del biosolido tratado en el reactor anaerobio con una centrifuga marca eppendorf que se muestra en la Figura 13 la cual se programó con un tiempo de 5 minutos a 5000 rpm obteniendo una separacion de las particulas pesadas del liquido el cual fue utilizado para el ratamiento donde se observo si la microlga se adapto a este tratamiento que se menciona a contiucion en la etapa 3.



Figura 13 Centrifuga eppendorf Utilizada para la Centrifugación del Biosólido.

7.3.9. Conteo celular en la cámara de neubauer

Para este proceso se realizó un conteo celular de cada uno de nuestros tratamientos durante un tiempo de 24 horas tomando una ´pequeña muestra y replica de cada frasco como se muestra en el cuadro 5 Para llevar un control del crecimiento en la concentración celular haciendo una comparación con los resultados obtenidos en el espectrofotómetro y así poder ver cuál de los tres tratamientos es el más adecuado para el crecimiento celular, por este motivo se procedió a realizar la cinéticas de 24 horas a cada uno de los tratamientos.

Cuadro 5 Cinética de 24 horas con la cámara de Neubauer

Tratamiento	Tiempo	Tratamiento	tiempo	tratamiento	tiempo
100%	4 hrs	50%	4 hrs	70%	4 hrs
	8 hrs		8 hrs		8 hrs
	12 hrs		12 hrs		12 hrs
	24 hrs		24 hrs		24 hrs

realizándose el conteo celular con la ayuda de la cámara de Neubauer realizándose el conteo con el apoyo de un microscopio binocular marca BioBlue S/N- EU 1910302 y con aumento de SP 10/0.25 - 160/0.17 el microscopio fue conectado por medio de un cable USB a una computadora Lenovo con la cual se obtuvo lograr percibir una mejor visualización de la microalga y así mismo realizar un mejor conteo celular como se muestra en la figura 14,



Figura 14 microscopio binocular marca BioBlue S/N- EU 1910302

7.3.10. Cámara de Neubauer

La cámara de Neubauer o hemocitometro es un instrumento utilizado en medicina y biología para realizar el recuento de esporas y células en un medio líquido, que puede ser, un cultivo celular, sangre, orina etc.

En la figura 15 se puede observar como es la cámara de Neubauer utilizada para el conteo celular el cual es una gruesa placa de cristal con forma de porta objetos, de unos 30 por 70 mm y unos 4 mm de grosor en una cámara simple.



Figura 15 Cámara de Neubauer (Marienfeld, s.f.).

La porción central, que es donde se realizó el conteo celular está dividido en tres partes, la retícula completa mide 3 mm x 3 mm de lado. Sub-dividida a su vez en 9 cuadros de 1mm de lado cada uno. El cuadro central es el destinado al recuento de hematíes y plaquetas. Se divide en 25 cuadros medianos de 0.2 mm y cada uno de esos cuadros se subdividen a su vez en 16 cuadros que fue utilizada para el conteo celular con una técnica donde solo se contaron 5 cuadros de la cuadrícula en los cuales el lado izquierdo y el superior si serán contados si hay alguna célula microalga en ella mientras que el lado derecho y inferior no se contó ninguna célula microalga como se puede observar en la figura 16.

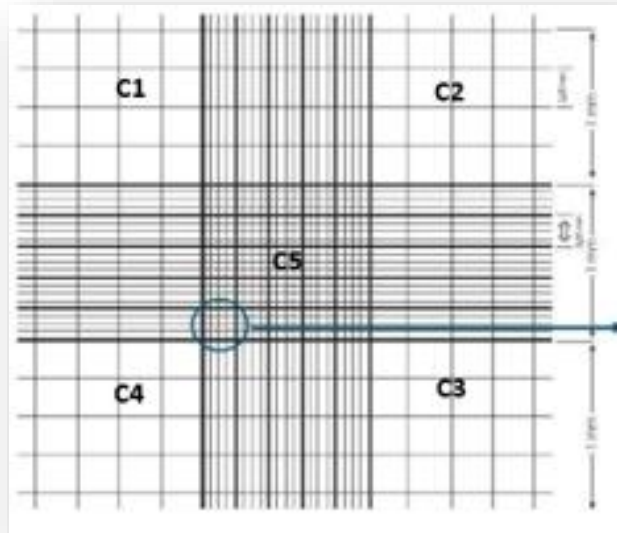


Figura 16 cuadrícula de la cámara de Neubauer (quercuslab.es)

El conteo se realizará en forma de meandro empezando por los lados superiores e izquierdos como se muestra en la Figura 17.

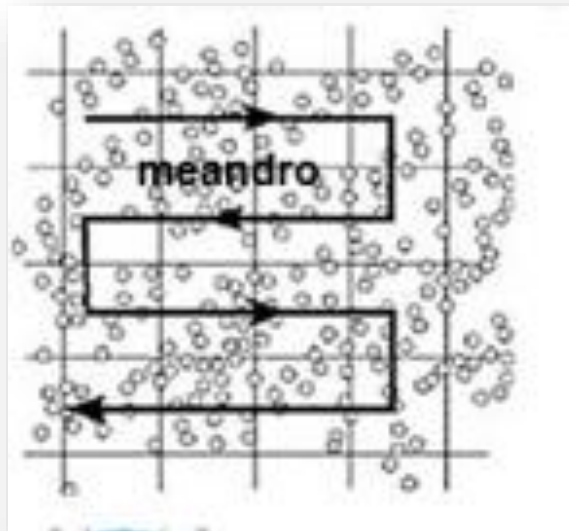


Figura 17 Conteo celular en forma de meandro (quercuslab.es).

7.3.11. Cálculo de concentración

Para determinar la concentración celular por medio de la cámara de Neubauer se utilizó la fórmula 3 por el motivo de que nuestra muestra no fue diluida.

Formula 3 Cálculo para el recuento celular en la cámara de Neubauer

$$\text{concentracion} = \frac{N^{\circ} \text{ de Celulas} \times 10000}{N^{\circ} \text{ de cuadros}}$$

Pero en caso de que hallamos aplicado alguna dilución deberemos transformar la concentración obtenida durante el recuento celular en la concentración de la muestra original en este caso tendremos que dividir el resultado por la dilución aplicada como se muestra en la fórmula 4.

Formula 4 Cálculo para el recuento celular en la cámara de Neubauer al aplicar alguna dilución.

$$\text{Concentración} = \frac{N^{\circ} \text{ de celulas} \times 10000}{N^{\circ} \text{ de cuadros} \times \text{dilución}}$$

Ejemplo:

Por una dilución de **1:10** Dilución = 0.1

Para una dilución de **1:100** Dilución = 0.01

7.3.12. Diseño de bloques

Cuando se requieren comparar ciertos tratamientos o estudiar el efecto, es deseable que las posibles diferencias se deban principalmente al factor de interés y no a otros factores que no se consideran en el estudio. Cuando esto no ocurre y existen otros factores que no se controlaran o nulifican para hacer la comparación, las conclusiones podrían ser afectadas sensiblemente.

Para corroborar que las diferencias observadas fueran estadísticamente significativas se realizó un análisis de varianza para un diseño en bloques completos al azar que trata de comparar tres fuentes de variabilidad: el factor de tratamientos, el factor de bloques y el error aleatorio (Piqueras, 2008). se refiere a que en cada bloque se prueban todos los tratamientos. La aleatorización se hace dentro de cada bloque. (Piqueras, 2008).

Para poder llegar a estos resultados se tomaron lecturas con muestra y replica de cada uno de los frascos teniendo un total de 48 muestras por cada tratamiento obtenidas durante 24 horas de la cinética.

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

8.1. Etapa 1 Obtención y caracterización de residuos

Las características físico-químicas presentes en la mezcla de residuos orgánicos se presentan en el cuadro 6. Los residuos fueron acondicionados previamente para su proceso de estabilización, muestra una concentración de sólidos totales de 2.5-3.0%, ideales para el proceso de digestión anaerobia. La mezcla de residuos presentó un valor de 87.3 % de sólidos totales volátiles siendo por tanto ricos en materia orgánica. Esto se debe principalmente a su origen. El pH en la mezcla fue de 6.27 los cuales son considerados como adecuados en el proceso de digestión anaerobia (Malina, 1992). Se observó que la mezcla de residuos es rica en compuestos nitrogenados al obtener un alto contenido de nitrógeno total (4.62 g/Kg SV).

Cuadro 6 Caracterización físico-química de la mezcla de residuos.

Físicos	Valor	Unidad
Ph	6.27±0.3	
Solidos Totales	2.87±0.5	% m/m
Solidos volátiles	87.3±0.63	% m/m
Químicos		Unidad
Nitrógeno total	4.62±4	g/kg ST
Fósforo	0.56±.02	g/kg ST
Carbohidratos	8.8±0.98	g/kg ST
Lípidos	8.3±1.2	g/kg ST
Proteínas	15±2.3	g/kg ST

La cantidad contenida de fósforo en la muestra fue de 0.56 g/Kg SV, en cuanto a la concentración de carbohidratos y proteína se presentó un valor promedio de 8.8 y 15 g/Kg ST respectivamente. Por otra parte, el valor promedio de lípidos fue de 8.3 g /Kg ST.

8.2. Etapa 2 Operación del reactor anaerobio mesofílico

En la Figura 18 se muestra la operación del reactor anaerobio operado durante 90 días y alimentado con carga orgánica de 1 kg. SV/m³.d de la mezcla de residuos orgánicos municipales y residuos porcinos durante los primeros 15 días de la operación del reactor se muestra un promedio de 46% de remoción de materia orgánica, conforme se empezó a aumentar la carga orgánica (1.5 kg.SV/m³.d) aumentó la eficiencia de la remoción de SV en un 0.5% (46.5% remoción promedio) y al aplicar una carga de materia orgánica de 2 Kg.SV/m³.d disminuyó el porcentaje de remoción a un 46.2% así mismo en los últimos días de la alimentación del reactor se aumentó la carga orgánica a (2.5 Kg.SV/ m³.d) en el cual se observó un decremento en la eficiencia de la remoción promedio (45%). El porcentaje de eficiencia de remoción de solidos volátiles (SV) se ve disminuido conforme se incrementó la carga orgánica, hecho que puede ser atribuido al incremento de materia orgánica alimentado al reactor anaerobio. De igual manera se aprecia que no se incumplió con el límite mínimo permitido para la (NOM-004-SEMARNAT-2002). El TRH fue de 8 días.

