



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO®

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CIUDAD MADERO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA



"POR MI PATRIA Y POR MI BIEN"

TESIS

BIORREMEDIACIÓN DE AGUA DE LA LAGUNA EL CONEJO EN CONDICIONES AMBIENTALES PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA MICROALGAL EN LA ZONA DE ALTAMIRA, TAMAULIPAS.

Que para obtener el grado de:

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

Presenta:

M.I.A. Sheila Genoveva Pérez Bravo

D18073013

CVU 123018

Bajo la dirección de:

Director(a):

Dr. Luciano Aguilera Vázquez

Co-Director(a):

Dra. María de Refugio Castañeda Chávez

Ciudad Madero, Tamaulipas, **13/octubre/2023**

OFICIO No. : U.121/2023
ASUNTO: Autorización de
impresión de tesis

C. SHEILA GENOVEVA PÉREZ BRAVO
No. DE CONTROL D18073013
P R E S E N T E

Me es grato comunicarle que después de la revisión realizada por el Jurado designado para su Examen de Grado de Doctorado en Ciencias de la Ingeniería, se acordó autorizar la impresión de su tesis titulada:

“BIORREMEDIACIÓN DE AGUA DE LA LAGUNA EL CONEJO EN CONDICIONES AMBIENTALES PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA MICROALGAL EN LA ZONA DE ALTAMIRA, TAMAULIPAS”

El Jurado está integrado por los siguientes catedráticos:

PRESIDENTA:	DRA.	MARÍA DEL REFUGIO CASTAÑEDA CHÁVEZ
SECRETARIA:	DRA.	NOHRA VIOLETA GALLARDO RIVAS
PRIMER VOCAL:	DRA.	MARÍA LUCILA MORALES RODRÍGUEZ
SEGUNDO VOCAL:	DR.	LUCIANO AGUILERA VÁZQUEZ
TERCER VOCAL:	DRA.	ANA MARÍA MENDOZA MARTÍNEZ
DIRECTOR DE TESIS:	DR.	LUCIANO AGUILERA VÁZQUEZ
CO-DIRECTORA:	DRA.	MARÍA DEL REFUGIO CASTAÑEDA CHÁVEZ

Es muy satisfactorio para la División de Estudios de Posgrado e Investigación compartir con usted el logro de esta meta. Espero que continúe con éxito su desarrollo profesional y dedique su experiencia e inteligencia en beneficio de México.

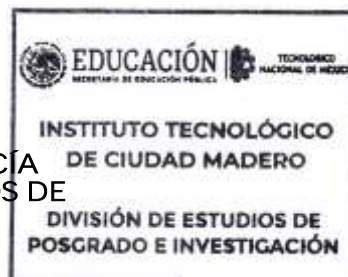
ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica

"Por mi patria y por mi bien"



MARCO ANTONIO CORONEL GARCÍA
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN



c.c.p.- Archivo
MACG 'NRV'



Dedicatoria

A mis queridos hijos *Naomi* y *Emiliano*, mi motivación diaria.

A mis padres *Genoveva* y *Roberto* por su apoyo incondicional.

Agradecimientos

Agradezco a mis directores de proyecto su apoyo incondicional, Dr. Luciano Aguilera Vázquez y Dra. María del Refugio Castañeda Chávez.

A mi comité tutorial sus asertivas observaciones, la Dra. Maria Lucila Morales Rodríguez, Dra. Ana Maria Mendoza Martínez y Dra. Nohra Violeta Rivas Gallardo.

En especial a la Dra. Adriana Isabel Reyes de la Torre, Dr. Ulises Páramo Garcia, Dr. Marco Antonio Coronel Garcia, Dr. José Luis Rivera Armenta. Dr. Ricardo Garcia Alamilla y la Dra, Nancy Patricia Díaz Zavala, quiénes me brindaron su apoyo sin formar parte de mi comité tutorial.

A todos los compañeros y amigos que me apoyaron a lo largo del doctorado, especialmente a Ana Anzures Mendoza.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado a través de la beca 21542.

Al Tecnológico Nacional de México / Instituto Tecnológico de Ciudad Madero.

Biorremediación de agua de la laguna El Conejo en condiciones ambientales para la producción de biomasa microalgal en la zona de Altamira, Tamaulipas.

Resumen

En la actualidad el medio ambiente enfrenta severos problemas de contaminación en sus recursos naturales, contaminación de cuerpos de agua dulce por descargas de aguas residuales, calentamiento global por exceso de emisiones de gases de efecto invernadero como el CO₂ entre otros, una alternativa a la solución de ambos problemas es la biorremediación de aguas naturales contaminadas con microalgas, aprovechando el CO₂ del aire y los nutrientes de cuerpos de agua eutrofizados, la biomasa obtenida de los procesos de biorremediación es rica en carbohidratos, proteínas y lípidos, en consecuencia es una materia potencial para la producción de biocombustibles. El desarrollo de cultivos microalgales con aguas contaminadas bajo condiciones ambientales de radiación y temperatura es una alternativa sustentable, además, la utilización de energía solar en lugar de lámparas para promover el crecimiento fotosintético de las microalgas reduce los costos de operación del proceso. En este trabajo se evalúa en conjunto la capacidad de biorremediación del agua de laguna eutrófica El Conejo con *Scenedesmus dimorphus* en las condiciones ambientales de radiación, temperatura y fotoperiodo de la zona. Se concluye que *Scenedesmus dimorphus* tiene una capacidad de remoción de $74.24 \pm 27.99\%$ de nitratos y $43.37 \pm 20.75\%$ de DQO, 0.030 g/L día de productividad de biomasa, una productividad de lípidos de $3.71 \pm 1.79 \text{ mg/L/día}$, concentración de lípidos $0.14 \pm 0.07 \text{ g/L}$, rendimiento de $14.99 \pm 6.23\%$ de lípidos totales, que se conforman de ésteres de triglicéridos, ácidos carboxílicos y fosfolípidos.

Bioremediation of water from El Conejo lagoon under ambient conditions for microalgal biomass production in the area of Altamira, Tamaulipas, México.

Abstract

Nowadays the environment faces severe problems of contamination in its natural resources, contamination of bodies of fresh water due to wastewater discharges, global warming due to excess emissions of greenhouse gases such as CO₂ among others, an alternative. The solution to both problems is the bioremediation of natural waters contaminated with microalgae, taking advantage of the CO₂ in the air and the nutrients of eutrophicated bodies of water. The biomass obtained from bioremediation processes is rich in carbohydrates, proteins, and lipids. Consequently, it is a potential material for the production of biofuels. The development of microalgae cultures with contaminated water under environmental conditions of radiation and temperature is a sustainable alternative, in addition, the use of solar energy instead of lamps to promote the photosynthetic growth of microalgae reduces the operating costs of the process. In this work, the bioremediation capacity of the water of the eutrophic lagoon El Conejo with *Scenedesmus dimorphus* is evaluated together in the environmental conditions of radiation, temperature and photoperiod of the area. It is concluded that *Scenedesmus dimorphus* has a removal capacity of $74.24 \pm 27.99\%$ of nitrates and $43.37 \pm 20.75\%$ of COD, 0.030 g/L day of biomass productivity, a lipid productivity of $3.71 \pm 1.79 \text{ mg/L /day}$, lipid concentration $0.14 \pm 0.07 \text{ g/L}$, yield of $14.99 \pm 6.23\%$ of total lipids, which are made up of triglyceride esters, carboxylic acids, and phospholipids.

Índice general

Resumen	VI
Abstract	VII
Índice de Tablas	XIII
Índice de Figuras	XVI
1 Introducción	1
1.1 Planteamiento del problema.	3
1.2 Objetivos.	6
1.3 Justificación del estudio.	7
2 Antecedentes	9
2.1 Biorremediación	9
2.2 Microalgas	12
2.3 Microalgas en Tamaulipas	17
2.3.1 <i>Scenedesmus dimorphus</i>	19
2.4 Nutrientes y medio de cultivo	20
2.4.1 Carbono	25
2.4.2 Nitrógeno	26
2.4.3 Fósforo	28
2.4.4 Luz	28
2.4.5 Temperatura	30
2.4.6 Agitación	30
2.4.7 Condiciones de operación de fotobiorreactores	31

2.5	Aplicaciones de la biomasa	32
3	Metodología	49
3.1	Zona de Estudio	49
3.1.1	Radiación solar	50
3.1.2	Hidrografía de Altamira, Tamaulipas	51
3.1.3	Laguna “El Conejo”	52
3.1.4	Calidad del agua	57
3.1.5	Condiciones naturales de crecimiento microalgal	59
3.2	Características del cuerpo de agua	60
3.2.1	Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO)	61
3.2.2	Determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO ₅)	65
3.3	Cultivo de microalgas	65
3.3.1	Tratamiento del medio de cultivo	67
3.3.2	Condiciones de cultivo	68
3.3.3	Evaluación de la biorremediación <i>in vitro</i>	69
3.3.4	Condiciones experimentales de la evaluación de la influencia del fotoperiodo	69
3.3.5	Esterilidad de equipos	70
3.3.6	Determinación de biomasa	71
3.3.7	Cosecha de biomasa	73
3.3.8	Extracción de aceites	73
4	Equipos y Materiales	75
4.1	Caracterización del agua de la laguna “El Conejo”	75
4.2	Cultivo de microalgas	77
4.2.1	Tratamiento del medio de cultivo	78
4.2.2	Condiciones de cultivo	79
4.2.3	Esterilidad de fotobiorreactores	79
4.2.4	Determinación de biomasa	80
4.2.5	Cosecha de biomasa	81

4.2.6	Extracción de aceites	81
4.2.7	Caracterización de biomasa y lípidos	82
5	Análisis y Resultados	83
5.1	Características de la Laguna "El Conejo"	83
5.2	Cultivo de microalgas	98
5.2.1	Replicas y escalamiento	98
5.2.2	Tratamiento del medio de cultivo	98
5.3	Cultivo de <i>Scenedesmus dimorphus</i>	101
5.3.1	Determinación de biomasa	101
5.3.2	Obtención de biomasa seca y lípidos	103
5.4	Dimensionamiento de un Fotobiorreactor de capa plana con sedimentador	104
5.4.1	Cultivo en FBR de capa plana	107
5.4.2	Composición de la biomasa cultivada en FBR	110
5.4.3	Perfil de lípidos de biomasa cultivada en FBR	113
5.5	Evaluación de la biorremediación <i>in vitro</i>	115
5.6	Evaluación de la influencia del fotoperíodo	127
6	Conclusiones y Trabajos Futuros	142
6.1	Conclusiones	142
6.2	Trabajos Futuros	144
6.3	Publicaciones	145
	Bibliografía	145

Índice de Tablas

Tabla 2.1	Biorremediación con microalgas	11
Tabla 2.2	Microalgas en la zona conurbada del sur de Tamaulipas	19
Tabla 2.3	Nomenclatura de ácidos grasos	20
Tabla 2.4	Cultivos de <i>Scenedesmus dimorphus</i>	21
Tabla 2.5	Medios de cultivo para microalgas	24
Tabla 2.6	Sistemas de cultivo microalgal	32
Tabla 2.7	Contenido de lípidos y carbohidratos de microalgas	34
Tabla 2.8	Métodos de extracción de aceites	38
Tabla 2.9	Biodiésel de microalgas	39
Tabla 2.10	Aceites de microalgas utilizados en el proceso de transesterificación para producción de biodiésel	41
Tabla 2.11	Producción de bioetanol a partir de microalgas	46
Tabla 2.12	Producción de biogas a partir de microalgas	48
Tabla 3.1	Fotoperiodo natural de Altamira, Tamps.	51
Tabla 3.2	Estándar de CONAGUA para DBO ₅	58
Tabla 3.3	Estándar de CONAGUA para DQO	58
Tabla 3.4	Clasificación de la calidad del agua	58
Tabla 3.5	Temperaturas anuales de la zona de cultivo	59
Tabla 3.6	Precipitación pluvial anual	59
Tabla 3.7	Radiación anual	60
Tabla 3.8	Puntos de muestreo	60
Tabla 3.9	Contenido del Bayfolan	66

Tabla 3.10	Escalamiento de cultivos	67
Tabla 3.11	Fotoperiodos naturales promedio de Altamira, Tamps.	70
Tabla 3.12	Diseño de experimental factorial	71
Tabla 5.1	Resultados de la demanda química de oxígeno	84
Tabla 5.2	Resultados DBO ₅	86
Tabla 5.3	Estadísticos descriptivos DQO (jul. - ago.)	87
Tabla 5.4	ANOVA DQO (jul.-ago.)	88
Tabla 5.5	Estadísticos descriptivos DBO ₅ (jul. - ago.)	89
Tabla 5.6	ANOVA DBO ₅ (jul.-ago.)	89
Tabla 5.7	Estadísticos descriptivos DQO (sep.-oct.)	91
Tabla 5.8	ANOVA DQO (sep.-oct.)	91
Tabla 5.9	Estadísticos descriptivos DBO ₅ (sep. - oct.)	92
Tabla 5.10	ANOVA DBO ₅ (sep.-oct.)	92
Tabla 5.11	Estadísticos descriptivos DQO (nov.-dic.)	94
Tabla 5.12	ANOVA DQO (nov.-dic.)	94
Tabla 5.13	Estadísticos descriptivos DBO ₅ (nov. - dic.)	95
Tabla 5.14	ANOVA DBO ₅ (nov.-dic.)	95
Tabla 5.15	Calidad del agua	97
Tabla 5.16	Balance de materia	97
Tabla 5.17	Métodos de tratamiendo del medio de cultivo	98
Tabla 5.18	Prueba t para dos muestras, suponiendo varianzas iguales	102
Tabla 5.19	Resultados de los cultivos en FBR.	108
Tabla 5.20	Remoción de nutrientes en los cultivos de <i>Scenedesmus dimorphus</i> en FBR	109
Tabla 5.21	Bandas FTIR encontradas en <i>Scenedesmus dimorpus</i> cultivada en FBR	112
Tabla 5.22	Picos del espectro FTIR del lípido de <i>Scenedesmus dimorphus</i> cultivada en FBR	114
Tabla 5.23	Cultivos de <i>Scenedemus dimorphus</i> en botellas PET de 5 L	117
Tabla 5.24	Remoción de nutrientes en los cultivos de <i>Scenedesmus dimorphus</i> en botellas PET de 5 L	118

Tabla 5.25	Productividad y rendimiento de lípidos de <i>Scenedemus dimorphus</i> cultivada en botellas PET de 5 L	119
Tabla 5.26	Picos del espectro FTIR del lípido de <i>Scenedemus dimorphus</i> obtenido de la biorremediación del agua de laguna El Conejo	122
Tabla 5.27	Productividad de biomasa en ambos medios de cultivo bajo los diferentes fotoperiodos analizados	128
Tabla 5.28	Resultados del análisis ANOVA de las productividades de biomasa en ambos medios de cultivo bajo distintos fotoperiodos	128
Tabla 5.29	Resultados del análisis ANOVA de las productividades de biomasa obtenidas para agua de laguna eutrofizada	129
Tabla 5.30	Prueba de Tuckey HSD de las productividades de biomasa para agua de laguna eutrofizada en los fotoperiodos analizados	129
Tabla 5.31	ANOVA de las productividades de biomasa obtenidas en Bayfolan 0.3% . . .	129
Tabla 5.32	Prueba de Tuckey HSD de las productividades de biomasa en Bayfolan 0.3% . . .	130
Tabla 5.33	Porcentaje de remoción de DQO bajo diferentes fotoperíodos	133
Tabla 5.34	Resultados del análisis ANOVA del porcentaje remoción de DQO en ambos medios de cultivo bajo distintos fotoperíodo	133
Tabla 5.35	Resultados del análisis ANOVA del porcentaje remoción de DQO obtenidos para agua de laguna eutrofizada	133
Tabla 5.36	Prueba de Tuckey HSD del porcentaje de remoción de DQO para agua de laguna eutrofizada en los fotoperiodos analizados	133
Tabla 5.37	Resultados del análisis ANOVA del porcentaje remoción de DQO en Bayfolan 0.3%	134
Tabla 5.38	Prueba de Tuckey HSD del % remoción de DQO en Bayfolan 0.3%	134
Tabla 5.39	Bandas características en FTIR	138