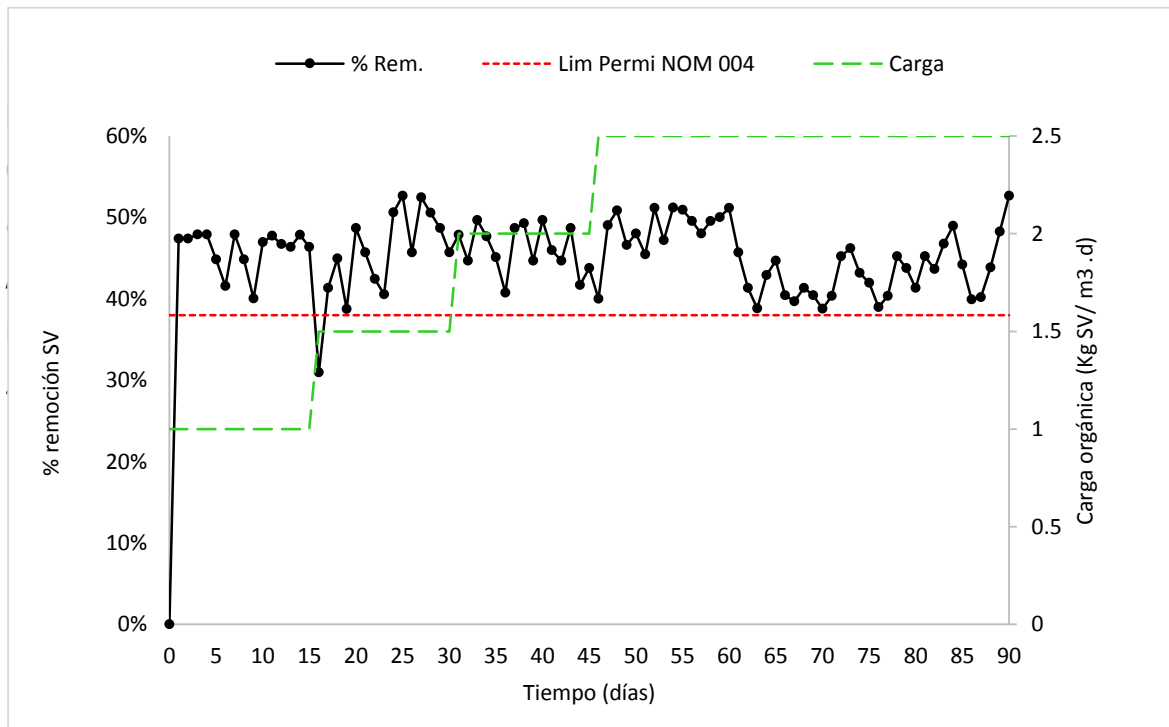


Figura 18 Remoción de SV operación nivel piloto

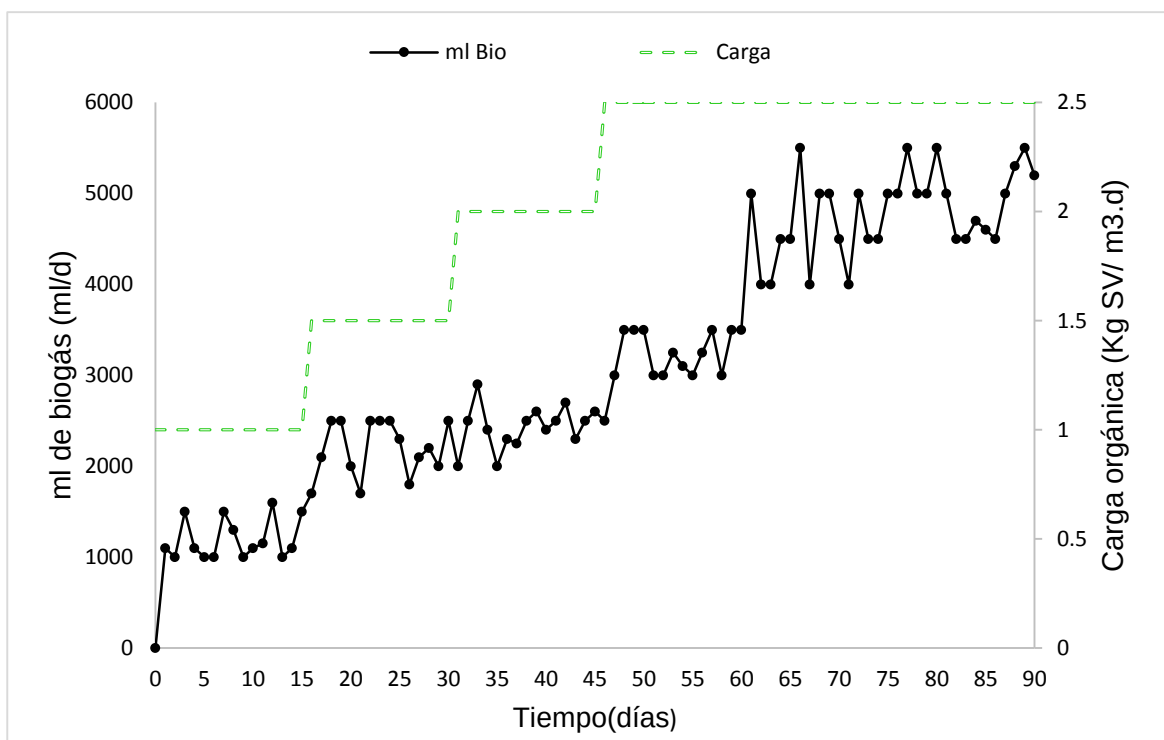


Figura 19 Producción de biogás nivel piloto

En la figura 20 se muestra el rendimiento de biogás promedio al operar el reactor anaerobio con carga de 1 Kg.SV/m³.d muestra una producción de 1.00 L bio/g SV_{rem} y de metano de 0.90 L CH₄/g SV_{rem} en los primeros 15 días, al operar con carga orgánica de 1.5 kg SV/m³ del rendimientos de metano fue de 0.92 L CH₄/g SV_{rem} y de biogás fue de 1.02 L.bio/g.SV_{rem} después al aumentar la carga orgánica de 2 kg.SV/m³.d los rendimientos de biogás y de metano fueron de 0.92 L CH₄/g SV_{rem} y 1.03 L bio/g SV_{rem} respectivamente los valores obtenidos en la carga orgánica de 2.5 Kg SV/m³ d sus rendimiento de biogás y de metano es de 1.03 L CH₄/g SV_{rem} y 1.15 L bio/g SV_{rem}. Estos valores son similares a los obtenidos en estudios previos donde se obtuvieron rendimientos de metano entre 0.8 y 1.1 L CH₄ /g SV_{rem} a partir de lodos municipales (Jolis, 2008).

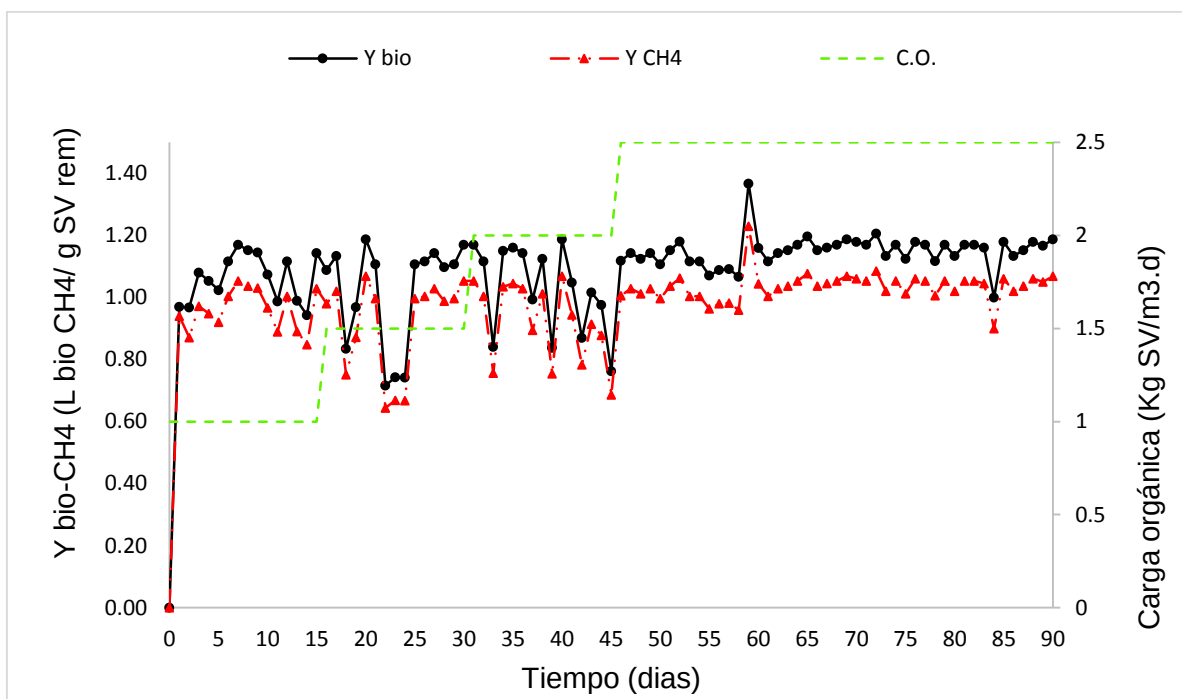


Figura 20 Rendimiento de biogás y de metano operación nivel piloto

(Krishna *et al.*, 2000). realizaron un estudio en el cuál sometieron a DAT lodos activados y primarios pre-tratados mediante digestión anaerobia mesofílica durante 15 días de exposición y obtuvieron rendimientos de metano de entre 0.56 - 0.76 $LCH_4 / g SV_{rem}$, estos rendimientos se atribuyen a la naturaleza de los mismos, en el caso de los lodos activados, son lodos con deficiencias en nutrientes y en el caso de los lodos primarios ya no poseen todos los nutrientes necesarios puesto que ya han sido digeridos previamente

En la figura 21 se muestra la carga orgánica y el pH durante 15 días alimentado el reactor con una carga de $1kg SV/m^3 d$ obteniendo un pH de 7.27 al aumentar la carga orgánica a $1.5 Kg SV/m^3 d$ se obtuvo una producción de pH de 7.62 posteriormente se aumentó la carga a $2 Kg SV/m^3$ el pH obteniendo fue de 7.60 respectivamente el reactor se volvió alimentar con una carga orgánica de $2.5 kg SV/m^3 d$ el pH obtenido fue de 7.50 en los últimos 90 días.