Índice de Figuras

Figura 2.1	Metil esterres de ácidos grasos provenientes de <i>Scenedesmus dimorphus</i>	44
Figura 3.1	Ubicación de Altamira	50
Figura 3.2	Sistema lagunario de Altamira, vista satélite	52
Figura 3.3	Sistema lagunario de Altamira, vista mapa	53
Figura 3.4	Hidrografía de Altamira	53
Figura 3.5	Ubicación geográfica de la laguna “El Conejo”	54
Figura 3.6	Laguna “El Conejo”	55
Figura 3.7	Flora y fauna de la laguna “El Conejo”, A) Lirio acuático (<i>Eichhornia crassipes</i>), B) Lechuga de agua (<i>Pistia stratiotes</i>), C) garza blanca.	55
Figura 3.8	Ducto de descarga	56
Figura 3.9	Puntos de muestreo	61
Figura 3.10	Metodología para análisis DQO	64
Figura 3.11	Metodología para análisis DBO ₅	66
Figura 3.12	Dispositivo empleado para la biorreediación	69
Figura 5.1	Diagrama de caja de DQO (julio-agosto)	88
Figura 5.2	Diagrama de caja de DBO ₅ (julio-agosto)	89
Figura 5.3	Diagrama de caja de DQO (septiembre-octubre)	91
Figura 5.4	Diagrama de caja de DBO ₅ (septiembre-octubre)	92
Figura 5.5	Diagrama de caja de DQO (noviembre-diciembre)	94
Figura 5.6	Diagrama de caja de DBO ₅ (noviembre-diciembre)	95
Figura 5.7	Replicación de células y escalamiento de cultivos	99

Figura 5.8	Resultados del análisis microbiológico del agua de Laguna “El Conejo”, sometida a los métodos de tratamiento para desinfección.	100
Figura 5.9	Absorbancia del agua de la laguna	102
Figura 5.10	Proceso de elaboración de curva de calibración	103
Figura 5.11	Curva de calibración de biomasa seca de <i>Scenedesmus dimorphus</i> vs absorbancia a 685 nm	103
Figura 5.12	Dimensionamiento de un FBR de capa plana.	105
Figura 5.13	Fotobiorreactor de capa plana.	108
Figura 5.14	Curva de crecimiento microalgal en FBR.	109
Figura 5.16	Grupos funcionales identificados en el espectro FTIR de la microalga <i>Scenedesmus dimorphus</i> cultivada en FBR	111
Figura 5.15	Espectro FTIR de la microalga <i>Scenedesmus dimorphus</i> cultivada en FBR	111
Figura 5.17	Grupos funcionales identificados mediante FTIR del aceite de la microalga <i>Scenedesmus dimorphus</i> cultivada en FBR	113
Figura 5.18	Cultivos de <i>Scenedesmus dimorphus</i> en PET	116
Figura 5.19	Curvas de crecimiento de <i>Scenedesmus dimorphus</i>	117
Figura 5.20	Espectros de aceites de <i>Scenedesmus dimorphus</i>	121
Figura 5.21	Grupos funcionales identificados en los espectros de aceites de <i>Scenedesmus dimorphus</i>	121
Figura 5.22	Cultivos de <i>Scenedesmus dimorphus</i> en PET de 1.5 L	128
Figura 5.23	Comportamiento de las productividades de biomasa en los fotoperiodos analizados	131
Figura 5.24	Curvas de crecimiento de <i>Scenedesmus dimorphus</i> cultivada en agua de laguna eutrofizada en agua de laguna El Conejo	131
Figura 5.25	Curvas de crecimiento de <i>Scenedesmus dimorphus</i> cultivada en Bayfolan al 0.3%	132
Figura 5.26	Espectros FTIR de <i>Scenedesmus dimorphus</i> cultivada en agua de laguna eutrofizada, bajo los fotoperiodos F1 y F4	136
Figura 5.27	Espectros FTIR de <i>Scenedesmus dimorphus</i> cultivada en Bayfolan al 0.3%, bajo los fotoperiodos F1 y F4	137

Figura 5.28 Grupos funcionales identificados mediante FTIR de la biomasa de microalga

<i>Scenedesmus dimorphus</i>	140
--	-----

Introducción

El incremento poblacional plantea desafíos económicos globales, en términos de conservación ambiental y seguridad energética [1]. La situación ambiental y el agotamiento de reservas de hidrocarburos impulsan la búsqueda de combustibles alternativos [2] e innovación de procesos productivos con enfoques sustentables. Los procesos industriales consumen grandes cantidades de agua tomadas de cuerpos cercanos y producen aguas residuales que incluso tratadas aportan contaminantes a los cuerpos de agua receptores.

Actualmente la energía es indispensable para el desarrollo de las actividades cotidianas ya sea en forma química como combustible de los medios de transporte, o bien como energía eléctrica, para hacer funcionar los dispositivos electrónicos y tecnológicos comúnmente utilizados por el ser humano; dicha energía es producida principalmente por los combustibles derivados del petróleo, debido a su naturaleza fósil generan emisiones de CO₂, el gas de efecto invernadero más abundante en la atmósfera

y principal responsable del incremento del calentamiento global [3,4]. En beneficio del medio ambiente es necesario migrar a la producción de energía renovable y procesos sustentables.

Una alternativa para la producción de energía son los biocombustibles, ya que su origen esta basado en el ciclo corto del carbono, entre ellos se encuentran el biogás, biodiésel y bioetanol [5], además de no ser tóxicos [6], pueden producirse a partir de biomasa vegetal o microalgal. Sin embargo, el uso de biomasa vegetal compite con el sector alimenticio, por lo cual ha habido un reciente interés en la investigación de la producción de biomasa microalgal. Se considera que las emisiones de carbono de los biocombustibles a base de microalgas son neutras ya que utilizan grandes cantidades de dióxido de carbono para su desarrollo, aproximadamente 180 toneladas para la producción de 100 toneladas de biomasa [7], tienen rápidas tasas de crecimiento [8], por otro lado, contienen compuestos bioactivos con valor nutricional y para las industrias cosmética y farmacéutica [9].

Generalmente en los trabajos de investigación, el cultivo de microalgas se desarrolla en medios sintéticos preparados con los nutrientes necesarios, también puede desarrollarse en aguas residuales o contaminadas al mismo tiempo que las depuran utilizando fuentes artificiales de luz. Sin embargo, no se ha investigado su crecimiento en aguas naturales contaminadas con luz natural, lo cual sería una alternativa a la reducción de la contaminación de aguas naturales y disminución de costos de producción de biomasa.

En este trabajo se evalúa la productividad de biomasa y lípidos, tasas de depuración de los cultivos microalgales con agua de la laguna eutrofizada El Conejo ubicada en la zona de Altamira, Tamaulipas, bajo condiciones ambientales, así como la influencia del fotoperiodo en el crecimiento.

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En 2021 la población en el país era aproximadamente de 128.97 millones de habitantes y por cada uno se requieren 80.81 GJ conforme a los indicadores energéticos reportados por la SENER (Secretaría de Energía) en el Balance Nacional de Energía 2021 [10]. Además de la estimación del crecimiento poblacional de personas en el mundo a 9 billones de individuos para el año 2050, se nota un incremento en el consumo de recursos para satisfacer sus necesidades individuales, lo que conlleva una expansión del sector transporte debido a la internalización de la economía y del comercio [3].

El transporte es un sector que aumenta proporcionalmente con el crecimiento de la población, los combustibles requeridos para este sector provienen de la destilación fraccionada de petróleo, compuesto generalmente del 85 % en carbono, 12 % en hidrógeno y 3 % de azufre, nitrógeno y oxígeno. Debido a su origen fósil es inevitable el arrastre de partículas de azufre, y posteriores emisiones de óxidos de azufre, óxidos de nitrógeno y CO₂, e hidrocarburos no quemados [11, 12]. La utilización de biodiésel en lugar de diésel puede reducir las emisiones de óxidos de nitrógeno y óxidos de azufre, así como contribuir a la reducción de emisiones de gases de efecto invernadero [13]. La gasolina es el derivado del petróleo con un mayor consumo, ya que es destinado para el funcionamiento de vehículos con motor de encendido provocado y el diésel para motores de encendido a compresión [14, 15]. El consumo de combustibles en el sector transporte totalizó en 2,784.64 PJ en 2021, 63.45 % más que en 2020. El autotransporte fue el componente más representativo, con 93.30 % de participación, aumentado 64.84 % respecto al año anterior. De la demanda de autotransporte, los vehículos a gasolina utilizaron el 71.7 % y los vehículos diésel el 28.3 % en 2021 [10].

Mundialmente se enfrentan dos grandes problemas derivados de la actividad antropogénica moderna, la disminución de las reservas de petrolíferos y la contaminación ambiental causada por la combustión indiscriminada de combustibles fósiles [16–18]. Uno de los problemas ambientales más notorios es el calentamiento global, ocasionado por las excesivas emisiones de CO₂ [19].

Los biocombustibles con propiedades fisicoquímicas análogas a los derivados del petróleo tienen las ventajas de poder ser utilizados directamente o con algunas modificaciones en el parque automotor actual, como el biodiésel que puede ser almacenado y distribuido en las mismas instalaciones sin requerir cambios importantes en la infraestructura instalada, la tecnología de los motores a compresión no requiere cambios importantes para su utilización. Un estudio realizado por [13] evaluó mezclas de diésel-biodiésel y concluye que al usar una mezcla B20 (80 % diésel-20 % biodiésel) se presenta una disminución de emisiones de CO, CO₂ y óxidos de nitrógeno, sin comprometer las prestaciones del motor. Así como el bioetanol puede utilizarse en mezclas con la gasolina como un oxigenante, mejorando la combustión y disminuyendo las emisiones, una mezcla con 10 % de bioetanol en gasolina reduce 3 % las emisiones de Gases de Efecto Invernadero (GEI). Debido a una combustión más completa se disminuyen las emisiones de gases contaminantes y de partículas sin quemar mientras se aumenta el octanaje. A este porcentaje de mezcla no se presentan efectos corrosivos en las mangueras, conexiones y tanques de almacenamiento, por otra parte se reporta un incremento en el consumo de combustible del 3.41 % comparado con gasolina de 92 octanos [20].

El bioetanol producido a partir de caña de azúcar, genera 90 % menos emisiones de gases de efecto invernadero que la gasolina, consumiendo menos del 80 % de energía en la producción [21]. Los vehículos a gasolina y diésel son una de las principales fuentes móviles de contaminación atmosférica por su contribución de CO₂, óxidos de nitrógeno e hidrocarburos (HC) a los inventarios nacionales y locales de emisiones [22]. La materia prima principal para la producción de biodiésel son los triglicéridos, utilizar los que provienen de aceites vegetales de cultivos oleaginosos como la soya, girasol y canola se asocia a la afectación de los precios de algunos alimentos [23–26]. Para la producción de bioetanol se utilizan los cultivos amiláceos como la caña de azúcar, maíz, sorgo y remolacha [5, 27], los cuales compiten con el sector alimenticio. Una fuente alternativa de aceites vegetales que no compite con el sector alimenticio son las microalgas.

Por otro lado, el agua es un recurso vital para el desarrollo y subsistencia de las comunidades, por ende, es esencial evitar o reducir la contaminación de aguas superficiales y subterráneas, además de asegurar su disponibilidad en los hábitats conservando su biodiversidad [28]. Debido a que el agua superficial de

los ríos y lagos se utiliza para el abasto de las actividades humanas [29]. En la actualidad se observa el incremento de la contaminación de los cuerpos de agua dulce, las principales fuentes de contaminación antropogénicas que aminoran la calidad del agua son las descargas de aguas residuales urbanas sin tratamientos e industriales, agroquímicos, además de la contaminación natural por escorrentía de material particulado y disuelto, así como también por la degradación de material orgánico animal y/o vegetal [29, 30].

México cuenta con diferentes climas, cuencas, vegetación y topografía, que permiten el desarrollo de una gran diversidad algal, aproximadamente 12 mil cuerpos epicontinentales y ocho lagos naturales [31]. Los ríos y arroyos del país constituyen una red hidrográfica de 633 mil km de longitud entre los que destacan 50 ríos principales por los que fluye en 87% del escurrimiento superficial. Las cuencas hidrográficas de la república mexicana son 1471 (Semarnat, 2011). La longitud de la línea de costa del océano pacifico es de 7 828 km y del golfo de México y Mar Caribe 3 294 km [32].

Una reciente evaluación de los recursos naturales de México, las condiciones climáticas, datos geológicos, sitios históricos y urbanos, mediante un Sistema de Información Geográfica (ArcGIS 6.10) y considerando una producción conservadora de microalgas en estanque abierto con capacidad de 20 g/m²d, dan como resultado que el país es capaz de producir 3.8 billones de toneladas de microalgas al año, además considerando las condiciones climáticas, se determinó que el 26.88% del territorio nacional es adecuado para el cultivo de microalgas, resaltando el potencial de los estados de Jalisco, Oaxaca, Veracruz y Guerrero como los de mayor potencial [33].

Determinar la presencia de las microalgas nativas en una región específica es un indicativo de la supervivencia de esta en las condiciones ambientales de la misma, en consecuencia, se podrá cultivar el microorganismo en condiciones similares para su posterior conversión a bioenergía.

1.2. OBJETIVOS.

Biorremediar agua de la laguna El Conejo utilizando microalgas *Scenedesmus dimorphus* en condiciones ambientales para la producción de biomasa en la zona de Altamira, Tamaulipas, e identificar la capacidad de crecimiento y acumulación de lípidos.

Objetivos específicos

- Determinar el grado de eutrofización de la laguna El Conejo para evaluar su potencial como medio de cultivo microalgal
- Cultivar microalgas en condiciones naturales de radiación y temperatura, en agua de la laguna “El Conejo” como medio de cultivo.
- Identificar la influencia del fotoperiodo natural en la productividad y la caracterización de biomasa, así como su influencia en el perfil de ácidos grasos.

1.3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

La tendencia global para la solución de las problemáticas ambientales es la reducción del uso de combustibles fósiles, con el reemplazo creciente de los biocombustibles renovables que no contaminen y presenten una emisión neutra o casi neutra respecto al CO₂ [2,34]. Se han investigado diversas formas de producción de biocombustibles, una de ellas a partir de biomasa microalgal, cuya limitante para la producción industrial es la inviabilidad económica, por lo cual es necesario investigar la producción de biomasa de bajo costo.

Una de las principales ventajas de la producción de biocombustibles a partir de microalgas es su demanda estequiométrica de 1.7 kg CO₂/kg de biomasa, lo que contribuye a la mitigación del efecto invernadero provocado por las emisiones excesivas de CO₂, adicionalmente la biomasa residual puede ser utilizada en otros procesos [35], además tienen capacidad para crecer en aguas no dulces y en terrenos que no son aptos para agricultura [4], todo lo anterior las clasifica como una fuente alternativa renovable y respetuosa con el ambiente [36].

El uso de aguas contaminadas o residuales como medios de cultivo microalgal es una alternativa a los medios de cultivo comerciales ya que tienen capacidad ficorremediadora, es decir, son capaces de eliminar y biotransformar los contaminantes de un medio líquido [37], además de eliminar nitrógeno y fósforo, son capaces de eliminar cadmio, zinc, níquel y plomo [38], es decir, disminuyen la contaminación ocasionada por metales pesados. Por otro lado, el 75 % del costo de producción de la biomasa microalgal se atribuye al medio de cultivo [39], investigar el potencial de producción de biomasa en aguas residuales, así como la degradación de contaminantes en el agua y los metabolitos obtenibles de este tipo de cultivos pueden ofrecer alternativas al tratamiento de aguas y obtención de bioproductos.

Las microalgas cultivadas en aguas residuales pueden ser candidatos potenciales para la producción de alcoholes superiores, bioetanol y biodiésel, respectivamente, al mismo tiempo que realizan la eliminación de nutrientes del medio de cultivo, su contenido en ácidos grasos como el palmítico, oleico

y linolénico las hace viables para la producción de biodiésel [40]. Mientras que las microalgas con gran capacidad de producir proteínas, entre el 30 a 60 % de su peso seco, las hace buenas fuentes de proteína para abono orgánico, alimento para animales o suplemento de nutrición humana [41].

El interés científico en la biorremediación de aguas contaminadas se ha enfocado en las aguas residuales municipales y las generadas en la industria. Ante la problemática de contaminación de cuerpos de agua naturales, es conveniente investigar su biorremediación con microalgas.

Scenedesmus dimorphus es una microalga poco estudiada en la producción de biocombustibles y biorremediación, sin embargo, se ha informado que esta especie tiene tolerancia a la contaminación ambiental, ya que suele encontrarse en muchos ambientes eutrofizados de aguas residuales [42], de hecho fue hallada en aguas residuales industriales de la zona de Altamira [43]. Entre otras ventajas de esta microalga se encuentran la resistencia al calor, rápido crecimiento y facilidad de sedimentación gravitacional [19].

En resumen la producción de biomasa microalgal con agua de laguna eutrofizada en condiciones ambientales se justifica por diversas razones, entre ellas, evaluar la posibilidad de utilizar aguas naturales contaminadas como medios de cultivo de bajo o nulo costo al mismo tiempo que se disminuyen o eliminan los contaminantes del medio. La biomasa microalgal presenta cortos tiempo de cosecha en comparación con la biomasa vegetal, es una alternativa a la mitigación del efecto invernadero y la no competencia en el sector alimenticio, aunado al beneficio ambiental de la biorremediación de aguas naturales contaminadas. Elucidar su composición química y porcentaje de lípidos permitiría saber si bajo las condiciones de cultivo experimentales es candidata a la producción de biocombustibles.

Antecedentes

A continuación se presentan los aspectos más relevantes de las microalgas y los beneficios de la biorremediación de cuerpos de agua

2.1. BIORREMEDIACIÓN

Las microalgas tienen capacidad ficorremediadora, es decir, son capaces de eliminar y biotransformar los contaminantes de un medio líquido [37], tales como el nitrógeno y fósforo que contienen las aguas residuales, que son nutrientes esenciales para el crecimiento microalgal [44]. Además de metales pesados como el cadmio, zinc, níquel y plomo [38], por otro lado, el hierro tiene valor nutritivo para su crecimiento [45].

La contaminación por metales es otro de los problemas medioambientales que han surgido en consecuencia de la revolución industrial, afectando, suelo, agua y aire, entre ellos el cadmio, cromo, cobre, mercurio, plomo y zinc. Recientemente se ha estudiado el potencial de absorción de metales de las microalgas, Toranzo et al. [46] desarrollaron la resistencia al cromo VI de una cepa de *Scenedesmus dimorphus*, desafortunadamente no observaron la degradación del metal.

También se ha reportado que reducen el contenido de nitratos, fosfatos y amonio de las aguas residuales, además de descomponer moléculas de hidrocarburos, antibióticos y compuestos clorados [47], han sido utilizadas para la remediación de aguas residuales de la industria textil [48]. El uso de aguas residuales en el cultivo de microalgas tiene la ventaja de la purificación del agua, reduciendo así la contaminación ambiental [44]. Los parámetros utilizados para medir la eficiencia de eliminación de nutrientes, son la Demanda Química de Oxígeno (DQO), nitrógeno total (NT) y fósforo total (TP) [49], la medición de nitratos y fosfatos también sirve como indicador de biorremediación.

El cultivo de microalgas ha sido realizado en diversos medios y en aguas de diferentes calidades, se reporta la disminución de amonio y fosfatos en un 50 y 74% respectivamente por *Chlorella vulgaris* en agua residual artificial [50]. Así como la disminución de DBO₅ y DQO del 95.4 y 94.6% respectivamente por la microalga *Chlorella sp.* en agua residual de una empresa textil sin ningún tipo de pretratamiento [51]. Por otro lado, el cultivo de *C. vulgaris*, *Scenedesmus acutus* y *Arthrospira máxima* presentaron un mejor crecimiento y remoción de ortofosfatos, nitrato, nitrógeno orgánico y amoniacal, además de DQO en agua residual cruda recolectada de una planta de tratamiento de aguas residuales, tratada mediante cribado y sedimentación [52]. Las microalgas tienen gran potencial en el tratamiento de aguas con producción de biomasa y eliminación de nutrientes, las tasas de eliminación varían mucho entre especies y los regímenes de luz [53].

En la Tabla 2.1 se resumen los resultados obtenidos del cultivo de microalgas en aguas contaminadas, algunos estudios se enfocan sólo en la productividad de biomasa y lípidos, sin reportar las eficiencias de remoción. Mata, et al, 2013 [54] concluyen que el uso de aguas residuales ricas en nitratos y hierro en el cultivo de *Dunaliella tertiolectica* incrementan el contenido de biomasa y productividad de

lípidos. Xaaldi, et al., 2016 [55] reportan un incremento del 20% en biomasa seca al aumentar la contaminación con hidrocarburo a 20 mg/L, en comparación con el medio de cultivo de control. Por otro lado, Paladino, et al., 2021 [56] reportan el crecimiento de *Chlorella vulgaris* en condiciones mixotróficas a una concentración de 1.45 a 1.55 g/L, con glicerol como fuente de carbono.

De Souza et al. [57] afirman que la recuperación de nutrientes, en particular nitrógeno, fósforo y la absorción de metales por parte de *Scenedesmus sp.* cultivada en lixiviados de vertedero sanitario al 80%, es un proceso eficiente para la biorremediación. Kothari et al. [58] recomiendan enfocar las aguas residuales como medios para el crecimiento de especies deseadas para la producción de biomasa y limpieza de las aguas.

La utilización simultánea de microalgas en biorremediación de aguas residuales y producción de biomasa requiere investigación e innovación para ser económica [9].

Tabla 2.1: Biorremediación con microalgas

Medio de Cultivo	Organismo	Remoción	Referencia
Agua de mar artificial con nutrientes	<i>Dunaliella terticolecta</i>		[54]
Agua residual doméstica	<i>Scenedesmus sp</i>	98.3% NH ₄ , 70.2% NO ₃ ⁻ , 78.9% PO ₄ ⁻³ , 95.9% DQO	[59]
Lixiviado de vertedero sanitario		87.4% PO ₄ ⁻³ , 24% NO ₃ ⁻ , 65.4% NO ₂ ⁻	[57]
Agua residual cruda PTAR	<i>Chlorella vulgaris</i>	60% fósforo, 90% Nitratos, nitrógeno orgánico y amoniacal	[52]
Agua contaminada con petróleo crudo			[55]
Agua residual (reactor biológico)		100% NH ₄ , 100% DQO	[60]
Agua residual (reactor biológico)+Bayfolan		99.92% NH ₄ , 49.9% NH ₃ , 8.05% PO ₄ ⁻³ , 100% DQO	[60]
Agua residual rica en glicerol y CO ₂			[56]
Agua residual municipal	<i>Scenedesmus dimorphus</i> y <i>S. minutum</i>	79% N-NH ₃ , 93.7% PT	[36]
Agua residual con ácido láctico,	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	96.31% NT, 90.78% PT, 95.06% DQO, 0.8 g/L NaNO ₃ y 4 mg/L K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	[42]
Agua residual rica en estiércol porcino		98.22% N-NH ₃ , 90.94% Ác. láctico	
Agua residual de lechería	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	88.16% NT, 73.98% PT	[61]
		80-85% P, 60-80% N	[58]

2.2. MICROALGAS

En concreto, son microorganismos unicelulares, procariotas o eucariotas fotosintéticos, obtienen la energía de la luz proveniente del sol, se desarrollan a partir de materia orgánica, requieren de algunos elementos inorgánicos para su crecimiento: el carbono, hidrógeno y oxígeno pueden provenir del agua y del aire, los demás elementos del medio de cultivo [62], específicamente los elementos inorgánicos como el nitrógeno, fósforo, hierro y silicio deben ser proporcionados por el medio de cultivo, el fósforo debe aportarse en exceso ya que los fosfatos agregan un complejo con los iones metálicos [34].

Estos organismos habitan diversos ambientes acuáticos en todos los ecosistemas del planeta, es decir, habitan en agua dulce o salada, para su crecimiento viven en la zona fótica, la profundidad de la zona varía dependiendo la absorción atmosférica de la luz, ángulo entre el sol y la superficie del mar, existe una zona en que la luz es escasa o de baja calidad espectral en la que no ocurre la fotosíntesis, además se ve influenciada por las condiciones climáticas a lo largo del día y los cambios estacionales. Generalmente la zona fótica varía de unos metros en la zona costera hasta 200 m en mares claros tropicales, su crecimiento contribuye como una forma de mitigación del efecto invernadero debido a su consumo de CO₂ [8, 63], ya que son responsables del 50% de la fijación global de carbono orgánico. Estos microorganismos unicelulares tienen dimensiones que van desde 2-200 μm , cuyo su metabolismo puede ser autotrófo o heterotrófo y suelen ser eucariotes; la diferencia entre las procariontes y eucariotes son los orgánulos, las procariontes no poseen cloroplastos, núcleos y mitocondrias, pero si contienen clorofila a y alto contenido de proteínas, pueden crecer en un amplio rango de temperatura desde 5 hasta 35 °C. En la zona fótica, la radiación solar proporciona la energía para que el medio alcance la temperatura apropiada para que se pueda tener un sistema de crecimiento natural [64].

Los estímulos químicos como la deficiencia de nutrientes (nitrógeno, fósforo, azufre y silicio), salinidad y pH, así como los estímulos físicos temperatura e intensidad luminosa influyen en la composición de los lípidos y ácidos grasos contenidos en las microalgas [65, 66]. La relación C:N es la principal responsable de la síntesis y acumulación de lípidos intracelulares [67], ambos elementos son importantes

en la ruta metabólica fotosintética de las microalgas [62]. Se han estudiado varias cepas de microalgas en diferentes medios de cultivo enfocados en incrementar la productividad de biomasa o productividad de lípidos, sin embargo, no se han enfocado en el aprovechamiento de la luz solar y aguas naturales contaminadas, en la Tabla 2.1 se resumen los resultados de investigaciones relacionadas con la remoción de nutrientes. Además las microalgas presentan la capacidad de crecer en terrenos inadecuados para la agricultura, su cultivo es potencial en aguas dulces, saladas e inclusive en vertederos de lixiviado [68]

Los métodos de cultivo microalgales pueden ser batch o lote, semicontinuo o continuo, el cultivo por lotes consiste en una única inoculación del medio de cultivo, espera de un periodo de crecimiento y cosecha de la biomasa. En un cultivo semicontinuo se realizan cosechas parciales periódicas, manteniendo el volumen del medio de cultivo con una variación no mayor al 10% del volumen de trabajo, así como una concentración similar a la de los estados iniciales después de cada cosecha. En los cultivos continuos se suministra medio de cultivo enriquecido constantemente en una cámara de crecimiento, extrayendo simultáneamente el exceso de cultivo, de manera que el factor de dilución iguale la velocidad de crecimiento, manteniendo el cultivo muy cerca de la máxima velocidad de crecimiento. El cultivo de microalgas se desarrolla en cinco fases: fase de adaptación, fase exponencial, fase de declinación del crecimiento, fase estacionaria y fase de muerte [69].

En la fase de adaptación el comportamiento de las células depende de las condiciones de las células del inóculo, la fase exponencial es donde la velocidad de crecimiento alcanza su máximo y permanece casi constante la concentración celular, la fase de declinación o desaceleración del crecimiento es donde disminuye la tasa de división celular, en la fase estacionaria la tasa de natalidad es igual a la de mortalidad, la concentración celular permanece sin cambios relevantes, en la fase de muerte la tasa de mortalidad supera la de natalidad y la concentración celular disminuye [70].

Las microalgas pueden presentar diferentes metabolismos de acuerdo al tipo de fuente de carbono y de energía que utilicen. Se dice que el metabolismo es fotoautotrófico conocido también como autotrófo cuando utilizan la luz como fuente de energía y CO₂ como fuente de carbono para obtener energía química a través de la fotosíntesis. Cuando el metabolismo es heterotrófico el crecimiento

es en ausencia de luz y utilizan sólo compuestos orgánicos como fuente de energía y de carbono, este tipo de metabolismo puede acelerar la tasa de crecimiento, aumentar la biomasa, acumular más lípidos en comparación con el metabolismo autótrofo, incluso puede integrarse con tratamiento de aguas residuales, cuando se trata de metabolismo mixótrofico, las células microalgales utilizan carbono orgánico e inorgánico como fuente de carbono, la luz y el carbono orgánico son su fuente de energía, combinando las ventajas de la autotrofia y heterotrofia, superando sus desventajas. Los factores que influyen en el crecimiento microalgal son la disponibilidad de nutrientes, relación C:N, penetración de luz, fuente de carbono, pH, salinidad y temperatura [67].

En casi todos los ambientes acuáticos las microalgas habitan junto con bacterias, son de vital importancia en el ciclo de nutrientes y el flujo de energía, el concepto de anillo microbiano plantea la importancia de la interacción microalga-bacteria como componentes básicos de un ecosistema, proponiendo a las bacterias como recicladoras de materia orgánica, además de absorber nutrientes desde el océano y circular fuentes de carbono mediante diversas actividades ecológicas con componentes del plancton [71].

Además, son muy versátiles por su contenido en lípidos (ácido linoleico, araquidónico, eicosapentaenoico, docosahexaenoicos), pigmentos (carotenoides, ficobiliproteínas), vitaminas (A, E, biotina) [7]. Debido a esto sus aplicaciones pueden ser energéticas farmacológicas y alimenticias, la necesidad de CO₂ para el cultivo de algas abre la posibilidad de utilizar las granjas de cultivo de microalgas como sistemas secuestrantes de anhídrido carbónico beneficiando el medio ambiente.

Los ácidos grasos presentes en las microalgas incluyen moléculas lineales de 12 a 22 átomos de carbono en número par, saturadas e insaturadas. Los ácidos grasos insaturados varían en el número y posición de dobles enlaces en la cadena principal de carbono, el ácido graso monoinsaturado contiene sólo un doble enlace mientras que el ácido graso polinsaturado contiene dos o más dobles enlaces [38], prevaleciendo los ácidos grasos saturados e insaturados en las algas dulciacuícolas.

El crecimiento de un cultivo se puede expresar como el crecimiento de la biomasa, cuantificando el número de células, densidad óptica o peso seco. Una técnica muy utilizada es el conteo celular en cámara de Neubauer, el cual se recomienda para contar algas pequeñas (2 a 30 μm y cultivos de densidades entre 5×10^4 y 5×10^7 cel/mL), la caracterización de la biomasa microalgal es posible por el método de espectroscopía infrarroja [72], o espectrofotometría UV/VIS [73]. Existe una relación entre el crecimiento celular y la densidad óptica, si se establece la relación entre ambas para el cultivo específico, las mediciones podrían realizarse más fácilmente [69].

La determinación de la densidad óptica de *Chlorella vulgaris* se ha realizado de 680-688 nm [74–77]. En un estudio presentado por Arif et al. [40] se realizó la medición de la densidad óptica de las microalgas *Tetradismus dimorphus*, *Tetradismus sp.*, *Chlorella sp.* y *Chlorella sorokiniana* a 680 nm, mientras las mediciones para *Scenedesmus dimorphus* se han realizado a 680 nm [78, 79].

La cosecha de biomasa se realiza dependiendo del tipo de cultivo, ya sea en lote, semicontinuo o continuo, esto se refiere principalmente a remover la mayor cantidad de agua del medio. Los periodos de cosecha son breves, incluso inferiores a 10 días permitiendo cosechar múltiples veces, a diferencia de los cultivos agrícolas que se cosechan una o dos veces por año.

El proceso de cosecha consta de dos pasos, la cosecha a granel y espesamiento. En la primera etapa el cultivo se sedimenta, en la segunda etapa se separa la biomasa del medio de cultivo y se concentra mediante filtración y centrifugación [62, 80]. Otro método para la cosecha de biomasa es realizar una concentración primaria eliminando la mayor parte del medio de cultivo, seguida de una concentración secundaria eliminando el medio de cultivo restante [49]. Otras técnicas de recolección de biomasa son floculación y electrólisis. La ultrafiltración (0.1 a 0.01 μm) y microfiltración (0.1 a 3 μm) son los métodos adecuados para filtrar microalgas hasta con una eficiencia del 95 % [64]. Finalmente, el método de sedimentación es más ampliamente usado por ser una técnica simple y económicamente viable en muchos procesos de producción de microalgas, la tasa de sedimentación depende de la especie de microalga, tamaño y densidad celular. De manera general las microalgas verdes tiene una velocidad

de sedimentación de 0.1 m/día [1]. Una fuerza centrífuga más alta que la fuerza de gravedad separa la biomasa microalgal del medio de cultivo alcanzando eficiencias del 80 al 90% en minutos [64].

La floculación es el proceso en el que las partículas se aglomeran entre sí formando flóculos precedido por la etapa de coagulación donde se desestabilizan las partículas y neutralizan sus cargas para lograr que se atraigan entre sí, una vez formados los flóculos su alta densidad provocará su sedimentación. En los cultivos microalgales las células están cargadas negativamente, por ende se requieren agentes coagulantes de carga positiva, se han utilizado compuestos con los iones metálicos Al^{+3} y Fe^{+3} con la desventaja de la contaminación de la biomasa por lo cual se prefiere el uso de polímeros orgánicos catiónicos como el quitosán y almidón que no contaminan la biomasa. Entre los floculantes que han sido utilizados para *Chlorella vulgaris* se encuentran el quitosano diluido en ácido acético al 1% en dosis de 10 ppm a un pH de 4-9 con 99% de eficiencia, harina de semillas de *moringa oleifera* a dosis de 1g/L con 96% de eficiencia en 4h y 80% en 2h, quitosano 0.12 g/L a pH 6 con 99% de eficiencia, alumbre férrico 160 mg/L a un pH 7.8 con 70% de eficiencia [81], alumbre de potasio 250 mg/L con una eficiencia del 82.10%, la cual incrementó hasta 92.53% en pH 5 [75]. Por otra parte se ha observado la tendencia de algunas microalgas a auto flocularse naturalmente a un pH de 9 o superior, un bajo contenido de CO_2 y un largo tiempo de cultivo provocan la sedimentación de las células, entre ellas *Scenedesmus obliquos*, sin embargo *Chlorella vulgaris* tiene un comportamiento no floculante [64].