Con el pH neutro se obtuvo la mayor producción de metano y aunque el aumento del pH a valores cercanos a la neutralidad (6.6 y 8,0 unidades) fue más favorable que los valores ácidos (5,5 y 6,0 unidades), lo que coincide con el estudio de

Veeken, *et al.*, 2000. quienes encontraron que, con pH entre 6.5 y 7.7 unidades, se lograron las mejores producciones de metano. Este comportamiento está asociado a las características tanto del inóculo como del sustrato, lo que enfatiza la importancia de definir para cada caso específico, la condición operacional más favorable (Dinamarca, *et al.*, 2003).

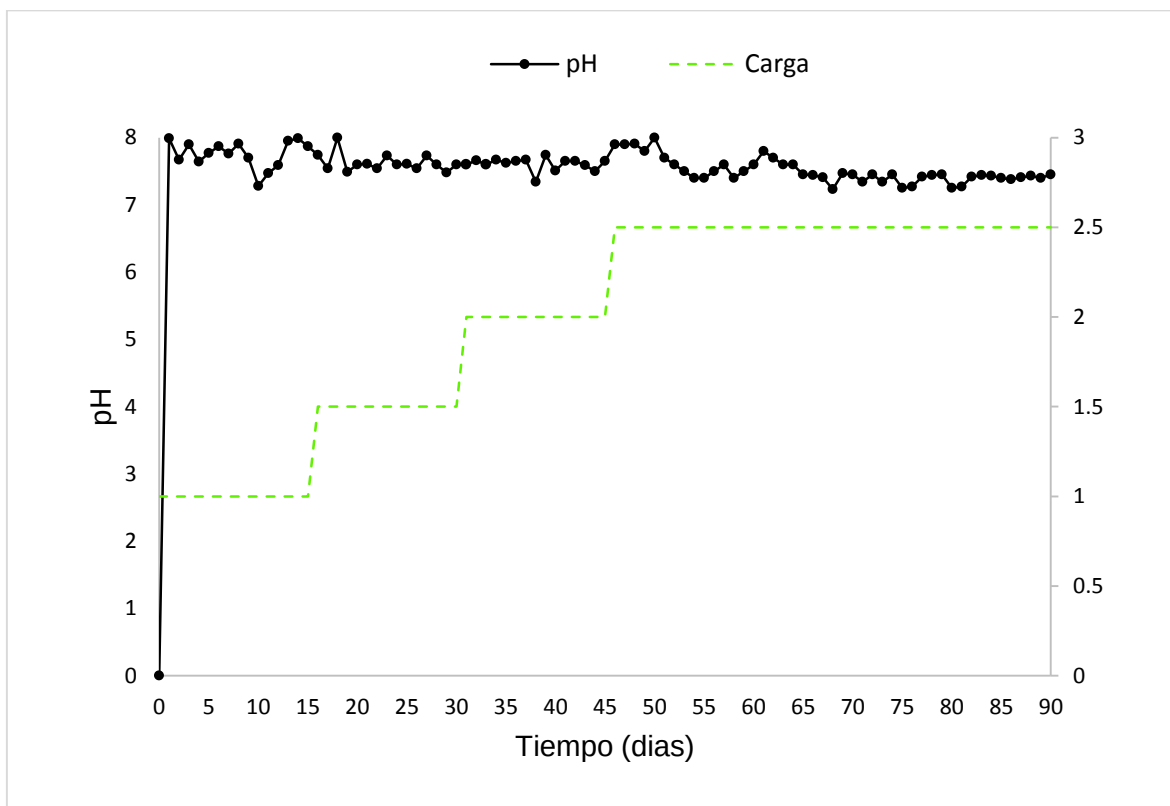


Figura 21 Rendimiento del pH operación a nivel piloto

En el cuadro 7 se muestran un resumen de los parámetros monitoreados durante el proceso de digestión anaerobia a nivel piloto.

Cuadro 7 Resumen de parámetros operación nivel piloto

Tiempo	C.O. Kg SV/m ³ d	% rem	ml bio	Y bio	Y CH ₄	%CH ₄	pH	AGV's	Alca
0 – 15	1	46.0%	1121.8	1.00	0.90	76.5%	7.2725	1987.11	0.29
16 – 30	1.5	46.5%	2193.3	1.02	0.92	77.8%	7.62	2342	0.34
31 – 45	2	46.2%	2430	1.03	0.92	78.5%	7.60	2422	0.34
46 – 90	2.5	45.0%	4264.4	1.15	1.03	88.0%	7.50	2577	0.33

López-Escobar, *et al.*, 2014 demostraron que un proceso de digestión anaerobia operado con un sustrato similar (lodos residuales fisicoquímicos de un rastro de aves) presentó inhibición metanogénica cuando la carga orgánica aplicada fue superior a 5 kg SV/ m³. d en el presente estudio no se evaluaron cargas mayores a 2.5 kg SV/ m³. d debido a que el efecto demostrado que entre mayor carga orgánica hay un aumento de metano.

8.3. Etapa 3 Obtención de biomasa microalgar.

En la Figura 22 se muestran los resultados de crecimiento de la microalga a 24 horas. En la curva de crecimiento de 70-30% Bristol-Biosólido se puede apreciar que tiene 0.28 de absorbancia inicial. Posteriormente durante la hora 15 hubo un crecimiento celular llegando alcanzar valores de 0.46 de absorbancia, finalmente la densidad celular máxima se alcanza a las 24 horas del tratamiento siendo el momento en el que se obtienen valores mayores de 0.91 de absorbancia.

Para el tratamiento al 50:50% Bristol-Biosólido la densidad celular inicial es de 0.28 de absorbancia siendo muy similar a la obtenida en la primera hora del tratamiento al 70-30% Bristol-Biosólido, posteriormente se comienza a observar que durante la

hora 14 de la cinética hay un incremento en el crecimiento celular alcanzando valores de 0.38 de absorbancia y posteriormente en la hora 24 se alcanzan valores en el crecimiento celular de 0.67 de absorbancia máxima al final de la cinética de crecimiento.

El tratamiento al 100% Bristol fue el que reporto un menor rendimiento en el crecimiento celular obteniendo 0.10 de absorbancia inicial en la primera hora, posteriormente comienza a haber un incremento celular en la hora 20 de 0.15 de absorbancia el cual este comienza a tener un descenso en el crecimiento celular de hasta 0.12 de absorbancia máxima final en la hora 24 del tratamiento. Por los resultados obtenidos en cada uno de los tratamientos se puede observar que existe un desarrollo diferencial de *Chlorella vulgaris* de acuerdo con los distintos medios de cultivo utilizados.

Se observó claramente que el cultivo 100% Bristol se mantiene sin crecimiento, con valores de absorbancia de alrededor de 0.1 durante las 24 horas, y completamente separado de las curvas de crecimiento en las que se utilizó combinaciones de medio de cultivo. Los valores de la absorbancia se usan para detectar el crecimiento de bacterias en cultivos en suspensión y para determinar la concentración de moléculas en la solución. (Tasauro, 2013). En contraste los cultivos con combinaciones 50-50% y 70-30% de Bristol-Biosólido, tienen un desempeño muy similar durante las primeras 15 horas, a partir de las 16 horas se observa una clara tendencia de crecimiento acelerado del cultivo 70-30% Bristol-Biosólido, alejándose completamente de la tendencia del cultivo 50-50% que, si bien es cierto que también se observa una tendencia de crecimiento, esta es de menor magnitud que la de 70-30% Bristol-Biosólido. De lo anterior concluimos que el mejor tiempo de cultivo fue el de 24 horas y el mejor medio de cultivo fue el 70-30% Bristol-Biosólido.

Los resultados del análisis de varianza como se muestra en anexos cuadro 9. demostraron que tanto el tiempo como el tipo de medio de cultivo tienen efecto sobre el crecimiento de *Chlorella vulgaris*. Se puede decir que la hipótesis dada se prueba con el análisis de varianza con dos criterios de clasificación, porque se controlan dos factores de varianza el factor de tratamiento y el factor de bloques ANOVA:

para un diseño de bloques completo al azar, (Brenda Peray, 2015). el tiempo como el tipo de medio de cultivo tienen efecto sobre el crecimiento de *Chlorella vulgaris* ($P=0.001$ en ambos casos). Además, existe una interacción significativa entre el tiempo y el tipo de medio de cultivo ($P= 0.001$). Cuando se tomaron los datos de conteo celular en la cámara de Neubauer, se obtuvieron resultados similares ($P<0.001$) para el tiempo como para el medio de cultivo, también se encontró que existe interacción entre las variables tiempo y tratamiento, (ver anexo cuadro 10). La interacción significa que no se pueden separar los efectos de tratamiento de la variable tiempo, debido a que el tamaño de efecto de una variable depende de la magnitud de la otra.