El sulfato de aluminio en dosis de 1g/L ha sido utilizado para la precipitación de *Scenedesmus dimorphus* [82].

En la electro floculación al aplicar la corriente eléctrica se forman los flóculos cuando las células se dirigen al ánodo, este procedimiento alcanza hasta el 95% de eficiencia [64]. El método de centrifugación de biomasa requiere un aporte energético que encarece el proceso global de producción del biodiésel, durante una investigación se comparan los métodos de floculación con NaOH, sedimentación y centrifugación, para la cosecha de *Chlamydomonas sp.* concluyendo que la floculación fue el segundo método más rápido (5 días), la adición del floculante NaOH 0.5N a razón de 1 mL disminuyó el contenido de

proteínas y aumentó el contenido de carbohidratos además de atenuar el color del conglomerado, la sedimentación por gravedad requirió mayor tiempo de precipitación debido a sus dimensiones (10 a 20 μm) siendo de 8 días, es decir, que la velocidad de sedimentación está relacionada con la densidad del cultivo y el tamaño de las mismas, la centrifugación se realizó en intervalos de 1-15 min a 4500 rpm, sin diferencias significativas después del minuto 5. La sedimentación gravitacional y centrifugación no registran impactos en el contenido de proteínas y coloración, el método a emplear para la cosecha de la biomasa dependerá de las necesidades del productor.

Debido al tamaño de las microalgas la filtración no es un método fácilmente aplicable para la cosecha de biomasa. Otro método considerado para este objetivo ha sido la floculación con almidón catiónico para flocular microalgas de agua dulce como *Chlorella* y *Scenedesmus*. En otras estimaciones se calcula que el costo de la cosecha varía entre el 20 y 30% del costo de la producción del biodiésel [64].

Generalmente la biomasa microalgal es secada previo a la extracción, ésta etapa constituye casi el 30% de los costos totales de producción del biodiésel, una de las técnicas reportadas es el calentamiento en estufa a 60 °C durante 24 h [83].

2.3. MICROALGAS EN TAMAULIPAS

Se han encontrado y reportado hallazgos de cepas de microalgas en cuerpos de agua de la Zona Conurbada del Sur de Tamaulipas, su presencia indica la capacidad de crecer en dichos ambientes y su adaptación para desarrollarse en las condiciones ambientales [72, 84].

Se reportó el hallazgo de 10 clases de microorganismos y 68 especies, en la laguna del Carpintero ubicada en Cd. Madero [84], seis de ellas del género *Chlorophyceae*, presentes a lo largo de muestreos bimestrales, además de los géneros *Anabaena* y *Microcystis*. Las microalgas encontradas tienen la característica de almacenar lípidos, cabe destacar que las especies *Chlorella vulgaris* y *Desmodesmus*

quadricauda estuvieron presentes todo el año de monitoreo, lo que indica su adaptación al medio ambiente. Además se han encontrado diversas microalgas en la laguna del Champayan en Altamira, por otro lado, en la laguna El Conejo, se encontró la especie *Planktothrix sp.* [85], la proliferación de *Planktothrix sp.* ocurre con mucha frecuencia en los ecosistemas acuáticos eutrofizados [86]. Incluso en aguas residuales industriales se han encontrado especies de microalgas, las cuales se especifican en la Tabla 2.2.

Las proliferaciones densas de cianobacterias se conocen como floraciones de algas, si éstas tienen el potencial de causar efectos nocivos, se denominan Florecimientos Algales Nocivos (FAN) [87], la presencia de *Planktothrix sp.* en la laguna El Conejo es un FAN, entre las toxinas que este género de cianobacteria puede producir se encuentran la anatoxina-a, saxitoxinas y microcistina, en la laguna del carpintero se identificaron los géneros de *Anabaena*, *Cylindrospermopsis* y *Microcystis* [84], capaces de generar las mismas toxinas que *Planktothrix sp.* además de *Cilindrospermopsina*: La anatoxina-a es una neurotoxina de acción rápida, estable en condiciones estériles pero susceptible a la biodegradación microbiana, alta temperatura, luz ultravioleta y condiciones alcalinas, su exposición se da mediante consumo de bebidas o suplementos contaminados y uso recreativo de lagos, los efectos de la intoxicación incluyen pérdida de coordinación muscular, temblores musculares, convulsiones y dificultad respiratoria, no se ha documentado ningún caso de intoxicación humana por anatoxina-a; la saxitoxina es la única toxina cianobacteriana incluida en la lista 1 de la Convención sobre armas químicas, son conocidas como venenos paralizantes de mariscos, estables al calor, en ambientes ácidos y solubles en agua, el grado de intoxicación depende del grado de exposición, se relaciona con la ingesta de toxinas acumuladas en mariscos o pescado provenientes de ambientes marinos o de agua dulce con presencia de floraciones de dinoflagelados o bacterianas, los efectos clínicos varían desde entumecimiento de la boca, garganta hasta extremidades y pueden aparecer a los pocos minutos o hasta las 72 h, han estado implicadas en muchos casos de envenenamiento humano por ingesta de mariscos marinos, sin embargo, no se han documentado casos en ambientes de agua dulce; las microcistinas se producen comúnmente en cuerpos de agua dulce, son capaces de liberarse a las aguas circundantes cuando las células cianobacterianas se desintegran, tienen una vida media ambiental típica de 10 semanas, exposición por actividades recreativas en cuerpos de agua contaminada, incluso por agua

potable o suplementos, no son vulnerables a la fotodegradación, los efectos clínicos dependerán de la ruta y nivel de exposición, presentando inflamación de la piel, sistema respiratorio o gastrointestinal, los efectos tóxicos de *Cilindrospermopsis* en tilapias son daño hepático, renal, cardíaco [86–88].

Tabla 2.2: *Microalgas en la zona conurbada del sur de Tamaulipas*

Especie	Cuerpo de agua	Referencia
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Chlorella vulgaris</i> <i>Desmodesmus denticulatus</i> <i>Desmodesmus quadricauda</i> <i>Scenedesmus bijurgus</i> <i>Scenedesmus sp.</i>	Laguna del carpintero, Cd. Madero	[84]
<i>Planktothrix sp.</i>	Laguna El Conejo, Altamira	[85]
<i>Desmodesmus sp.</i> <i>Chlorella sp.</i> <i>Scenedesmus acuminatus</i>	Laguna Champayan, Altamira	[85]
<i>Chlorella sp.</i> <i>Lagerheima sp.</i> <i>Desmodesmus quadricauda</i> <i>Oscillatoria sp.</i> <i>Scenedesmus dimorphus</i>	Agua Residual Industrial Altamira	[43]
<i>Spirulina subsalsa</i>	Estero del río Barberena, Tampico	[50]

2.3.1. *Scenedesmus dimorphus*

Esta microalga pertenece al reino vegetal, subreino plantas verdes, división *Chlorophyta*- algas verdes, clase *Chlorophyceae*, orden *Sphaeropleales*, familia *Scenedesmaceae*, género *Scenedesmus*, especie *Scenedesmus dimorphus* de acuerdo con el Sistema Integrado de Información Taxonómica [89]. Por otro lado, el Sistema de Información de Diversidad Oceánica afirma que el taxón aceptado para *Scenedesmus dimorphus* es *Tetradasmus dimorphus* [90]. El Centro Nacional de Información Biotecnológica indica que *Tetradasmus dimorphus* es un sinónimo homotípico de *Scenedesmus dimorphus* [91]. En el transcurso de esta investigación sólo un artículo se refiere a la microalga como *Tetradasmus dimorphus*, debido a esto se decidió referirse a ella como *Scenedesmus dimorphus*.

Esta microalga almacena clorofila a, clorofila b, cis- β caroteno, trans- β caroteno, violaxantina y luteína, los pigmentos se pueden obtener en concentraciones variables dependiendo del metabolismo

Tabla 2.3: Nomenclatura de ácidos grasos presentes en aceites vegetales [16, 18, 92].

Nombre	Relación C:Insaturación	Fórmula desarrollada
Ácido Palmítico	(C16:0)	$R = -(CH_2)_{14} - CH_3$
Ácido Esteárico	(C18:0)	$R = -(CH_2)_{16} - CH_3$
Ácido Oleico	(C18:1)	$R = -(CH_2)_7CH = CH(CH_2)_7 - CH_3$
Ácido Linoleico	(C18:2)	$R = -(CH_2)_7CH = CHCH_2CH = CH(CH_2)_4 - CH_3$
Ácido Linolénico	(C18:3)	$R = -(CH_2)_7CH = CHCH_2CH = CHCH_2CH = CHCH_2 - CH_3$
Ácido Eicosapentaenoico	(C20:5)	$R = -CH_2(CH_2CH = CH)_5CH_2CH_2 - CH_3$
Ácido Docosahecanoico	(C22:6)	$R = -CH_2CH_2(CH = CH - CH_2)_6 - CH_3$

de cultivo, la concentración de pigmentos disminuyó en modo mixotrófico cuando se cultivo en BBM con hidrolizado de bagazo de caña, con respecto al modo fotoautotrófico [19]

Entre los lípidos que han sido obtenidos de esta especie figuran los ácidos grasos C16 a C18 principalmente, pudiendo obtenerse también desde C20 a C22 dependiendo de las condiciones de cultivo [36, 42, 82]. En la Tabla 2.3 se muestra la fórmula desarrollada de los ácidos grasos que se presentan en aceites vegetales.

Hasta el momento han sido pocas las investigaciones que se enfocan en la biorremediación de aguas contaminadas, *Scenedesmus dimorphus* ha demostrado ser capaz de reducir las concentraciones de nitrógeno y fósforo total de aguas residuales de la industria de ácido láctico y porcina, en la Tabla 2.4 se resumen los resultados obtenidos de biomasa y metabolitos en cultivos fototróficos y mixotróficos.

2.4. NUTRIENTES Y MEDIO DE CULTIVO

Los cultivos de microalgas se realizan en fotobiorreactores abiertos o cerrados, en diversas condiciones de operación, entre ellas la irradiación, temperatura, agitación, modo de alimentación, así como las concentraciones de medio de cultivo, fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo.

Tabla 2.4: Cultivos de *Scenedesmus dimorphus*

Metabolismo	Medio de cultivo	Luz	Fotoperiodo L:O	Fuente de carbono	Prod. de biomasa g/L	Metabolitos	Remoción de contaminantes	Ref.
Mixotrófico	Agua residual de ácido láctico + 0.8 g/L NaNO ₃ + 4 mg/L H ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	1500 lux	14:10	Ác. láctico	4.51	1.15 g/L lípidos	96.31 % NT, 90.78 % PT, 95.06 % DQO, 98.22 % N-NH ₃ , 90.94 % Ác. láctico	[42]
Mixotrófico	Agua residual de ácido láctico	1500 lux	14:10	Ác. láctico	2.5	1 g/L lípidos		
Mixotrófico	Agua residual de ácido láctico + 0.8 g/L NaNO ₃ + 10 mg/L H ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	1500 lux	14:10	Ác. láctico	4.30			[42]
Fototrófico	BG-11	1500 lux	14:10		3.12	1.04 g/L lípidos		
Mixotrófico	BG-11		12:12	Hidrolizado de orujo de manzana 2% P/V + CO ₂		140.37 mg/L día biomasa		[82]
Fototrófico	BG-11		12:12	CO ₂		96.55 mg/L día biomasa		
Mixotrófico	Agua residual municipal	150 μmol/m ²	16:8			35 % lípidos		[36]

Continúa en la siguiente página...

Tabla 2.4: Continua...

Metabolismo	Medio de cultivo	Luz	Fotoperiodo L:O	Fuente de carbono	Prod. de biomasa g/L	Metabolitos	Remoción de contaminantes	Ref.
Mixotrófico	BBM	120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	16:8	Hidrolizado de bagazo de caña 5g/L + aire 11 L//min	119.25 mg/Ldía biomasa, 34.09% proteína			[19]
Mixotrófico	BBM	120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	16:8	Hidrolizado de bagazo de caña 10g/L + aire 11 L//min	105.92 mg/Ldía biomasa, 34.82% proteína			
Fototrófico	BBM	120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	16:8	aire 11L/min	96.44 mg/Ldía biomasa, 29.62% proteína			[19]

Los nutrientes esenciales son el carbono, nitrógeno y fósforo por orden de prioridad ya que son necesarios en el metabolismo primario y su limitación conduce a la acumulación de lípidos, otros elementos inorgánicos importantes para las microalgas son Fe y en algunos casos Si, el N, P y K son los nutrientes que debe proporcionar el medio de cultivo [8,62].

Existe una amplia gama de medios de cultivo que han sido utilizados así como el microorganismo cultivado, los cuales se resumen en la Tabla 2.5, cada medio de cultivo tiene diferentes concentraciones de nutrientes.

El uso de aguas residuales minimiza la necesidad de agua dulce y nutrientes, reduciendo el costo de producción, el crecimiento de microalgas estará relacionado con la eficiencia de remoción de nutrientes. Se observa que los tratamientos aplicados a aguas residuales utilizadas como medios de cultivo son nulos o sencillos para el cultivo de microalgas ya que el objetivo principal es aprovechar los nutrientes presentes en dicha agua, en la Tabla 2.5 se puede observar el interés en investigar el cultivo de microalgas en aguas residuales de diversas fuentes. Nayak et al. [59] utilizaron agua residual filtrada con un filtro Whatman No.1 para eliminar sólidos grandes seguido de esterilización en autoclave a 121 °C durante 15 min como medio de cultivo. Kudahettige et al. [36] utilizan agua residual municipal filtrada en dos ocasiones con papel de celulosa a una velocidad de 1.3 l/cm²/min sólo para la eliminación de partículas grandes, en otra investigación donde utilizan aguas residuales de una granja de cerdo, rica en estiércol, se realiza la filtración y dilución con agua potable [61]. Sacristan et al. [52] sólo realizaron el cribado y sedimentación del agua residual de una planta de tratamiento de aguas residuales, mientras que Fernández et al. [60] aclaran que el agua residual proveniente del reactor biológico se utilizó sin esterilizar, Paladino et al [56] utilizaron agua residual del lavado de biodiésel, rica en glicerol sin tratamiento previo al cultivo. Por otro lado, Mata et al. [54] reporta el ajuste del pH del agua de mar artificial con nutrientes a un valor de pH 7.7 con la finalidad de mantener el cultivo dentro del rango óptimo 7.5 a 8.5 para *Dunaliella terticolecta*.

Tabla 2.5: Medios de cultivo para microalgas

Medio de Cultivo	Organismo	Año	Referencia
BG-11 + Urea	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	2011	[78]
LC Olivo	<i>Chlorella vulgaris</i>	2013	[93]
Agua de mar artificial con nutrientes	<i>Dunaliella terticolecta</i>	2013	[54]
Nitrofoska	<i>Hyaloraphidium contortum</i> <i>Pseudokirchneriella</i>	2013	[94]
Poliverdol	<i>Hyaloraphidium contortum</i> <i>Pseudokirchneriella</i> <i>subcapitata</i>	2013	[94]
Guillard	<i>Hyaloraphidium contortum</i>	2013	[94]
BBM, 3N-BBM	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	2013	[95]
BG-11	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	2013	[41]
Agua residual cruda PTAR	<i>Chlorella vulgaris</i> <i>Pseudokirchneriella</i> <i>subcapitata</i>	2014	[52]
Agua residual con estiércol porcino	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	2015	[61]
Conway	<i>Chlorella sp</i>	2016	[96]
Conway	<i>Nannochloropsis oculata</i>	2016	[96]
Agua contaminada con petróleo crudo	<i>Chlorella vulgaris</i>	2016	[55]
Agua residual	<i>Scenedesmus sp</i>	2016	[59]
Bold Bassal	<i>Chlorella protothecoides</i>	2017	[63]
Bold Bassal	<i>Scenedesmus sp</i>	2017	[63]
Borowitzka	<i>Dunaliella salina</i>	2017	[69]
Agua residual (reactor biológico)	<i>Chlorella vulgaris</i>	2017	[60]
Agua residual (reactor biológico)+Bayfolan	<i>Chlorella vulgaris</i>	2017	[60]
3N-BBM	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	2017	[97]
BBM	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	2018	[36]
Bristol	<i>Chlorella vulgaris</i>	2018	[98]
BG-11	<i>Chlorella sorokiniana</i>	2020	[99]
BBM 3N	<i>Chlorella vulgaris</i>	2020	[76]
BBM	<i>Scenedesmus</i>	2020	[73]
BG-11	<i>Scenedesmus sp</i>	2020	[79]
Agua residual rica en glicerol y CO ₂	<i>Chlorella vulgaris</i>	2021	[56]
Agua residual de ácido lactico + traza (Na,K,Mg)	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	2021	[42]

2.4.1. Carbono

Los cultivos fototróficos sólo requieren carbono inorgánico (CO_2), mientras que en mixotrofia conocida también como fotoheterotrofia se consume CO_2 y carbono orgánico del medio de cultivo, los cultivos mixotróficos presentan mayor producción de biomasa, además de un aumento en el contenido de lípidos y pigmentos en las células [45], este tipo de metabolismo puede usar fuentes orgánicas, inorgánica y luz en diferentes combinaciones [100]. Una disminución significativa del carbono orgánico total confirma el metabolismo mixotrófico [101].

La fuente de carbono apropiada es determinada por el metabolismo predominante de las microalgas, las cuales pueden ser orgánicas (glucosa, acetato, glicerol, fructosa, galactosa, manosa, peptona, ácido acético) o inorgánicas CO_2 , NaHCO_3 . El CO_2 proveniente de gases de combustión se ha utilizado mezclado con aire en concentraciones del 5 al 30% V/V, la tasa de transferencia de masa de este gas esta limitada por su disolución en el agua, el CO_2 debe reaccionar con el agua para formar H_2CO_3 , el cual se puede ionizar en bicarbonato y/o carbonato dependiendo del pH y así ser aprovechado por las microalgas [49].

A través del proceso de fotosíntesis se convertirá el CO_2 en moléculas orgánicas tales como carbohidratos, proteínas y lípidos [64]. Regularmente el CO_2 se alimenta en una mezcla aire- CO_2 que no rebasa el 10% V/V [102], otras relaciones utilizadas han sido 0.5 vvm (volumen de gas por volumen de trabajo por minuto) [99]. En condiciones mixotróficas las microalgas pueden consumir carbono de aguas residuales, sin embargo, para utilizar aguas residuales como medio de cultivo deben contener un perfil de nutrientes adecuado, la asimilación de nitrógeno y fósforo esta influenciada por la relación N/F [1]. La evidencia de un crecimiento mixotrófico se tiene con la disminución significativa del carbono orgánico total, ya que confirma el metabolismo mixotrófico [101].

La capacidad de almacenamiento del CO_2 y contenido celular de lípidos en las microalgas depende de la especie, el aprovechamiento del CO_2 residual industrial en el cultivo masivo de microalgas en

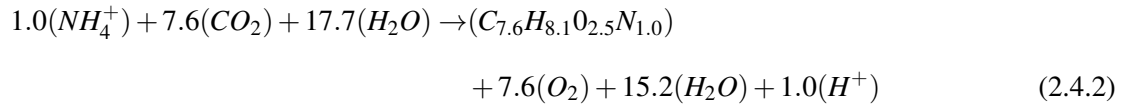
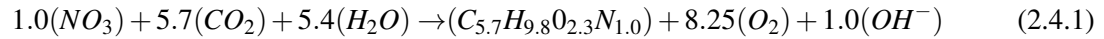
estanques permitiría la reducción de una fuente de contaminación ambiental y la reducción de los costos de producción de biomasa algal [64]. La relación carbono a nitrógeno C/N y la especie de microorganismo influyen en la acumulación de lípidos [103].

2.4.2. Nitrógeno

Diferentes concentraciones de la misma fuente de nitrógeno afectan la biomasa y contenido de lípidos, debido a que el elemento es esencial para la síntesis de aminoácidos en las células, que forman las proteínas, además de la formación de ácidos nucleicos, estos compuestos son los responsables del crecimiento y reproducción de las células [42, 49]. La urea ha sido utilizada como fuente de nitrógeno en el cultivo de *Scenedesmus dimorphus* [78].

En el agua puede encontrarse en forma de N_2 , NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- y algunos compuestos orgánicos nitrogenados. En la forma de amonio el nitrógeno es aceptado en las vías metabólicas de las microalgas, a diferencia del nitrato que requiere la transformación a nitrito y posteriormente amonio, requiriendo energía para la reducción [71].

Este es un elemento importante en el crecimiento de microalgas ya que actúa como regulador de la síntesis de proteínas y producción de metabolitos, la captación del nitrógeno dependerá de la especie de microalga. La absorción de nitrógeno incrementa el pH e influye en el crecimiento microalgal, teóricamente un mol asimilado produce un mol de hidroxilo, acorde a la Ecuación 2.4.1, por otra parte un mol de amonio produce un hidrón tal como se muestra en la Ecuación 2.4.2 [64].



Debido a la adición y absorción de nutrientes el pH debe ser monitoreado y ajustado, el aumento de la masa de algas, consumo de CO₂ y nitrato incrementan el pH, mientras que la disminución de biomasa debido a la respiración oscura y liberación de CO₂, así como la captación de amoníaco provocan la disminución del pH [104]. Arif et al. [40] reporta que el aumento regular del pH en el periodo de cultivo de la microalga *Tetradismus dimorphus* indica que tiene una alta actividad fotosintética y producción de biomasa. Un pH de 6 impide el crecimiento de las microalgas además se ha observado la inhibición del crecimiento cuando el pH es superior a 10-11 [64]. Generalmente el pH óptimo para la acumulación de lípidos varia entre 5.5 y 9 [103]. Ayatollahi et al. [76] afirma que en crecimiento fototrófico aereado con CO₂ atmosférico se presenta bajo crecimiento en un rango de pH entre 7 a 9.

La asimilación del nitrógeno ocasiona un flujo de carbono, desde carbohidratos a aminoácidos. En ausencia de fotosíntesis, la asimilación de carbono catabolizando carbohidratos para sintetizar aminoácidos, tanto el almidón como la sacarosa pueden ser una fuente de carbono, en las microalgas como organismos fotosintéticos, la asimilación del carbono se reparte entre la síntesis de carbohidratos y aminoácidos, regulado hacia una u otra vía mediante enzimas claves de ambas rutas, como respuesta a la luz y disponibilidad de carbono y nitrógeno [71].

Uno de los elementos que participa en el metabolismo de absorción del nitrógeno es el magnesio, también participa en el metabolismo del oxígeno, en la fotosíntesis y formación de clorofila [42].

2.4.3. Fósforo

Es el tercer nutriente esencial en el cultivo de microalgas, indispensable para el crecimiento y su reproducción. En un medio acuático el fósforo total es la suma de los compuestos orgánicos e inorgánicos de fósforo disueltos así como las partículas suspendidas de fósforo orgánico. La tasa de crecimiento algal determina la cantidad disponible de fosfatos, una limitación de fósforo ocasiona una limitación en la síntesis de ácidos nucleicos a nivel de replicación del genoma o bien a nivel de síntesis de RNA. Sin embargo, debe estar presente en la cantidad adecuada, en el caso del cultivo de *Scenedesmus dimorphus* un incremento en la dosis de 4 mg/L a 10 mg/L de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ inhibió el crecimiento de la microalga de 5 g/L a 4.3 g/L [42].

Es un elemento esencial que se incorpora a las microalgas a través de la fosforilación, es esencial para el metabolismo energético, en consecuencia los cultivos son capaces de eliminar el fósforo del medio de cultivo [57]

2.4.4. Luz

La luz es radiación electromagnética, se puede describir como fotones conocidos como cuantos de luz y como ondas, entre las fuentes de luz se encuentra el sol, lámparas LED y bombillas fluorescentes, las cuales tienen una intensidad única que depende de la longitud de onda (λ) [105]. La energía solar recibida influye sobre la actividad fotosintética, así como la composición de la microalga, es un factor clave en el crecimiento celular, estos microorganismos fotosintéticos fijan CO_2 en azúcares en presencia de energía de fotones [80], debe tenerse en cuenta que la sobreexposición puede causar fotoinhibición, es decir, la inhibición del crecimiento como consecuencia de los fotones recibidos se conoce también como daño oxidativo o muerte celular.

La radiación solar se recibe en distintas longitudes de onda, siendo de interés especial la luz visible, $400 < \lambda < 700$ nm, conocida como PAR o radiación fotosintéticamente activa por ser la utilizada en la fotosíntesis, se estima que sólo el 50% de la radiación solar recibida se encuentra en este rango [106]. La luz es un factor limitante en el crecimiento microalgal, si la intensidad es baja la respiración celular consume los compuestos con alto contenido de carbono y no se acumula nueva biomasa [105]. El fotoperiodo es el ciclo de luz/oscuridad (L/D), tiene un efecto sobre la síntesis de compuestos orgánicos y el metabolismo de nutrientes [100], por lo que en caso de utilizar luz natural, su aprovechamiento queda determinado por la zona geográfica y la estación del año [102]. Las variaciones en la radiación solar producen variaciones en la tasa de fotosíntesis y por lo tanto la tasa de aumento del pH [107].

Debido al gradiente de luz dentro del fotobiorreactor (FBR), las algas están expuestas a diferentes microambientes en su interior, desde la iluminación en la superficie hasta la oscuridad al centro, las microalgas están expuestas a ciclos de luz/oscuridad cíclicos [106], por otro lado, se pueden presentar efectos de sombra debidos al crecimiento de células o aumento de la densidad celular, que disminuyen la intensidad lumínica al centro del reactor creando una zona oscura, generándose un decrecimiento celular en estas zonas y una sobreexposición lumínica en las paredes del reactor [108]. Este fenómeno se puede prevenir al agitar el medio de cultivo y homogeneizar las diferentes zonas que se forman en el fotobiorreactor, incrementando los ciclos de luz oscuridad y por ende el crecimiento celular.

Con la finalidad de minimizar los costos de producción de biocombustibles a partir de microalgas, la fuente de luz debe ser solar de libre acceso a pesar de las variaciones de horario y estacionales, se estima que un 25% de la biomasa producida durante el día puede perderse durante la noche por la respiración, la pérdida varía en función del nivel de luz en el día, temperatura de crecimiento y la temperatura de la noche [34].

2.4.5. Temperatura

Se ha reportado que las temperaturas óptimas para el cultivo de microalgas oscila entre 20 y 24 °C, temperaturas inferiores a 16 °C disminuyen el crecimiento del cultivo y las temperaturas superiores a 35 °C resultan ser letales [109]. Las temperaturas mínimas y máximas de la zona de cultivo se muestran en la Tabla 3.5, observándose que sólo en una ocasión en enero 2014 se registró una temperatura mínima de 14.48 °C, los meses de enero, febrero, marzo, noviembre y diciembre son los que muestran temperaturas más bajas, pero superiores a 16 °C, en cuanto a las temperaturas superiores la máxima registrada corresponde al mes de junio en 2012 con 30.71 °C. El rango de temperaturas de la zona de cultivo se encuentra dentro de las temperaturas que permiten el cultivo de las microalgas. Sin embargo, toda la luz absorbida por el FBR que no es utilizada para la fotosíntesis se convierte en energía térmica para dar lugar a un aumento de temperatura del cultivo [110].

2.4.6. Agitación

La agitación del medio de cultivo es importante por varias razones, la principal es dispersar los nutrientes y las células para evitar su sedimentación, si ocurre la deposición de células en los fotobiorreactores se denominan zonas muertas, la acumulación de este material orgánico ocasiona su descomposición anaeróbica y en consecuencia la liberación de sustancias y metabolitos indeseados, que pueden alterar las condiciones del cultivo y dirigir el metabolismo hacia rutas no previstas, la agitación aumenta las tasas de transferencia de masa entre las células y el medio de cultivo, que sirve para la asimilación de nutrientes y exudación de metabolitos, además de movilizar las células en un gradiente ópticamente denso con variaciones en la calidad y cantidad de luz, así como facilitar la transferencia de calor y evitar la sobreexposición térmica, mejorar el intercambio de gases entre el medio de cultivo y la fase aérea [106, 111]. Se ha utilizado la agitación mecánica y aireación en los fotobiorreactores, con sus respectivos inconvenientes, la excesiva agitación mecánica causa muerte celular, en la aireación estamos agregando oxígeno al cultivo, un exceso del mismo inhibe el crecimiento de las microalgas.

2.4.7. Condiciones de operación de fotobiorreactores

El cultivo de microalgas se realiza en sistemas abiertos o cerrados, un sistema abierto presenta un costo inferior y facilidad de operación, sin embargo, se presenta una evaporación excesiva del medio de cultivo, así como un mayor riesgo de contaminación [112–114], además de que dependen de las condiciones climáticas [45], disponibilidad de luz solar, intensidad de luz y temperatura [115], una de las principales desventajas que presentan es que son propensas a numerosas tensiones abióticas y bióticas, que provocan frecuentes pérdidas de productividad [116].

Los sistemas cerrados utilizan biorreactores o fotobiorreactores para cultivos de microalgas heterótrofas y fototróficas respectivamente [117], presentan distintas configuraciones geométricas, un riesgo mínimo de contaminación, menores áreas por unidad de volumen, una mayor productividad y mejor control sobre las variables de operación, requieren subsistemas de control de gases O_2 y CO_2 , de temperatura, pH, adición de nutrientes e iluminación artificial [118], debido a esto presentan costos de operación más elevados.

En la producción de biomasa se han utilizado diversos tipos de fotobiorreactores, entre las características que debe cumplir un biorreactor ideal se encuentra el distribuir uniformemente las células en el volumen del cultivo, mantener constante y homogénea la temperatura, minimizar los gradientes de concentración de nutrientes, mantener el cultivo puro, ambiente aséptico, maximizar el rendimiento y la producción, minimizar el gasto y los costos de producción, reducir al máximo los tiempos del proceso. Los fotobiorreactores (FBR) tienen diferentes configuraciones con distintas ventajas y desventajas, las cuales se muestran en la Tabla 2.6.

Entre las características que deben cumplir los materiales de construcción se encuentran la alta transparencia, alta fuerza mecánica, carencia de toxicidad, durabilidad, estabilidad química, facilidad de limpieza y bajo costo como el polietileno y polipropileno, por ejemplo, el vidrio es una opción que presenta altos costos de instalación y fragilidad frente a la resistencia química, transparencia y durabili-

Tabla 2.6: *Sistemas de cultivo microalgal*

Sistema	Ventajas	Desventajas	Referencia
Abiertos	Costo inferior	Evaporación excesiva	[113]
	Facilidad de operación	Riesgo de contaminación	[45]
Cerrados	Heterótrofico o Fototrófico	Dependen de las condiciones climáticas	[117]
	Distintas configuraciones geométricas	Requiere subsistemas de control	[118]
	Riesgo mínimo de contaminación	Adición de nutrientes	
	Menores áreas por unidad de volumen	Iluminación artificial	
	Mayor productividad	Mayor costo de operación	
	Control en las variables de operación		

dad, mientras que las bolsas de polietileno presentan transparencia, bajo costo y esterilidad, además se puede utilizar PVC y acrílico con un espesor de 5 mm, polimetilmetacrilato o plexiglas [106, 119].

Chlorella vulgaris ha sido cultivada en FBR tubular fabricado en polimetilmetacrilato con capacidad de 50 L, operando en semilotes con una proporción de reemplazo del 50% en condiciones interiores y exteriores, presentando una productividad de 2.35 a 2.38 g/L con medio de cultivo rico en urea [115]. En otra investigación esta misma cepa fue cultivada en FBR de transporte aéreo de bucle externo, fabricado en polimetilmetacrilato y tubos de cloruro de polivinilo con capacidad de 10.5 L, operado en condiciones exteriores con productividades de 1.5 a 1.6 g/L en aguas residuales ricas en glicerol y CO₂ [56]. La cepa *Scenedesmus dimorphus* ha sido cultivada en FBR de vidrio de capa plana y cilindricos, así como bolsas de polietileno con éxito [36,41,61].

2.5. APLICACIONES DE LA BIOMASA

La biomasa de microalgas es una fuente alternativa para la producción de biocombustibles, es decir, combustibles que tienen su origen en la biomasa, en la materia orgánica vegetal o animal que no ha sufrido procesos de mineralización. La biomasa se divide en primaria, secundaria y terciaria.