El análisis de varianza demuestra también que existen diferencias significativas entre las absorbancias medias de cada tratamiento, por lo que podemos decir que en cada tratamiento afecta de manera diferente el crecimiento de la microalga (ver anexos cuadro 11). Además, se observó que la absorbancia media a las 1,4,8 y 12 horas formaban un grupo con absorbancias similares y que a las 24 horas era estadísticamente diferente a las de las horas anteriores (ver anexo cuadro 13). Por otra parte, Víctor *et al.*, 2017. Cultivaron *Chlorella* en un medio de cultivo que contiene nutrientes como el nitrógeno y el carbon elementos que fueron utilizados para la realizacion de en este tratabo el cual permitió que su adaptación fuera más fácil. Mediante los días 13, 14 y 15 se presenta la fase estacionaria, alcanzando su máximo crecimiento durante el día 15. Finalmente el crecimiento disminuye apreciablemente entre los días 17 y 18, lo cual se conoce como la fase de muerte. por este motivo, se plantea que el cultivo artificial de especies algares requiera de la combinación de ciertos factores fisicoquímicos particulares tales como nutrientes y fotoperiodos específicos (Ramos et al., 1985.)

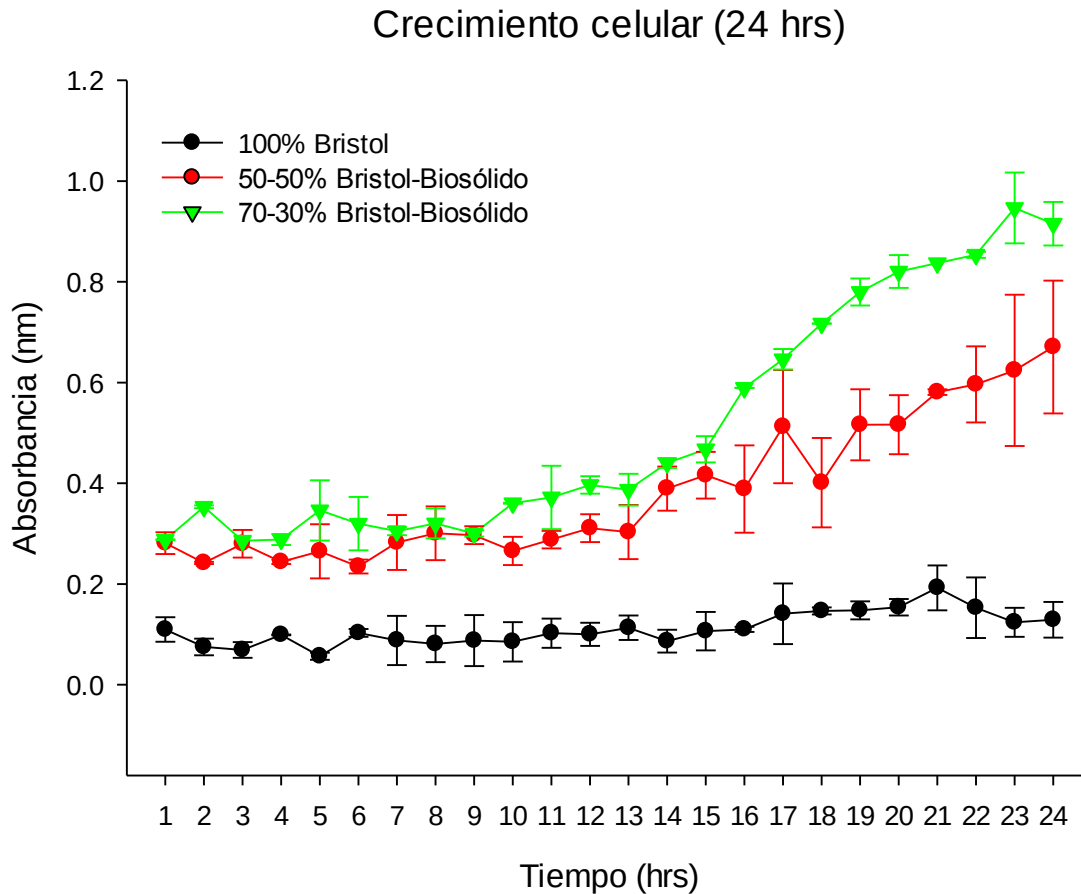


Figura 22 Crecimiento celular mediante absorbancias de *chlorella vulgaris*

8.3.1. Conteo celular *chlorella vulgaris* en la cámara de Neubauer

Los resultados del conteo celular por medio de la cámara de Neubauer se muestran en la figura 23. Se observa que el conteo de células cultivadas en medio 100% Bristol tiene un pico a las 4 hrs (5.5×10^5 cel/mL) que luego desciende a medida que pasa el tiempo hasta llegar a 3.7×10^5 cel / mL.

Se observa una tendencia opuesta en el caso de células cultivadas 50-50% Bristol-Biosólido, aquí el conteo tuvo una tendencia al alza que se hizo más pronunciada a las 12 horas con 3.5×10^5 cel / mL y que terminó a las 24 hrs con 4.5×10^5 cel / mL.

El conteo celular demostró de manera similar a la medición por absorbancias, que el cultivo más exitoso en cuanto a crecimiento celular fue el del medio 70-30% Bristol-Biosólido, ya que se muestra una tendencia al alza que a las 4 horas ya supera en promedio a los otros dos cultivos y que termina a las 24 horas con 8×10^5

cel / mL.con relación a nuestro trabajo (Manrique, 2014) reporto durante la etapa de experimentación, determinar la concentración óptima de medio de cultivo para la microalga. Los conteos realizados en diferentes concentraciones de medio de cultivo Hidropónico (50%, 25%, 15% y 5%) demostraron que la concentración óptima para el crecimiento de la microalgas fue al 15% obteniéndose una densidad poblacional de 2.74×10^5 cel/mL para *chlorella vulgaris* obteniendo la más alta tasa de crecimiento y por lo tanto el menor tiempo de duplicación. Por lo que el crecimiento celular obtenido en la figura 22 son más altas que las reportadas en el trabajo citado aun que las condiciones de temperatura, luz, Ph y aireacion para su crecimiento fueron similares.

Se realizó un análisis de varianza que demuestra que existen diferencias significativas entre las medias de conteo celular de cada tratamiento (ver anexos Cuadro 12), por lo tanto, podemos decir que tanto por el método de lectura de absorbancias (ver anexos Cuadro 11) y por el método de conteo, la composición o tipo de medio de cultivo afecta el crecimiento de la microalga. Además, el análisis mostró que por el método de conteo celular se tiene un número de células similar entre 1 y 4 horas, luego a las 12 horas teníamos un cambio significativo en el número de células y que a las 24 horas se producía otro cambio significativo en el conteo celular (ver anexo cuadro 14).

Conteo celular en la cámara de Neubauer

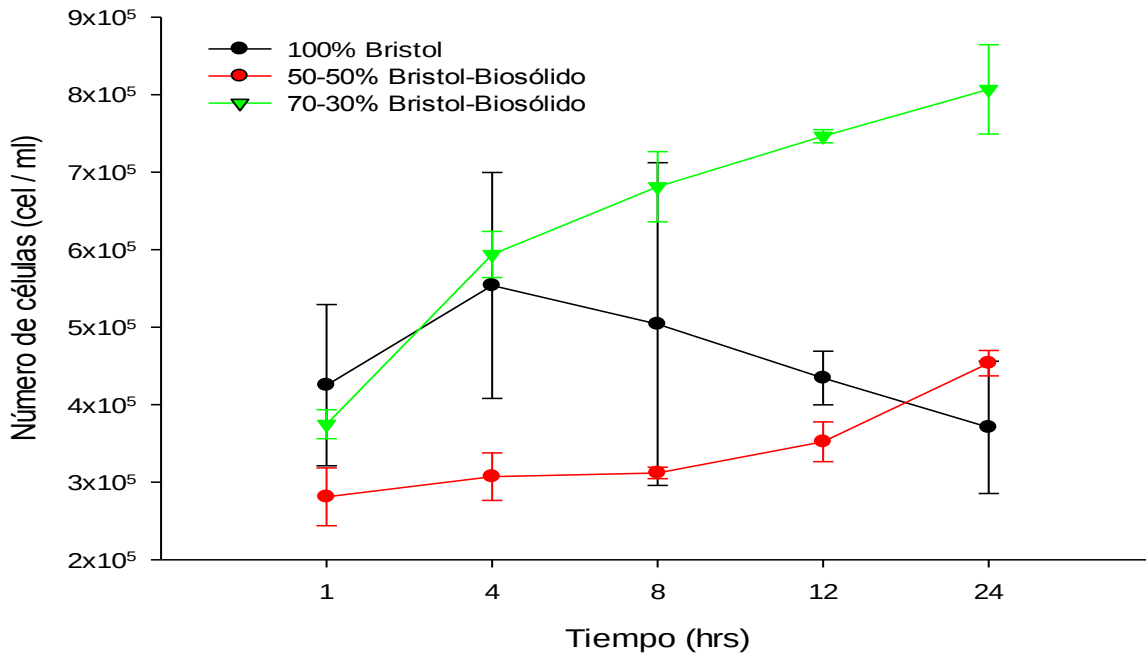


Figura 23 Crecimiento mediante conteo celular de *chlorella vulgaris*.

8.3.2. Comparación de absorbancia de *chlorella vulgaris* y conteo celular en la cámara de Neubauer

Se realizó un análisis para conocer la correlación entre datos de absorbancia en el espectrofotómetro y conteo celular en la cámara de Neubauer. Para los análisis de correlación se sacó el promedio de los conteos de cada horario de conteo.

Con la información anterior se realizó un análisis de correlación de Pearson, donde se encontró que había una correlación del 0.946 entre la absorbancia y conteo celular únicamente en el caso del cultivo con 50-50% Bristol-Biosólido ($p= 0.015$). Las otras correlaciones resultaron no significativas como se muestra en el Cuadro 8).

Cuadro 8 Coeficientes de correlación de pearson entre absorbancia vs conteo celular.

	Coeficiente de correlación	P
100% Bristol	0.594	0.291
50-50% Bristol-Biosólido	0.946	0.015
70-30% Bristol-Biosólido	0.648	0.237

Por otra parte, a veces ocurre que hay variables que están aparentemente asociadas o que son interdependientes, puede ocurrir que el incremento de una variable 'x' este acompañado de un aumento correspondiente de una variable 'Y', o una disminución de 'X' puede estar relacionada con una disminución de 'Y' (Rebolledo Robles, 2002). Para corroborar los resultados se realizó también una regresión lineal y se obtuvieron los valores de r^2 . En la Figura 24, se muestran los resultados para cada una de las condiciones de cultivo

Donde puede apreciarse que en este análisis se observan resultados similares a los del estudio de correlación de Pearson, la correlación más alta fue en el cultivo 50-50% Bristol-Biosólido ($r^2 = 0.89$), la cual representa ser la más conveniente para el crecimiento microalga por presentar mayores porcentajes y que también el Biosólido se presenta en una mayor cantidad por lo que habría una mayor disponibilidad de nutrientes para la alimentación y crecimiento celular de esta forma seguido de 70-30% Bristol-Biosólido con un coeficiente de correlación ($r^2 = 0.42$) representa ser un poco menos conveniente para el crecimiento por presentar un porcentaje menor el cual indica que al agregar una cantidad menor de Biosólido se tiene poca disponibilidad de nutrientes para la alimentación y reproducción de la microalga, Caldwell (1940) menciona que debido al aprovechamiento de los nutrientes inorgánicos" contenidos en el agua, (Biosólido) este favorece el crecimiento de las microalgas, por lo que la menos favorable correlación la obtuvimos con el cultivo 100% Bristol con una correlación $r^2 = 0.35$. presentando un porcentaje mucho menor al de los otros tratamientos utilizando el tratamiento solo al 100% por lo cual su crecimiento es un poco más lento que en las otras

correlaciones en donde se utilizó Biosólidos. (Nichlos, 1973) dice que el medio Bristol ha sido recomendado como medio de cultivo general.

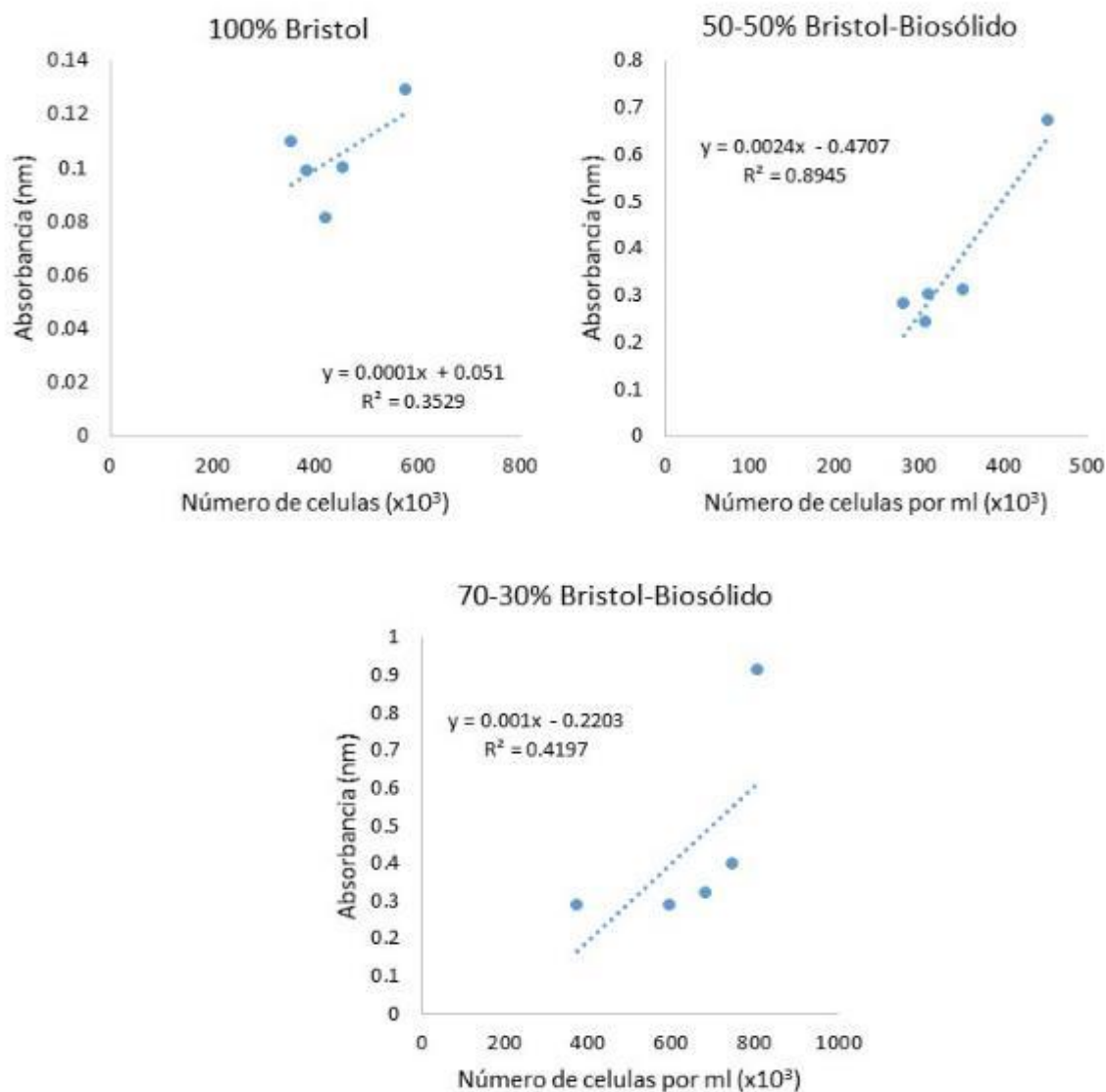


Figura 24 Resultados de análisis de correlación entre absorbancia y conteo celular mediante regresión lineal. En cada panel se muestra la ecuación de la recta resultante, así como el valor de R2

Coeficiente de correlacion lineal es una medida numerica que permite medir el grado de asociacion lineal entre dos variables cauntitativas por ejemplo en los diagramas de dispercion de la figura 25. se muestra que hay relacion lineal entre la variable X y la variable Y sin embargo se Puede obserbar que los puntos estan mas serca de

la linea en el diagrama B mientras que en el diagrama A los puntos estan mas dispersos por lo tanto la realcion lineal que hay en el diagrama A es mas debil que en el diagrama B

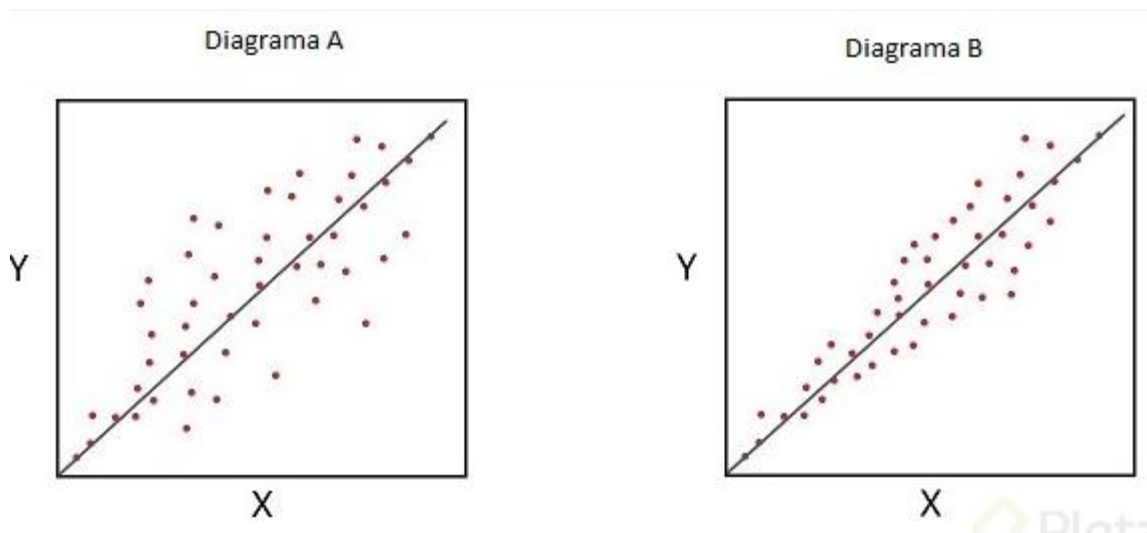


Figura 25 diagrama de dispersión.

Pero el diagrama de dispersion no nos da certesa de que tan fuerte o que tan debil es la relacion lineal entre dos variables, se necesita una medida que nos diga la fuerza de la asociacion lineal y la direccion que toma esa relacion lineal esta medida es el coeficiente de correlacion ρ mide la fuerza y el sentido de la relacion lineal entre dos variables cuantitativas que se define el coeficiente de correlacion de la siguiente manera

Formula 5 Coeficiente de correlación

$$\rho \frac{\delta xy}{\delta x \delta y}$$

El coeficiente de correlacion lineal puede tomar los valores como por ejemplo en la figura 26.