- Primera generación: son los obtenidos mediante la transformación de los cultivos alimenticios: maíz, caña de azúcar, sorgo y remolacha para la generación de bioetanol, soya y girasol para la obtención de biodiésel [120], la obtención de estos biocombustibles de primera generación se asocia a la afectación de los precios de algunos alimentos.
- Segunda generación: son obtenidos de la biomasa secundaria o de materias primas que no tienen uso alimenticio, por ejemplo; bagazo de caña de azúcar y residuos forestales para la obtención de bioetanol y *Jatropha curcas* para la obtención de biodiésel [120].
- Tercera generación: son obtenidos de materia prima no proveniente del cultivo alimenticio o residuos, por lo tanto, los biocombustibles obtenidos de aceites de microalgas serían de tercera generación [121].

La investigación para mejorar los procesos de producción de biocombustibles debe enfocarse en fuentes renovables que no compitan con el sector alimenticio [122]. El interés principal en el estudio de las microalgas es su tasa de duplicación, la cual varía de 3.5 h a 24 h, resultando en una alta tasa de crecimiento y alto rendimiento de biomasa en cortos periodos de tiempo [8, 34, 64, 123]. Estos organismos fotosintéticos autótrofos y células individuales pueden alcanzar un alto contenido de lípidos, en algunas cepas la concentración de lípidos fluctúa del 20 al 50% del peso seco [72, 123]. Crecen 100 veces más rápido que las plantas alcanzando un rendimiento de biomasa de 15 a 25 t/ha/acre, mayor al de la soya (0.4 t/ha/acre), colza(0.68 t/ha/acre), palma aceitera (3.62 t/ha/acre) e incluso mayor que *Jatropha* (4.14 t/ha/acre) [64]. Se estima que el rendimiento por unidad de área de aceite de algas es de 20,000 a 80,000 litros por acre por año, es decir, de 7 a 31 veces mayor que el rendimiento del cultivo de aceite de palma [121, 124].

Para la producción de biodiésel se prefieren las microalgas ricas en lípidos polares y neutros, como *Chlorella vulgaris* y *Chlorella protothecoides*, el porcentaje de lípidos contenidos en la microalga varía en cada especie, en la Tabla 2.7 se presenta el contenido de lípidos y carbohidratos de algunas especies de microalgas.

Tabla 2.7: Contenido de lípidos y carbohidratos de microalgas

Microalga	Lípidos (% PS)	Carbohidratos (% PS)	Referencia
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	21	17	[125]
<i>Lagerheimia sp.</i>			[72]
<i>Coelastrum microporum</i>	25		[126]
<i>Chlorella sp.</i>	28-32		[127]
<i>Chlorella vulgaris</i>	36-48		[101]
		12-17	[125, 128]
<i>Chlorella minutissima</i>	31	42	[129]
<i>Scenedesmus sp.</i>	19.6 21.1		[130]
	31		[131]
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	10.23	22.9	[132]
<i>Scenedesmus obliquus</i>	12-14	10-17	[125]

Los lípidos se encuentran encapsulados por una pared celular rígida compuesta de carbohidratos y proteínas por lo cual la disrupción o lisis de la pared celular es necesaria, puede realizarse mediante métodos mecánicos y no mecánicos. Entre ellos se encuentra la aplicación de fuerzas de corte sólido (molienda de cuentas, homogeneización a alta velocidad), fuerzas de cizallamiento de líquidos (homogeneización a alta presión y ultrasonido), además de microondas y campo eléctrico pulsado (electroporación), los métodos no mecánicos abarcan los métodos químicos (tratamientos con ácidos, bases, sales metálicas, metales de transición, oxidación, surfactantes, solventes, fluidos supercríticos, líquidos iónicos) y biológicos (tratamientos con hongos, bacterias y enzimas), así como la aplicación de calor (termólisis y autoclave), además de shock osmótico [64, 103, 133]. Debido a la diversidad de estructuras de las paredes celulares de las microalgas, características de lípidos, los métodos de extracción funcionan de diferente manera en las especies de microalgas [131].

En las células de *Nannochloropsis oculata* como paso previo a la extracción con solventes, se utilizó la trituración como tratamiento mecánico [44] y el tratamiento con microondas [134]; por otra parte Teo et al. [135] utilizaron una combinación de microondas y sonicación para la ruptura de la pared celular y extracelular de la microalga *Nannochloropsis oculata*, sometiénola a las microondas a 100 °C, 2450 MHz durante 5 min, posteriormente se disuelve en una mezcla cloroformo:metanol 2:1, agregando lisozima al 1 % P/V, por último, se somete a sonicación durante 10 min a 4 °C, pulso 0.7, amplitud 5 % por lapsos de 2 min, para asegurar la lisis completa de la pared celular. En otra investigación se utilizó

la molienda con cuentas a 6.5 m/s durante 30 min en ciclos de 3 min con descanso de 5 min, seguido de extracción con cloroformo: metanol (2:1 V/V) [101].

Araujo et al. [83] evaluó cinco métodos de extracción de lípidos de la microalga *Chlorella vulgaris*, Bligh y Dyer, Chen, Folch, Radin y Soxhlet, concluyendo que el método Bligh y Dyer asistido por ultrasonido fue el más eficiente para esta especie, permitiendo obtener el 52.2% p/p, esto se atribuye a la interrupción de la pared celular causada por la cavitación y al solvente cloroformo, que puede debilitarla, contribuyendo así a una mayor extracción. En otra investigación se probaron los métodos de extracción de lípidos con agua caliente catalizada con ácido, microondas, Bligh y Dyer, tratamiento asistido con ultrasonido y microondas, este último presentó mayor rendimiento lípidico en condiciones de biomasa húmeda, las variables de operación reportadas fueron 14 ml de solvente (cloroformo:metanol, 1:4, p/v) por cada 100 gr de biomasa, 2 min de sonicación a 40 kHz, seguido del tratamiento en microondas a 90 °C durante 4 min, obteniendo un rendimiento del 70.86% [136].

Lee et al. [137], investigaron el método más conveniente para la disrupción celular de las microalgas *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus sp.* y *Botryococcus sp.*, comparando la esterilización en autoclave (125 °C, 1.5 MPa, 5 min), tratamiento mecánico en molino de bolas (0.1 mm de diámetro, 2800 rpm, 5 min), microondas (100 °C, 2450 MHz, 5 min) sonicación (10 kHz, 5 min) y choque osmótico con NaCl al 10% con vórtice durante 1 min, durante 48 h, de una alícuota de 5 gr de biomasa con 100 mL de agua destilada, extrayendo posteriormente los lípidos con una mezcla de cloroformo:metanol, reportando un mayor contenido de lípidos cuando la disrupción se realiza mediante microondas para las tres especies de microalgas. Por otro lado, se reporta la lisis de *Scenedesmus* en una proporción 1:10 gr/ml de biomasa seca:agua en un digestor de microondas a 95 °C durante 40 min, la solución digerida se mezcla con hexano 50:50, se agita a 1500 rpm durante 15 min y se filtra, la capa de hexano contiene el aceite y se obtiene mediante destilación, obteniendo un rendimiento del 20.8% [73].

Neto et al. [138] investigó la eficiencia de la extracción de lípidos con solventes bajo ultrasonido, destacando que dicha irradiación ultrasónica es necesaria para interrumpir la pared celular de la microalga y liberar el contenido interno en el solvente, por otro lado, Shah et al. [67] reportó que el

ultrasonido rompe las paredes celulares permitiendo a los solventes orgánicos extraer los ácidos grasos al medio.

Los tratamientos de disrupción celular son seguidos de un método de extracción de lípidos. Entre los más utilizados se encuentran las extracciones con distintos solventes químicos, el método Soxhlet, Folch y Bligh & Dyer. Una baja proporción de disolventes con respecto a la muestra reduce la cantidad de lípidos obtenibles, una relación 1:20 muestra:solventes sin adición de agua, asegura la extracción completa de los lípidos y evita las impurezas que arrastra el agua en los procesos Floch y Bligh & Dyer [70].

El método Soxhlet con hexano durante 4 h es el más popular para extracción de lípidos [139]. Se ha utilizado el método Soxhlet para la extracción de los lípidos de *Chlorella vulgaris* a 85 °C durante 72 h, con la mezcla de cloroformo:metanol (2:1) en una relación de 300 ml por cada 10 gr de biomasa seca [140], por otro lado, se ha realizado utilizando la relación molar 1:10 biomasa:disolventes durante 8 horas con pretratamiento en microondas, con una eficiencia de extracción del 22.68% [75]. La extracción asistida por microondas es otro de los métodos que ha sido aplicado con n-hexano durante 15 min a 1500 rpm, seguido de filtración y destilación para la extracción de aceites de un consorcio de *Scenedesmus dimorphus*, *S. obliquus* y *S. quadricauda* [73].

Otra técnica utilizada es la combinación de la extracción con solventes y sonicación, Sacristan et al. [52] extrae los lípidos de *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus acutus* y *Arthrospira maxima* utilizando una mezcla de cloroformo:metanol, 2:1 y sonicación de 25 W durante 1 min. Por otro lado, se reportó la aplicación de ultrasonido intermitente 200 W, 10 s, 40 repeticiones, a 100 mL del cultivo de *Nannochloropsis oculata*, las células rotas se mezclaron con hexano en un agitador durante 45 min, posteriormente se centrifugó para formar dos capas, la capa de hexano contenía el aceite de microalgas y se obtuvo mediante el proceso de evaporación [141]. También se ha aplicado el método Bligh & Dyer modificado para la extracción de aceite de *Chlorella vulgaris*, mezclando 1 g de biomasa seca con 7.5 mL de agua y 30 mL de solventes cloroformo:metanol (1:2 V/V), la mezcla se homogeneizó con agitador magnético durante 10 min, se añaden 10 mL de cloroformo y 5 mL de agua destilada,

finalmente se forman dos fases, la mezcla se separa con filtros de fibra de vidrio de 0.45 μm , el cloroformo se elimina en rotaevaporador [55].

La extracción líquido-líquido es otro método que ha sido aplicado a la biomasa seca de *Chlorella vulgaris*, utilizando etanol, agua y hexano en una relación 10gr:1:0.6:0.3, los lípidos polares se concentraron en la capa de hexano mientras que los no polares se concentraron en la capa de agua-etanol [4].

Recientemente Zhou et al. [44] investigaron el uso de CO_2 en condiciones supercríticas, el gas penetra en la pared celular a través de la membrana hacia el citoplasma, solubiliza los ácidos grasos envolviéndolos y retornando combinados hacia la fase de scCO_2 en masa debido al gradiente de concentración. El tamaño de partícula o tamaño celular es de vital importancia, a menor número de malla mejor rendimiento de extracción, bajo las condiciones de 20 g de algas malla 40, 60 °C, 20 MPa, flujo de CO_2 2 L/min, el rendimiento de extracción fue de 63.5 %.

No se encontró información específica de la ruptura celular de la microalga *Scenedesmus dimorphus*, pero se destaca que una de las mejores técnicas es la extracción con solventes asistida con microondas o ultrasonido.

Los aceites de microalgas pueden contener altos niveles de fósforo de fosfolípidos, nitrógeno de proteínas y magnesio de la clorofila [114].

Todo proceso tiene un residuo, en el caso de la extracción de aceite, obtenemos biomasa residual impregnada de solventes combustibles, utilizarla en otras aplicaciones disminuiría la huella ecológica del proceso. En la Tabla 2.8 se muestra un resumen de los solventes utilizados en los métodos de extracción de aceites así como su afinidad a los lípidos neutros, polares o ácidos grasos, cabe destacar que los triglicéridos son lípidos no polares, los solventes éter de petróleo y éter etílico tienen afinidad por los triglicéridos.

Tabla 2.8: Métodos de extracción de aceites

Método	Solvente	Afinidad
Soxhlet	Cloroformo al 98 %	
	Éter de petróleo	no polar
	Éter etílico	no polar
	Hexano	neutro
	Hexano-Isopropanol	ácidos grasos
	Diclorometano-Hexano	lípidos totales
	Diclorometano-Metanol	neutro
	Hexano-Etanol	ácidos grasos
Folch	Solvente apolar	polares y no polares
Bligh&Dryer	Metanol-Cloroformo	

Alternativas de producción de biodiésel a partir de microalgas como materia prima, es la utilización de condiciones supercríticas de operación, la transesterificación directa y la transesterificación *in situ* de microalgas húmedas además del efecto de diferentes tipos de catálisis, en la Tabla 2.9 se puede observar los tratamientos que han sido probados en diferentes especies de microalgas.

Cao et al. [145] investigaron la posibilidad de evitar los pasos de deshidratación de la biomasa y la extracción de sus lípidos proponiendo un método de transesterificación *in situ*, reaccionando la biomasa húmeda de *Chlorella pyrenoidosa* con metanol, n-hexano, H₂SO₄ a 150 °C durante 120 min, obteniendo un rendimiento de 82.1 % de biodiésel con un contenido de 90.56 % de FAME , observaron que a mayor contenido de agua el rendimiento de biodiésel disminuye, la ventaja de esta alternativa es la disminución de los requerimientos energéticos para la producción del biodiésel.

Macias et al. [143] realizan la transesterificación directa de los lípidos saponificables de 252 g de la microalga *Nannochloropsis gaditana* con 75 % de humedad y 11.1 % en peso de lípidos saponificables con 171.1 mL/g de metanol y 5 % V/V de cloruro de acetilo como catalizador a 100 °C, 200 rpm, 2.5 atm durante 105 min, seguido de la extracción con hexano en evaporador rotatorio con atmósfera de nitrógeno a 45 °C para la separación del biodiésel crudo, con un rendimiento del 100 % de conversión de los lípidos saponificables a biodiésel.

Tabla 2.9: Procesos de producción de biodiésel a partir de microalgas

Microalga	Proceso	Rendimiento	Referencia
<i>Nannochloropsis sp.</i>	Transesterificación extractiva asistida por microondas	80.1 %	[142]
	Transesterificación con etanol supercrítico	84.1 %	[134]
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	Transesterificación directa	100 %	[143]
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Transesterificación heterogénea con ZnO:Mn ⁺² encapsulado en PEG ¹	87.5 %	[141]
<i>Chrysophyta</i>	Transesterificación supercrítica con metanol SC y CO ₂ como solvente	56.3 %	[44]
<i>Chlorella sp.</i>	Transesterificación extractiva	81.45 %	[144]
	Transesterificación supercrítica con metanol SC y CO ₂ como solvente	63.7 %	[44]
<i>Chlorella vulgaris</i>	Transesterificación <i>in situ</i>	94.6 %	[140]
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Transesterificación <i>insitu</i>	86.8 %	[145]
<i>Scenedesmus sp.</i>	Transesterificación directa catalizada por enzimas	92 %	[146]

Sivaramakrishnan et al. [146] investigó la transesterificación directa de la microalga *Scenedesmus sp.* con carbonato de dimetilo (DMC) y la lipasa (Lipozyme-Novozyme CAL-B de *Candida antarctica*, Novozymes Dinamarca) inmovilizada en Celite (marca comercial de diatomeas), con el 1 % de agua durante 36 h a 50 °C, agitando a 180 rpm obteniéndose un rendimiento del 92 %, previo a la síntesis, se lleva a cabo un proceso de disrupción celular con ultrasonido, el uso de la lipasa en este proceso mostró un rendimiento del 90 % hasta el quinto ciclo, además este proceso genera como subproducto el glicerol carbonato. La biomasa residual de este proceso fue sometida a extracción de azúcares mediante un pretratamiento básico y ácido en autoclave a 121 °C y 15 psi durante 20 min, con NaOH 0.3 N se obtuvo un rendimiento del 82 %, y con H₂SO₄ 0.3 N se obtuvo 92 % de rendimiento, una vez obtenidos los azúcares se puede realizar una fermentación alcohólica para la obtención de bioetanol.