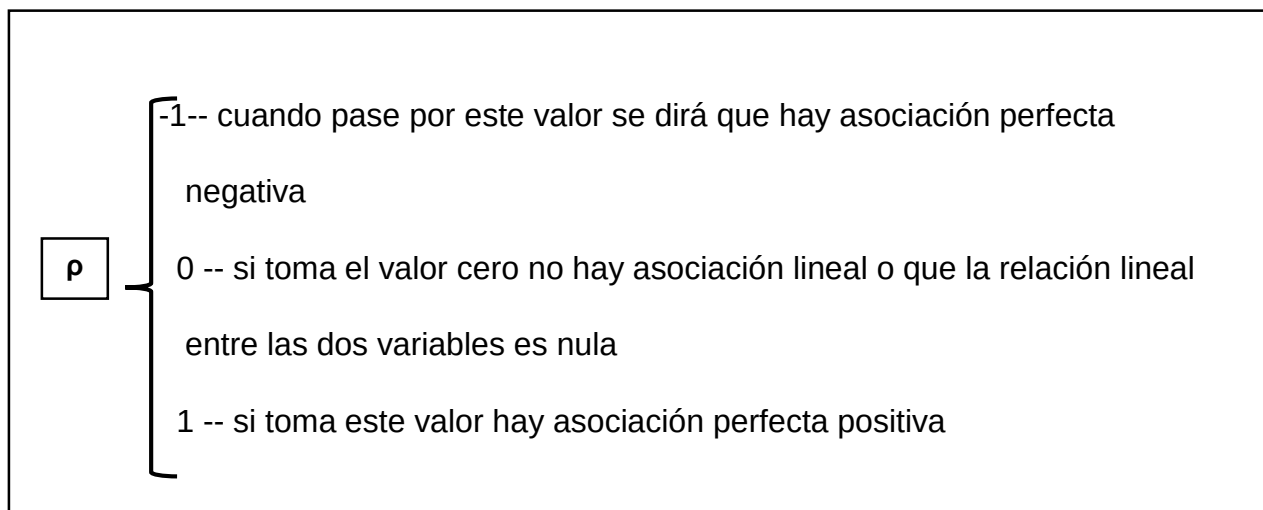


Figura 26 Coeficiente de correlación lineal.

En la figura 27. se puede observar que a medida que el valor absoluto del coeficiente de correlacion valla disminuyendo la relacion se va haciendo cada ves mas debil asta que llega a volverse nula o a la inversa a partir de cero a medida que va creciendo el valor absoluto del cieficiente de correlacion cada ves se va haciendo mas fuerte asta que toma el valor uno cuando la relacion es perfecta ya sea positiva o negativa entonses como hemos dicho el coeficiente de correlacion mide la fuerza que es el grado en el que estan asociando linealmente las dos variables como se puede ver el valor del coeficiente nos dice que tan fuerte es la relacion mientras mas sercano este a 1 la relacion es mas fuerte y mientras mas sercano este a cero la relacion es mas debil asta llegar a ser nula.

± 0.96 , ± 1.0	PERFECTA
± 0.85 , ± 0.95	FUERTE
± 0.70 , ± 0.84	SIGNIFICATIVA
± 0.50 , ± 0.69	MODERADA
± 0.20 , ± 0.49	DÉBIL
± 0.10 , ± 0.19	MUY DÉBIL
± 0.09 , ± 0.0	NULA

Figura 27 Valores del coeficiente de correlación

VIII. CONCLUSIONES

La caracterización físico-química presente en la mezcla de residuos orgánicos, acondicionadas previamente para su proceso de estabilización, muestra una concentración de sólidos totales de (2.5-3.0%), y de sólidos totales volátiles (87.3%) y un pH de (6.27) considerados como adecuados en el proceso de digestión anaerobia.

El reactor anaerobio operado durante 90 días tuvo un decremento en la eficiencia de la remoción promedio (45%). El porcentaje de eficiencia de remoción de sólidos volátiles (SV) se ve disminuido conforme se incrementó la carga orgánica, hecho que puede ser atribuido al incremento de materia orgánica alimentado al reactor anaerobio. De igual manera se aprecia que no se incumplió con el límite mínimo permitido para la (NOM-004-SEMARNAT-2002)

Para el crecimiento de la microalga *chlorella vulgaris* se demostró que a condiciones de temperatura constante de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y luz continua suministrada por lámparas fluorescentes daylight 40 w. El medio estéril utilizado fue Bristol, utilizando nitrato de sodio (NaNO_3) como fuente de nitrógeno. En esta fase el cultivo se encuentra en condiciones de aireación. Obteniendo la cantidad de microalga necesaria para el escalamiento y poder desarrollar el trabajo.

Con base en los resultados obtenidos, el cultivo 100% Bristol se mantiene sin crecimiento, con valores de absorbancia de alrededor de 0.1 durante las 24 horas. En contraste los cultivos con combinaciones 50-50% y 70-30% de Bristol-Biosólido, tienen un desempeño muy similar durante las primeras 15 horas, a partir de las 16 horas se observa una clara tendencia de crecimiento acelerado del cultivo 70-30% Bristol-Biosólido, alejándose completamente de la tendencia del cultivo 50-50% observándose una tendencia de crecimiento de menor magnitud que la de 70-30% Bristol-Biosólido. Por lo cual el mejor medio de cultivo fue el 70-30% Bristol-Biosólido.

Por medio de los resultados obtenidos en el análisis de varianza el tiempo como el tipo de medio de cultivo tienen efecto sobre el crecimiento de *chlorella vulgaris*

Además, existe una interacción significativa entre el tiempo y el tipo de medio de cultivo.

Existen diferencias significativas entre las absorbancias medias de cada tratamiento, por lo que cada tratamiento afecta de manera diferente el crecimiento de la microalga.

Al finalizar la última etapa experimental del presente trabajo se llega a la conclusión que el Biosólido resulto ser factible para el crecimiento de la microalga *chlorella vulgaris* el cual ayuda a obtener una mayor biomasa microalgar que al utilizar un sustrato simple, por el motivo que, el Biosólido contienen materia orgánica, y nutrientes que las microalgas utilizan para alimentarse y teniendo así la capacidad de volver más eficiente el sistema de tratamiento propuesto en este trabajo realizado.

.

IX.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Abalde, J. (1995).** Concepción, Microalgas: Cultivo y Aplicaciones. coruña: Univercidad de la Coruña. 21.
- Acosta, E. (2004).** evaluacion de la remocion de nutrientes de aguas de porqueriza mediante el uso de microalgas. . *Universidad Nacional de Colombia*.
- Agriculture, U. S. (April 2010).** livestock and poultry: World and Trade, Apoyos y servicios a la comercializacion Agropecuaria (s.f). Secretaria de Agricultura Ganaderia desarrollo Rural, pesca y alimentacion,. consultado en diciembre del 2010, en <http://www.aserca.gob.mx>.
- alemana, M. (et al., 2001).** Aplicaciones biotecnologicas especificas de la microalga .
- Angel, C., & Pimenta, W. (et al., 2012).** Evaluacion de la icidencia del nitrogeno en el medio de cultivo bold basal para la produccion de biomasa de la microalga *Chlorella vulgaris* en un fotobioreactor, para la obtencion de acidos grasos. *Fundacion Univercidad de America*, 64.
- APHA-AWWA-WPFC. (1998).** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater . En *Americam Public Health Association Washington DC*. 20 th ed.
- Associatio, A. P. (2012).** Estándar Methods for the examination of wáter ans wastewater. En *Estándar Methods for the examination of wáter ans wastewater*.
- Ayala-Parra, P. L.-A. (2017).** Nutricion recovery and biogas generation from the anaerobie digestion of waste biomass from algal biofuel production. *Renewable Energy*,, 410-416.
- Basséres, D. I. (1989).** Biotreatment anaerobically digested swine manure with microaelgae,. En *Biolical Wastes*, (págs. 17-31,).

- Basséres, N. y. (1989).** *aplicaciones biotecnologicas especificas de las microalgas. Biorremediacion de nitrogeno y fosforo.*
- Blanco. (2011).**
- Bohutskyi, P. (2014).**
- Borowitzka, M. A. (2013).** High-value products from microalgae ---their development and commercialisation. *journal of Applied Phycology*, 743-756.
- Borowitzka, M. A. (et al., 2010).** "Sustainable biofuels from algae."
- Brenda Peray, D. R. (16 de diciemmbre de 2015).**
<https://prezi.com/bkpslaxweydg/disenio-de-bloques-completamente-al-azar/>.
 Obtenido de Prezi.
- Brennan, L. (2010).** Biofuels from microalgae---- A review of technologies for production, processing, and extractions of biofues and co-products.". *renewable and sustainable Energy Reviews*, 557-577.
- buhutskyi, p. B. (2014).** *the Effects of alternative .*
- Caldwell. (1940).**
- Cañizares. (et al., 1993).**
- Cañizares. (et al., 1994).**
- Cañizares- Villanueva, R. O.-L. (et al., 1994).** Growth of Phormidium sp in aerobic secondary piggery was-te-water en. En *appl, Appl, Microbiol, Biotechnol.*, (págs. 487-491).
- Cañizares, R. R. (et al., 1993).** free and Immobilized cultures of Spirulina maxima for Swine manure treatment en . *Biotech. Lett*, 321-326.
- Carpio, T. (2007).** Solidos totales secados a 103-105 °C . *Instituto de Hidrologia, meteorologia y estudios ambientales (IDEAM)* .
- Carrillo, L. (2003).** Microbiologia Agricola. caapitulo 5 .

Cordova Montaño, J. C. (2011). *APROVECHAMIENTO DE LOS RESIDUOS DE LA GRANJA PORCICOLA.* HERMOSILLO, SONORA, MEXICO: UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

Demirbas, A. D. (2010). algae energy (algae as a new source of biodiesel)." Springer .

Dinamarca, S. A. (2003). The influence of pH in the Hidrolytic Stage of Anaerobic Digestion of the organic Fraction of urban solid waste. water Science and Technology, 48,6. 294-254.

Disponible desde Internet en: <<https://harmonicarts.ca/2013/04/chlorellachlorella-vulgaris/>>. (s.f.).

Douskova, I. D. (2009). simultaneous flue gas bioremediation and reduction of microalgal biomass production costs . *Applied Microbiology and biotechnology* , 179-185.

Eleni Koutra, G. G. (et al., 2016). Microalgal post-treatment of anaerobically digested agro-industrial wastes for nutrient removal and lipids production. *Bioresource Technology*.

Elliott, K. G. (2012.). "Establishment of a bioenergy-focused microalgal culture collection, " . *Algal Research*, 102-113.

Fernández, J. L. (2018). Cultivo de microalgas en aguas residuales y aprovechamiento energético de la biomasa algal . *tesis doctoral* , 16.

Figuerola, G. (et.,al. 1998). Cresimiento poblacional de tres microalgas en diferentes medios de cultivo. *Rev. Soc. Mex. Hist.Nat.*,48, 1-6.

Goldman, J. C. (1975). **Mutrient transformation in mass culture of marine algae,** en. environ, Eng, Am. Soc, Civ., engrs.,.

Gomez., L. (1997).

Gonzalez. (et al., 1997). tratamiento de aguas residuales .

- Gonzalez, L. E. (1997).** Ciency of ammonia and phosphorus remova from a Colombia agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedes* .
- Gressel, j. (2008).** Transgenics are imperative for biofuel crops. *Plant Science*, 246-263.
- Harder, R. H. (1942).** uber massenkultur von diatomeen. . *Ber. Bot. Ges* , 146-152.
- Harder, R. H. (et al 1942).** *Uber massenkultur von diatomeen. Ber. Bot. Ges.*
- Hidaka, T. T. (2017).** caracterization for microalgae cultivated in continuous operation combined with anaerobic co-digestion of sewage sludge and microalgae. biomass and bioenergy. 139-146.
- Hill y R.A.Nordstedt. (1977).** Microalgae as means of recycling animal wastes. *J. Am. soc.Agr.Eng.*, vol , 77.
- Hill, L. y. (1977).** biorremediacion de nitrogeno y fosforo. En *Aplicaciones biotecnologicas especificas de las microalgas* (págs. 222-223).
- Hurwitz, S. y. (1980).** Nutricional evaluation of algae in various poultry diets. En *Algae Biomass*, . en G.Shelef, C y J. Soeder (eds,). .
- Jaramillo, G. y. (et al.,2008).** *Aprovechamineto de los residuos solidos organicos en colombia*. Obtenido de univercidad de antioquia: recuperado a partir de [http:// uniciencia.ambientalex.info/infoCT/Apressolorgco.pdf](http://uniciencia.ambientalex.info/infoCT/Apressolorgco.pdf)
- Jaramillo, G. Z. (2008).** aprovechamineto de los residuos solidos organicos en colombia.
- Jolis, D. (2008).** High-solids anaerobic digestion of minicipal sludge pretreated by thermal hydrolysis. *Water Environmental Researche*, 654-662.
- Jorge Luis Rodriguez Manrique, M. E. (2014).** EFECTO DEL ESTRES INDUCIDO POR DEFICIENCIA DE SALES NUTRITIVAS EN UN SISTEMA DE CULTIVO RACEWAY AWL DE LAS MICROALGAS *Chlorella vulgaris* Y

Scenedesmus dimorphus EN LA OBTENCION DE ACEITE . *enciclopedia biosfera* , 802.

Koutra. (2016).

Krishna, C. y. (2000.). Aerobic thermophilic and anaerobic mesophilic treatment of swine waste.

Lara-Isass, G. F. (1998). Crecimiento Poblacional de 'fres Microalgas en Diferentes Medios de Cultivo. *Rev. Soco Mex. Hisl. Nal.,.*

Lara-Isassi, G. F. (1998). Crecimiento Poblacional de 'fres Microalgas en Diferentes Medios de Cultivo. Obtenido de file:///E:/algas/48VCrecimientoPoblacional.pdf

Lee, E. C. (2017). Kinetic parameter estimation model for anaerobic co-digestion of waste activated sludge and microalgae. *bioresource technology*, 9-17.

lincoln. (et al., 1980). biorremediacion de nitrogeno y fosforo. En *Aplicaciones biotecnologicas especificas de laas microalgas* (pág. 223).

Lincoln, E. Y. (et al., 1980). An integrated microalgae system, en Ahelef G., C.J. Soeder y M, Balaban. *Algae Biomass, Elsevier. Amsterdam.,* 229-244.

López-Escobar, K. M.-H.-c.-C. (2014). Influence of organic loading rate on methane production in a CSTR from physicochemical sludge generated in a poultry slaughterhouse. *Journal of Environmental Science and Health, Part A.,* 49 (14), 1710-1717.

Malgas. (2013). estado de la tecnica. *Aplicaciones de las microalgas:*

Malina, J. a. (1992). Water quality management, design of anaerobic processes for the treatment of industrial and minicipal wastes. Technome Publising co inc, U.S.A. .

Nichlos. (1973). *G. Rrowth media-freshwater in; Stein, J. R.,* 7-24.

Nieves Abril Dias, J. A. (2014). *Espectrofotometria : espectros de absorbancia y cuantificacion colorimetrica de biomoleculas.* Campus Univercidad de

Rabanales -Edificio Severo Ochoa, 14071-Cordoba, av. Mendez Pidal S/N, 14004- Cordoba.

NOM-004-SEMARNAT-2002. (s.f.). Proteccion ambiental. Lodos y biosolidos. Especificaciones y limites maximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposicion final. *Diario Oficial de la Generación*.

Orandi, S. D. (2013). "Biosorption of heavy metals in a photo-rotating biological contactor - A batch process study". *Applird Microbiology and Biotechnology* , 5113-5123.

Palacios. (et al., 1997). estimacion del crecimiento de Chlorella vulgaris en cuatro tipos de suelos bajo condiciones de laboratorio. En *Revue latino-Americana of Microbiololy* (págs. 95-111).

Perdomo, C. (2008). Tecnicas para el aprovechamineto y valorizacion de llos residuos organicos con alta tasa de biodegradacion. . recuperado el 27 de agosto del 2016, a partir de [ftp://ftp.ani.gov.co/aeropuertos/Sur%20Occidente/T%C3%A9cnico/5,%20INVERSIONES/5.g\)%20Medio%ambiental](ftp://ftp.ani.gov.co/aeropuertos/Sur%20Occidente/T%C3%A9cnico/5,%20INVERSIONES/5.g)%20Medio%ambiental).

Pi- Hsin T. (1980). Mass culture and utilization of spirulina platensiis grown on fermented hog manu en proceeds. int. Symp. on Biogas microalgae Livestock wastes.

Pi-Hsin. (1980). *aplicaciones biotecnologicas especificas de las microalgas* .

Pi-Hsin T. (1980.). Mass culture and utilization of Spirulina platensis grown on fermented hog manu en. En *proceeds. Int, Symp. Biogas, Microalgae livestock Wastes,*.

PINOS, e. a., GRACIA, J., PELA, L., RENDON, J., GONZALES, C., & TRISTAN, F. (2012). Impacto y regulaciones ambientales de estiércol ganado por los sistemas ganaderos de algunos países de america. México. *Agrociencia*, V. 46 tomo 4, 360 p.

PINOS, J. G., PEÑA, L., RENDON, J., GONZALES, C., & TRISTAN, F. 2. (s.f.). Impacto y regulaciones ambientales de est.

Piqueras, V. Y. (2008). <https://victoryepes.blogs.upv.es/2014/06/30/diseno-de-experimentos-por-bloques-completos-al-azar/>. Obtenido de Víctor Yepes Piqueras.

Pirszel. (et al., 1995). la importancia de las algas. En *las microalgas en la biorremediacion acuatica* (págs. 219-220).

Quiles FJ 1, G. A. (s.f.). <http://boletin.sets.es/index.php/secciones/colaboraciones/73-cuantificacion-de-la-viabilidad-celular-mediante-azul-de-tripano-en-la-criopreservacion-de-celulas-progenitoras-hematopoyeticas-de-sangre-periferica>. Obtenido de https://www.google.com/search?q=camara+de+neubauer&rlz=1C1CHBF_eSMX860MX860&sxsrf=ACYBGNQ0Fqq3iD8o6s5f-Py5y2uEr5tOjQ:1580419928348&source=Inms&tbn=isch&sa=X&ved=2ahUKewi_9LKDo6znAhXBla0KHR4WBKqQ_AUoAXoECBAQAw&biw=1366&bih=657#imgsrc=baa0j91rRThAeM: <https://quercuslab.es/recuento-celular/940-camara-de-neubauer-ce.html>

Rai. (et al., 1981). contaminacion acuatica: problematica mundial. *microalga en la contaminacion acuatica: una alternativa biotecnologica*, 217.

Ramakrishnan, M. M. (2013). Mixotrophic cyanobacteria and microalgae as distinctive biological agents for organic pollutant degradation. *Environment international*, 59-72.

Ramos et al., C. A.-I. (1985.). the effect of nutrients in the development of algal populations (*Scenedesmus* spp.). *Arch. Hydrobiologic Beih.*, 63-69.

Rebolledo Robles, H. H. (2002). *Manual SAS por computadora: analisis estadistico de datos experimentales*. Ed. D.F.: Trillas México,.

Renobables, A. d. (2016). <https://www.appa.es/appa-biomasa/>.

- Richmond, A. (1986).** Cell response to environmental factor In: Richmonnd (Ed.).
En *Handbook of Microalgal Mas Culture*. (págs. 69-99). Boca Raton, Florida.
- SAGARPA. (2009-2017).** Servicio de informacion Agroalimentaria y Pesquera
(2015), Secretaria de Agricultura, Ganaderia, desarrollo Rural, Pesca y
Alimentacion, Poblacion Ganadera Bovinos (Carne y Leche).
- SENER, S. D. (2013).** *Estrategia nacional de energia 2013-2027*. México, D.F.
- silvestre, g. (2016).** *ainia.es*. Obtenido de <https://www.ainia.es/insights/por-que-la-fermentacion-oscura-puede-ser-una-alternativa-sostenible-para-valorizar-residuos/>
- Tasauro. (2013).** <https://boletinagrario.com/ap-6,absorbancia,1133.html>. (B. A. Unidos, Editor) Obtenido de <https://boletinagrario.com/ap-6,absorbancia,1133.html>.
- Torres. (2005).**
- Veeken, A., Kalyuzhnyi, S., & Hamerlers, B. (2000).** Effect of pH and VFA on hydrolysis of organic solid waste. .
- VELASQUEZ, M. (1981).** Botanicas vegetales inferiores .
- Vergine P., Z. J., & R, a. C. (2014.).** Low temperature microwave and conventional heating pretreatments to improve sludge anaerobic biodegradability. *Water Science y Technology*. 518-524.
- Víctor A. et al., V. J. (Junio 2017).** Uso de la microalga *Chlorella* sp. viva en suspensión en la decoloración del agua residual de una empresa textil. *Prospect.*, 93-99.
- Víctor A. Vacca Jimeno¹, E. R. (2017).** Uso de la microalga *Chlorella* sp. viva en suspensión en la decoloración del agua residual de una empresa textil . 95.
- WANG, L. (2009).** Cultivation of Green Algae *Chlorella* in Different Wastewater for Municipal Wastewater treatment plant University of Minnesota, Nanchang University.