Otro de los métodos alternativos, considera el uso de metanol supercrítico acoplado a la extracción de aceite con CO₂ en condiciones supercríticas, para el caso de la producción de biodiésel a partir de *Chlorella sp.* y *Chrysophyta* en las condiciones de CO₂ a 60 °C, 18-20 Mpa, Hexano 0.4 mL/min, CO₂ 0.5 mil/min y reacción a 340 °C, 18-20 MPa, relación molar de 84:1 metanol:aceite durante

20 min se obtiene un rendimiento de 63.78 % y 56.31 % respectivamente, la ventaja de este proceso es la utilización de los residuos de extracción en la producción de medicamentos debido a que los carbohidratos, oligoelementos y minerales no se dañan en el proceso y pueden ser separados fácilmente del CO₂ mediante descompresión [44]. El método de metanol supercrítico no catalítico produce un biodiésel de alta calidad, térmicamente estable a partir de biomasa húmeda de *Nannochloropsis sp.* con una relación 1:9 biomasa:metanol (P/V), donde el alcohol además de reactivo para la transesterificación funciona como solvente para la extracción de los aceites. La reacción se realizó a 225 °C durante 25 min, obteniendo un rendimiento de 84.15 % de FAME [134]. En condiciones supercríticas mediadas por microondas de transesterificación con etanol sin catalizador para la obtención de FAEE a partir de la microalga *Nannochloropsis salina*. Patil et al. [147], reportaron como condiciones óptimas una relación de algas húmedas/etanol de 1:9 P/V durante 25 min a 260 °C, en un rango de 65 a 85 bar alcanzando un rendimiento de 30.9 %, basado en los rendimientos de metanol y etanol supercríticos no catalíticos, se puede observar que para dos especies de *Nannochloropsis* se obtuvieron mejores resultados con el metanol supercrítico.

Patil et al. [134] investigan el rendimiento de una extracción simultánea asistida por microondas y la reacción de transesterificación de la microalga *Nannochloropsis sp.* con una relación de biomasa:metanol de 1:12 (P/V), KOH 2 %P, 4-5 min y 60 - 64 °C obteniendo el rendimiento de 80.13 % de FAME, esta alternativa es un proceso fácil, rápido y eficiente con un menor requerimiento de energía.

Por otro lado, también ha sido investigada la producción de biodiésel utilizando el aceite ya extraído de las microalgas variando las variables del proceso de transesterificación, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.10.

Tabla 2.10: Aceites de microalgas utilizados en el proceso de transesterificación para producción de biodiésel

Materia Prima	Relación Molar	Alcohol	Catálisis	Condiciones de reacción	Rend. reportado	Autor
<i>Chlorella vulgaris</i>	6:1	MeOH	NaOH 1 %P	55 °C, 15 min	>98 %	[55]
<i>Spirulina platensis</i>	5mL/gr	MeOH	NaOH 0.05gr/gr	60 °C, 3 h	30 %	[148]
	5mL/gr	MeOH	H ₂ SO ₄ 1gr/gr	60 °C, 3 h	79.5 %	
	5mL/gr	MeOH	HCl 1gr/gr	60 °C, 3 h	58.6 %	
	5mL/gr	MeOH	HNO ₃ 1gr/gr	60 °C, 3 h	40.3 %	
	5mL/gr	MeOH	H ₃ PO ₄ 1gr/gr	60 °C, 3 h	3.6 %	
<i>Nannochloropsis oculata</i>	15:1	MeOH	ZnO:Mn ⁺ 2/PEG ² 3.5 %P/P	60 °C, 4 h	87.5 %	[141]
	6:1	MeOH	80 % CaO/Al ₂ O ₃ 2 %P/P	50 °C, 4 h, 1100 rpm	23 %	[149]
	30:1	MeOH	80 % CaO/Al ₂ O ₃ 2 %P/P	50 °C, 4 h, 1100 rpm	97.5 %	[149]
<i>Chlorella sp.</i>	12mL/100 mg	MeOH	H ₂ SO ₄ 3 %	65 °C, 2 h	45.26 %	[150]
	12mL/100 mg	MeOH	H ₂ SO ₄ 4 %	65 °C, 2 h	53.19 %	
	12mL/100 mg	MeOH	H ₂ SO ₄ 3.5 %	65 °C, 2.5 h	60.71 %	
	12mL/100 mg	MeOH	H ₃ PO ₃ 3 %	65 °C, 2 h	39.12 %	
	12mL/100 mg	MeOH	H ₂ SO ₄ 3 %(E1) NaOH 1 % (E2)	65 °C, 2 h	43.92 %	
<i>Chlorella sp.</i> , <i>Scenedesmus sp.</i> , <i>Synechocystis sp.</i> y <i>Spirulina sp.</i>	20:1	MeOH	Biocarbón sulfonado de cascara de maní 5 %P	65 °C, 4 h	94.91 %	[151]
<i>Scenedesmus</i>	11:1	MeOH	Nanocatalizador ³ 2 %P	60 °C, 1500 rpm, 3 h	92 %	[73]

²Óxido de zinc dopado con manganeso sobre polietilenglicol

³Hueso de cabra

El proceso de transesterificación para convertir los triglicéridos a biodiésel, puede ser realizado con aceites vegetales nuevos y usados, así como grasas animales residuales, es preferible usar aceites que no compitan con el sector alimenticio para garantizar la seguridad alimentaria y no ocasionar un alza de precios en alimentos, existe una problemática ética de usar aceites comestibles para producir biocombustibles, la deforestación por plantar cultivos no comestibles en áreas poco desarrolladas es preocupante [152]. Los aceites de palma, algodón, *Jatropha curcas* y ricino no compiten con el sector alimenticio, la desventaja de este último es que su costo fluctúa de \$25 a \$35 M.N/L por lo cual no es costeable para la producción de biodiésel [153]. Demirbas y Karslioglu [154] aseguran que el precio del biodiésel se debe en gran parte al alto precio de la materia prima, el AVU es una excelente alternativa, muestra viabilidad técnica y la ventaja de un costo inferior. Generalmente la producción de biodiésel con AVU es factible y buena alternativa a su disposición, cuando se transesterifica esta materia prima, la densidad final dependerá del grado de degradación del aceite, la viscosidad del aceite aumenta con la degradación, se recomienda la transesterificación convencional sólo para los aceites que presenten una densidad inferior 930 kg/m^3 y una viscosidad máxima de $38.4 \text{ mm}^2/\text{s}$ a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ [152]. Los proveedores de AVU en México son las cadenas de comida rápida con un promedio de desecho de 10,000 L diarios, con un costo entre \$2 y \$3 M.N/L, el biodiésel obtenido tendría un costo de producción aproximado de \$13 a \$14 M.N/L, pudiendo competir en el mercado a precios de venta entre \$16.50 a \$16.75 M.N/L [153]. En el caso de biodiésel de microalgas los factores que incrementan los costos son los métodos de cultivo y extracción de lípidos, en general los procesos de bioconversión [102]. El proceso de transesterificación también se conoce como alcoholisis por el requerimiento de un alcohol como materia prima, se observa la preferencia por el metanol generando FAME (Fatty Acid Methyl Ester), como segunda opción el etanol generando FAEE (Fatty Acid Ethyl Ester) [155], la relación molar mínima es 3:1, alcohol:aceite estequiométricamente, en las diferentes investigaciones analizadas se coincide en el efecto del exceso de alcohol sobre la reacción, un exceso de alcohol favorece la cinética de la reacción en favor de los productos, la relación óptima dependerá del aceite o grasa utilizados, así como la catálisis, se observa como media el uso de una relación molar 6:1. Sin embargo, debe encontrarse una relación molar óptima debido a que el metanol incrementa la solubilidad del glicerol en el biodiésel, dificultando su separación e incluso provocar pérdidas [73, 152].

La temperatura de operación es un factor importante en el proceso, se coincide en que el aumento de temperatura incrementa el rendimiento y no debe superar la temperatura de evaporación del alcohol utilizado. La agitación mecánica se usa con mayor frecuencia, es notorio que la agitación incrementa la transferencia de masa, colisionando las moléculas e incrementando la conversión. Un estudio se enfoca en determinar la influencia de la agitación en el proceso evaluando tres condiciones: (1) sin agitación, (2) 400 rpm durante 1 h y (3) 400 rpm durante 2h, encontrando que los rendimientos de conversión del proceso fueron 43 %, 45 % y 46 %, resaltando que la agitación es necesaria para evitar la agregación inicial que se forma en el fondo del reactor y realizar una suspensión completa, incrementando la eficiencia de reacción [150]. Además, la importancia de la agitación es incrementar la transferencia de masa, debido a la naturaleza inmisible del alcohol y el aceite y su diferencial de densidades, sin agitación el contacto entre los reactivos es insuficiente [156].

Los ácidos grasos obtenibles de la microalga *Scenedesmus dimorphus* van desde C14 hasta C20 en medio BG-11, los que se encontraron en mayor porcentaje fueron ácido palmítico (C16:0) con 24.23 %, ácido linolénico (C18:3) con 44.01 %, ácido hexacosanoico (C26:0) con 19.12 %, mientras que al cultivarla en agua residual rica en ácido láctico el perfil lípido se desvía a la acumulación de ácido palmítico (C16:0) con 25.01 % y ácido oleico (C18:1) con 53.24 % principalmente [42]. En otra investigación dónde se cultiva en aguas residuales municipales, los lípidos obtenibles van de C15 a C18, predominando el ácido palmítico (C16:0) con 21.6 %, ácido oleico (C18:1) con 23.3 % y ácido linolénico (C18:3) con 24.01 %, al someter la biomasa a estrés salino con NaCl al 5 % P/V, el perfil lípidico cambia, incrementado el porcentaje de ácido palmítico (C16:0) a 40.5 % y ácido oleico (C18:0) de 2.5 a 11.2 %, mientras que disminuye el ácido linolénico (C18:3) a 4.16 % [36]. Es decir, entre los lípidos de *Scenedesmus dimorphus* se encuentran el ácido palmítico, oleico y linolénico en distintos porcentajes dependiendo del metabolismo de crecimiento.

Las microalgas con alto porcentaje de ácidos grasos son idóneas para la producción de biodiésel, principalmente las que contienen los ácidos desde C16 a C18 [82]

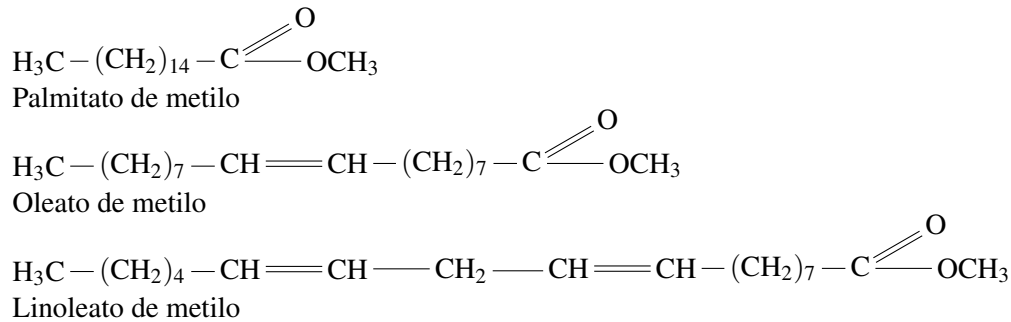


Figura 2.1: Metil ésteres de ácidos grasos provenientes de *Scenedesmus dimorphus* [4, 92]

El bioetanol a partir de microalgas es obtenido partiendo de un pretratamiento para realizar la sacarificación, entre los que se encuentran los químicos (hidrólisis ácida o alcalina, supercrítica con CO₂), enzimáticos y mecánicos (homogeneización a alta presión, autoclavado y ultrasonicación). La conversión de sacáridos a bioetanol se puede realizar por los procesos de fermentación oscura, fotofermentación, hidrólisis y fermentación separadas, sacarificación y fermentación simultáneas, así como, sacarificación y cofermentación simultáneas [157].

Entre los organismos fermentadores más utilizados se encuentra la levadura *Saccharomyse cerevisiae* [158], *Pichia stipitis*, *Zymomonas mobilis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Escherichia coli* y *Klebsiella oxytoca* [157]. El fermento debe ser destilado a 78 °C, seguido de una deshidratación para así obtener un bioetanol puro y anhidro.

Los carbohidratos presentes en las microalgas alcanzan 50% en peso seco, entre ellos la celulosa y el almidón sin lignina, además de glucosa y polisacáridos, es decir, son una materia prima para la generación de bioetanol y biobutanol, o bien de biogás. Una de las rutas bioquímicas para la obtención de biocombustibles es la digestión anaerobia, en la cual la biomasa orgánica produce biogás, que contiene metano y CO₂ principalmente, el que puede servir directamente como combustible o utilizarse para generar electricidad [159].

El proceso de digestión anaerobia se realiza en cuatro fases mediante un complejo conjunto de bacterias y se denominan hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis. Durante estas etapas

los biopolímeros complejos se descomponen en oligómeros y monómeros que posteriormente se metabolizan en ácidos grasos de cadena corta y alcoholes, los que se convierten en CO₂, hidrógeno y acetato que sirven de sustrato para la fase de metanogénesis que es donde se produce el metano. Las microalgas sirven de materia prima para la digestión anaerobia, se estima que el 50 % de la biomasa se convierte finalmente en biogás [159] entre el 45 y el 85 % de los residuos de extracción de lípidos con solventes de las microalgas también pueden ser digeridos anaerobiamente [160].

La biorefinación es el proceso para obtener un conjunto de productos como; biocombustibles, energía y productos de valor agregado [35]. Una vez obtenido el aceite de las microalgas, los residuos de la biomasa sirven para obtener azúcares y bioetanol con rendimientos del 92 % y 93 %, respectivamente, o bien pueden ser un sustrato para la producción de biogás o fertilizante [146].

También se han realizado trabajos, donde la primera etapa consiste en una hidrólisis y fermentación para obtener bioetanol, y la segunda consiste de una licuefacción de los residuos asistida por bioetanol con rendimientos del 15.84 % en peso de biodiésel, además el sólido residual con 4 % en nitrógeno puede ser utilizado como fertilizante [161]. Un proceso rentable de biorrefinación a base de microalgas es necesario para el impulso de los biocombustibles.

Biofields anunció un proyecto de generación de bioetanol a partir de algas verdeazuladas con el apoyo de la Asociación Nacional de Productores de Biocombustibles en 2009 para la adición del 6 % a las gasolinas producidas por Petróleos Mexicanos (PEMEX) [162]. Sin embargo, hasta el momento la empresa no se cuenta con registro de producción de dicho biocombustible. Biofields es una unidad de negocio del grupo Alejo, dedicada a la genética, agroindustria y biorrefinación. En Sahuaral, Sonora, se lleva a cabo el cultivo de higuierilla a partir de semillas modificadas para la extracción de aceite y posterior biorrefinación para la obtención de oleoquímicos, reutilizando la pasta de desecho para la producción de forraje y fertilizantes [163].

Tabla 2.11: Producción de bioetanol a partir de microalgas

Microalga	Proceso	Rendimiento	Referencia
<i>Chlorella vulgaris</i>	Hidrólisis y fermentación separados con <i>Z.mobilis</i>	87.59%	[164]
	Hidrólisis y fermentación simultánea con <i>Z.mobilis</i>	87.1%	[164]
	Hidrólisis y fermentación con <i>S.cereviase</i>	89%	[165]
<i>Chlorella sp.</i>	Hidrólisis y fermentación con <i>P. stipitis</i>	74.73%	[161]
	Hidrólisis y fermentación con <i>S.cereviase</i>	68.59%	
<i>Desodesmus sp.</i>	Hidrólisis y fermentación	81.4%	[166]

El proceso de fermentación alcohólica requiere de un microorganismo fermentador para convertir los carbohidratos en bioetanol, entre los cuales el más utilizado hasta el momento es *Saccharomyces cerevisiae*, para el caso de la fermentación de *Chlorella sp.* se obtiene un 68.59% de rendimiento para una carga de 100 g/L, el cual es mejorado al utilizar *Pichia stipitis* a 74.73% para la misma carga. Generalmente se ha utilizado la fermentación como segunda etapa en la obtención de bioenergía a partir de microalgas, siendo la primera la extracción de lípidos. Rhaman et al. [161] proponen realizar la fermentación alcohólica como primer paso y en segundo la licuefacción asistida por etanol para la obtención de biodiésel, obteniendo un rendimiento del 15.84% para *Chlorella sp.* afirmando que el rendimiento mejoró un 40.7% en comparación con la licuefacción de la biomasa original. Por otro lado, *Scenedesmus* es conocida por su acumulación de lípidos, carbohidratos y proteínas, del orden del 40, 22.2 y 19% respectivamente.

Los azúcares de esta microalga se pueden extraer con un pretratamiento en autoclave a 121°C y 15 psi con NaOH y H₂SO₄ durante 20 min, logrando rendimientos de sacarificación de 82 y 92%. Generalmente los procesos de fermentación alcohólica se realizan después del pretratamiento de hidrólisis ya sea simultáneos o separados alcanzando rendimientos del 68 al 89% con distintos microorganismos fermentadores, el género de microalga más estudiado es *Chlorella*, en la Tabla 2.11 se observan los rendimientos específicos obtenidos de bioetanol.