- Zah et al., R. H. (2007).** *life cycle assessment of energy products: environmental assessment of biofuels*. EMPA, technology and society Lab.
- Zhang, L. C. (2018).** Cultivation of microalgae using anaerobically digested effluent from kitchen waste as a nutrient source for biodiesel production. *renewable energy*,. 276-287.

Anexos

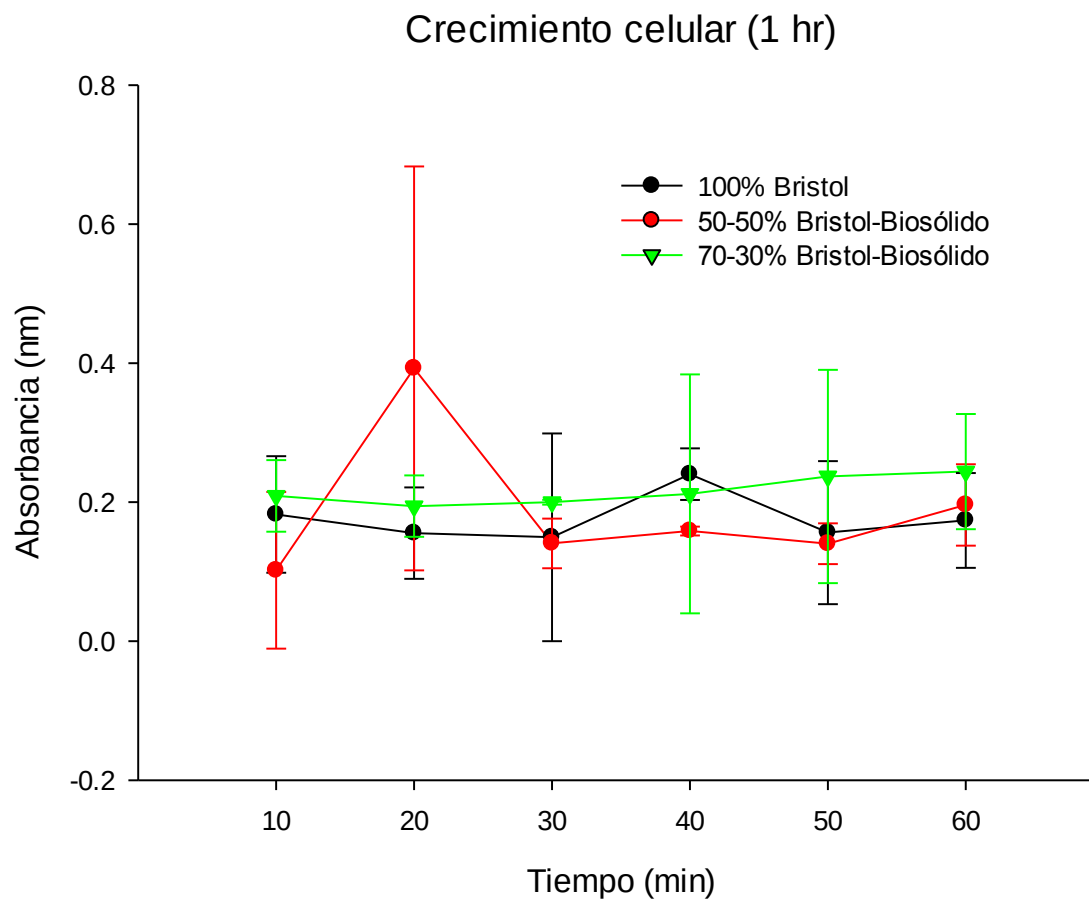


Figura 28 Crecimiento celular medido con espectrofotómetro durante 1 hr con mediciones cada 10 minutos.

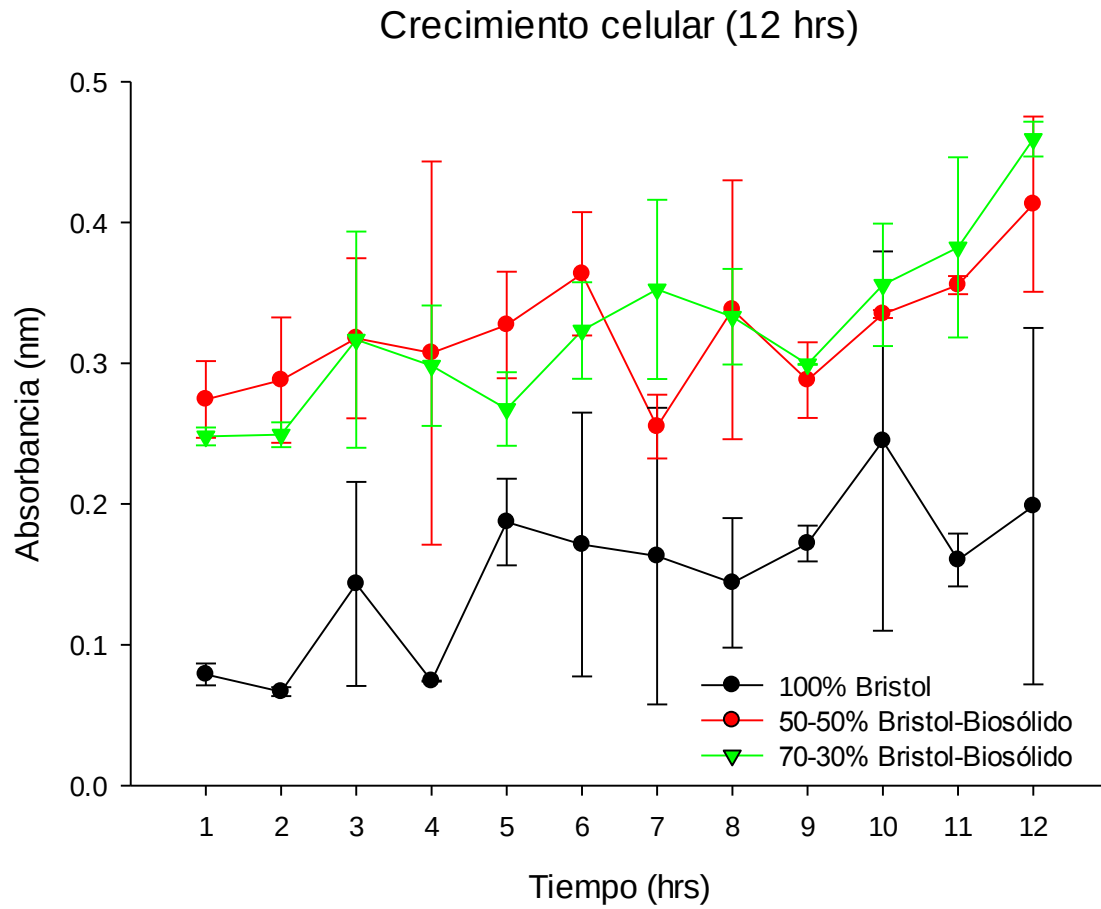


Figura 29 Crecimiento celular medido con espectrofotómetro durante 12 hrs con mediciones cada hora.

Cuadro 9 Análisis de varianza de dos vías para crecimiento (absorbancia) con tratamiento (tipo de medio de cultivo) y tiempo (horas de cultivo) como fuentes de variación

Fuente de variación	GL	SC	CM	F	P
Tratamiento	2	4.065	2.032	983.067	<0.001
Tiempo	23	2.372	0.103	49.895	<0.001
Tratamiento x Tiempo	46	1.045	0.0227	10.994	<0.001
Error	72	0.149	0.00207		
Total	143	7.631	0.0534		

Cuadro 10 Análisis de varianza para N°cel/mil, utilizando SC ajustada para pruebas, con tratamiento (tipo de medio de cultivo) y tiempo (horas de conteo de células) como fuentes de variación

Fuente de variación	GL	SC Sec	SC Ajust	CM Ajust	F	P
Tratamiento	2	4.67E+11	4.67E+11	2.33E+11	298.7	<0.001
Tiempo	4	2.52E+11	2.52E+11	6.30E+10	80.57	<0.001
Tratamiento x Tiempo	8	7.09E+10	7.09E+09	8.86E+09	11.34	<0.001
Error	15	1.17E+10	1.17E+10	7.81E+08		
Total	29	8.01E+11				

Cuadro 11 Análisis de varianza absorbancia vs tratamiento.

Tratamiento	Absorbancia media
70-30 Bristol Biosólido	0.4418 ^A
50-50 Bristol Biosólido	0.3615 ^B
100 Bristol	0.1038 ^C

NOTA. Método de Tukey con una confianza del 95%: Medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Cuadro 12 Análisis de varianza conteo celular vs tratamiento.

Tiempo	Media conteo celular
70-30 Bristol Biosólido	640600 ^A
50-50 Bristol Biosólido	437860 ^B
100 Bristol	341240 ^C

NOTA. Método de Tukey con una confianza del 95%: Medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Cuadro 13 Análisis de varianza absorbancia vs tiempo.

Tiempo (hrs)	Absorbancia media
24	0.6 ^A
12	0.3 ^B
8	0.2 ^B
1	0.2 ^B
4	0.2 ^B

NOTA. Método de Tukey con una confianza del 95%: Medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Cuadro 14 Análisis de varianza conteo celular vs tiempo.

Tiempo (hrs)	Media conteo celular
24	612233.3 ^A
12	517800.0 ^B
8	471266.7 ^{BC}
1	428133.3 ^C
4	336733.3 ^C

NOTA. Método de Tukey con una confianza del 95%: Medias que no comparten una letra son significativamente diferente.