La biomasa microalgal puede ser sometida al tratamiento de digestión anaerobia, en este tipo de experimentos se ha encontrado que la composición de la pared celular de las microalgas tiene un efecto negativo en el rendimiento de metano, ya que algunas presentan resistencia a la degradación en condiciones anaeróbicas. Debido a lo anterior se requiere de un pretratamiento para facilitar la ruptura de las paredes celulares durante la digestión anaerobia [167]. La aplicación de tratamientos hidrotérmicos son una estrategia efectiva para mejorar la biodegradabilidad de distintas especies de microalgas [159]. Al utilizar la biomasa residual de la extracción de lípidos se ha observado que el cloroformo tiene un efecto inhibitor tanto en la producción de hidrógeno como de metano, la biomasa puede ser sometida a un lavado y secado previo a la digestión para disminuir el contenido de cloroformo. En el caso de *Chlorella vulgaris* se observa un mayor efecto inhibitor en la producción de metano que de hidrógeno cuando la concentración es de 100 mg CHCl_3/L [160]. Además del cloroformo o sus mezclas cloroformo:etanol para la extracción de lípidos con solventes también se utilizan mezclas de hexano:isopropanol (3:2) y metil pentano, los cuales no presentan efectos inhibidores en la productividad del biometano [167, 168]. Para procesos conjuntos de obtención de energía o bien biorrefinación no es recomendable la extracción de lípidos con cloroformo si el residuo de biomasa será sometido a digestión anaerobia, debido a la inhibición de la metanogénesis.

En un estudio completo elaborado por Klassen et al. [159] acerca de la digestión anaerobia concluyen que varios factores, entre ellos: las condiciones de cultivo, composición de la biomasa, el momento de la cosecha, pretratamientos, composición química del sustrato, parámetros de digestión anaerobia (pH, temperatura, tasa de carga orgánica, tiempo de retención de sólidos, disponibilidad de nutrientes, potencial de óxido-reducción, presencia de compuestos tóxicos, tamaño de partícula del sustrato y accesibilidad) afectan significativamente la eficiencia del proceso de digestión anaerobia. En este trabajo sólo se mencionan las microalgas que han sido utilizadas con o sin tratamiento para la digestión anaerobia en la Tabla 2.12, mostrando la productividad de metano por unidad de sólidos volátiles (VS).

Tabla 2.12: Producción de biogas a partir de microalgas

Microalga	Pretratamiento	Productividad (L CH ₄ /kg VS)	Referencia
<i>Chlorella vulgaris</i>	Ninguno	337	[168]
	Líquidos extraídos	314	
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Ninguno	357	[168]
	Lípidos extraídos	399	
<i>Scenedesmus</i>	Ninguno	140	[169]
	Aminoácidos extraídos	272.8	
	Lípidos extraídos	212.3	

Metodología

3.1. ZONA DE ESTUDIO

La ciudad de Altamira representa el 1.07% de la extensión territorial del estado de Tamaulipas, la cual se muestra en la Figura 3.1 este municipio de Tamaulipas se localiza a 22° 23' de latitud norte, a los 97° 56' latitud oeste, y una altitud de 26 metros sobre el nivel del mar, colindando al norte con Aldama, al sur con Cd. Madero, Tampico y Veracruz, al oeste con González y al este con el Golfo de México.

El clima es predominante cálido húmedo con una temperatura media anual superior a los 22 °C, un régimen de lluvia de junio a septiembre con vientos de sureste a noreste y precipitación de 900 a 1100 mm anuales, siendo los meses más secos de noviembre a mayo [170]. Las temperaturas de la zona entre mayo y septiembre son las mayores, en un rango de 25 a 28 °C, siendo agosto el de mayor temperatura (28 °C) y enero el de menor temperatura con (18.5 °C).

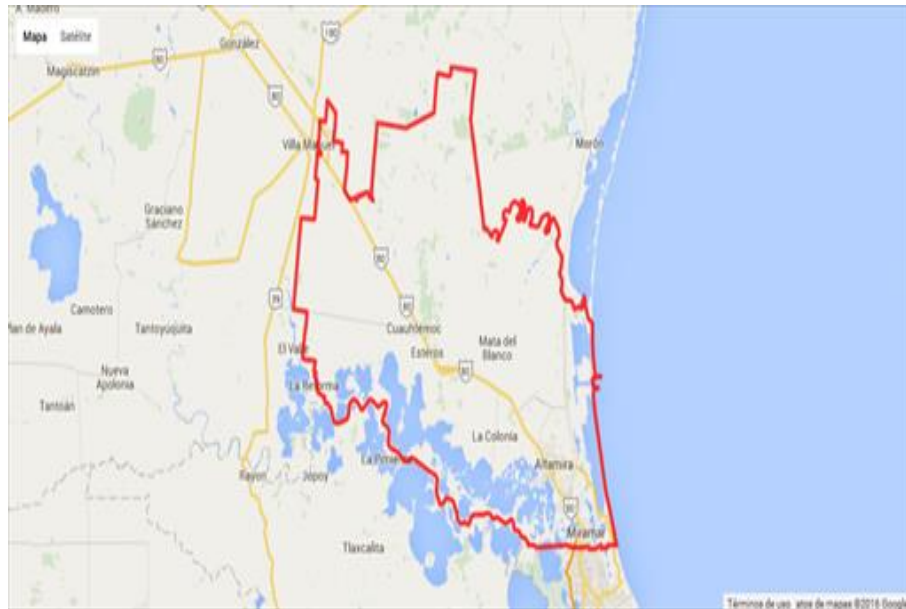


Figura 3.1: Ubicación de Altamira

3.1.1. Radiación solar

La radiación solar no está disponible en su totalidad, sólo puede ser asimilada aproximadamente la mitad, que se encuentra como radiación fotosintéticamente activa, de la cual sólo una parte llega a los cloroplastos debido a los fenómenos de reflexión y absorción, dejando un 25 % de energía recibida para ser asimilada, la fotosíntesis es químicamente capaz de almacenar el 70 % de la energía recibida en energía química, de forma neta sólo un 8 % de la radiación total disponible puede ser asimilada, considerando que la fotosíntesis se realiza en dos pasos, en la fase de luz y oscuridad, la cantidad máxima de energía total disponible que puede transformarse a biomasa es de un 5 % [171, 172].

La radiación solar incidente varía con la ubicación de cada territorio, debe cuantificarse la energía total disponible en la zona de estudio ya que determina el crecimiento de microalgas de los cultivos con fotoperiodos naturales. En la zona de estudio la energía solar incidente de onda corta tiene variaciones estacionales considerables durante el año, esto incluye la radiación visible y ultravioleta.

Tabla 3.1: Fotoperiodo natural de Altamira, Tamaulipas. [173]

Mes	Fotoperiodo natural
Enero	10 h, 48 min - 11 h, 8 min
Febrero	11 h, 9 min - 11 h, 42 min
Marzo	12 h, 7 min
Abril	12 h, 23 min - 12 h, 58 min
Mayo	13 h - 13 h, 25 min
Junio	13 h, 30 min
Julio	13 h, 29 min - 13 h, 9 min
Agosto	13 h, 8 min - 12 h, 35 min
Septiembre	12 h, 33 min - 12 h, 8 min
Octubre	11 h, 55 min - 11 h, 19 min
Noviembre	11 h, 18 min - 10 h, 52 min
Diciembre	10 h, 46 min

La duración del día en la zona es importante ya que determina el fotoperiodo natural, en la zona de Altamira la salida del sol más temprana es a las 6:21 h y la más tardía a las 7:32 h, con las puestas de sol entre 17:46 y 20:20 h, lo que quiere decir que los fotoperiodos naturales de luz:oscuridad varían a lo largo del año, oscilando entre 10.5 h de luz mínima en el mes de diciembre y 13.5 horas de luz máxima en el mes de junio, en la Tabla 3.1 se observan las horas de luz del fotoperiodo natural correspondiente a los meses del año.

3.1.2. Hidrografía de Altamira, Tamaulipas

Entre sus recursos hidrográficos se encuentran el río Barberena, en el norte, limitando Aldama de Altamira, el cual nace en la sierra del municipio de Aldama, Tamaulipas. El río Tamesí marca sus límites con el estado de Veracruz. También cuenta con los esteros el salado, el conejo y el del norte, las lagunas el Camalote, Altamira y Champayán. De agua salada se cuenta con la playa tesoro, en el litoral del Golfo de México partiendo de la escollera norte del canal de navegación de entrada al puerto industrial Altamira [170].

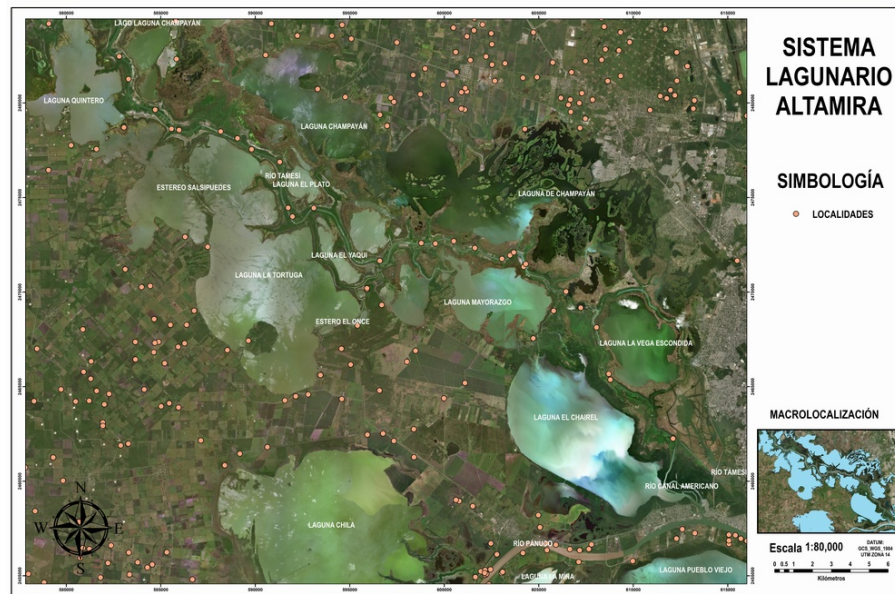


Figura 3.2: Sistema lagunario de Altamira, vista satélite

DATUM GCS-WGS-1984 UTM Zona 14

La laguna Champayán tiene una extensión de 55 000 hectáreas, el municipio cuenta además con otras lagunas, entre ellas: las olas, el Josecito, el gringo, Jaure, estero la luna, el puente, estero Barberena, estero La Tapia y la zona de las Marismas [174]. La macro localización geográfica de las lagunas de la zona se aprecian en la Figura 3.2 en vista de satélite y Figura 3.3 en vista de mapa. Además de mostrar la cartografía de la zona en la Figura 3.4. El golfo de México es el elemento hidrológico más importante de la región, seguido del río Pánuco al cual se le une el río Tamesí en su parte final.

3.1.3. Laguna “El Conejo”

El cuerpo de agua seleccionado para este estudio se ubica en las coordenadas, latitud: 22.41881 y longitud: -97.87649, en el municipio de Altamira, Tamaulipas, México, en la Figura 3.5 se muestra su ubicación geográfica, ésta laguna pertenece a la cuenca del río Guayalejo-Tamesí [176], forma parte del sistema lagunar zona este, junto con las lagunas; el chango, el cañón, el sauz, el gringo y aguada grande, además de su conexión directa con la laguna las Marismas [177]. Este cuerpo de agua dulceacuícola cuenta con un perímetro de 5.4 km y profundidad de 1.5 a 3 m [178], ha sido clasificado

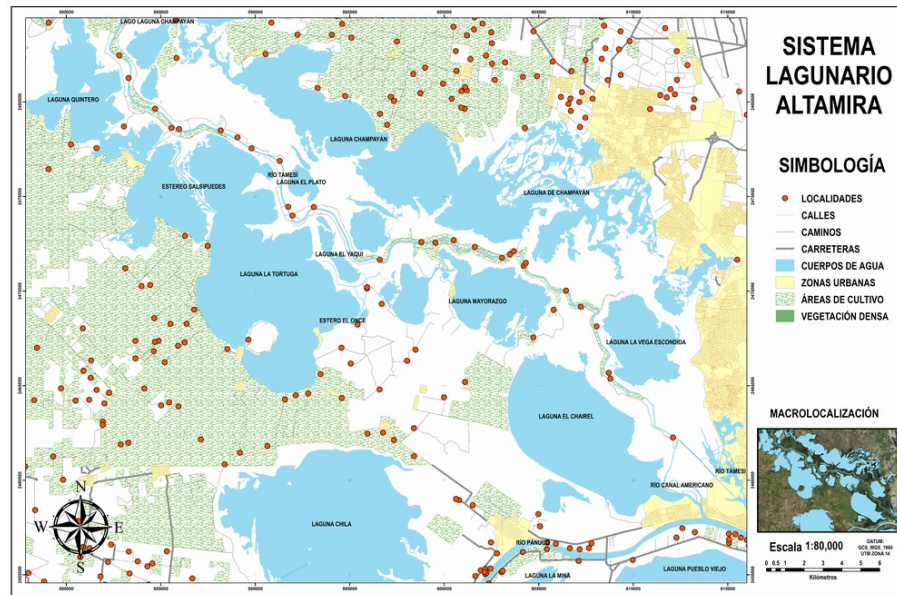


Figura 3.3: Sistema lagunario de Altamira, vista mapa

DATUM GCS-WGS-1984 UTM Zona 14

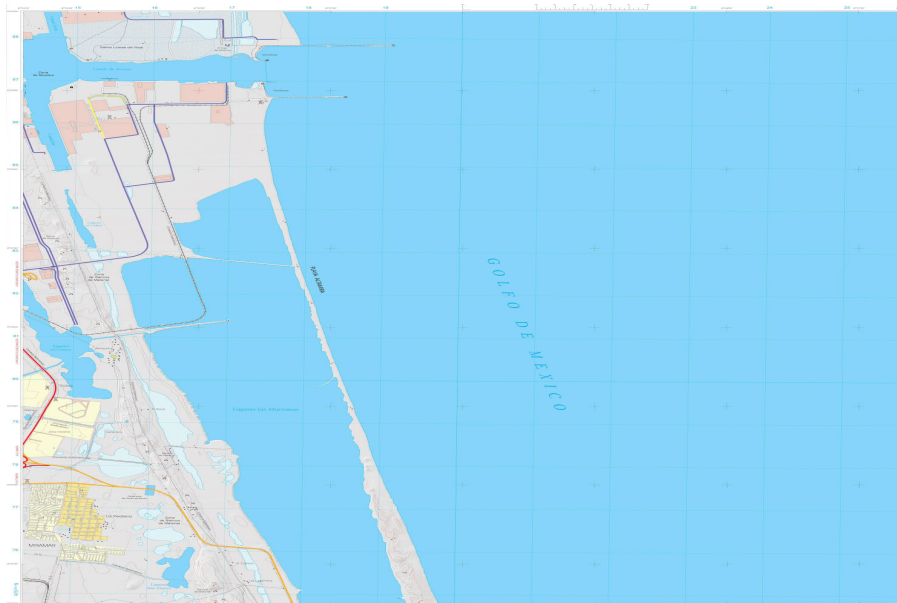


Figura 3.4: Hidrografía de Altamira tomado del INEGI. [175]



Figura 3.5: Ubicación geográfica de la laguna “El Conejo” [178]

como contaminado [176], generalmente los contaminantes más comunes son los nitratos, sulfatos y fosfatos, que inducen a la eutrofización de las aguas hasta el punto de favorecer la aparición de especies tóxicas, estos compuestos influyen en la productividad de crecimientos microalgales [8]. La materia orgánica disuelta tiene diferentes fuentes, ya sea naturales (escorrentia del suelo, actividad microbiana en los sistemas acuáticos) o antropogénicas (liberación de aguas residuales domésticas o agrícolas) [179], debido a eso es posible utilizarlas como medio de cultivo. Es importante conocer los factores naturales que influyen en el ecosistema, tales como la temperatura, la precipitación pluvial y la radiación solar, así como las actividades antropogénicas que influyen en el transporte de contaminantes e impactan en la calidad del agua [180].



Figura 3.6: Laguna "El Conejo" [178]



Figura 3.7: Flora y fauna de la laguna "El Conejo", A) Lirio acuático (*Eichhornia crassipes*), B) Lechuga de agua (*Pistia stratiotes*), C) garza blanca.



Figura 3.8: Ducto de descarga

En la Figura 3.6 se observa una imagen de la laguna, el punto 1 indica su unión con la laguna las Marismas (22.490888, -97.880100), así como el punto 2 indica la descarga de agua tratada de la empresa BASF Mexicana (22.425257, -97.884884), el ducto se encuentra señalizado en el perímetro de la laguna, tal como se muestra en la Figura 3.8, alrededor a la laguna se desarrollan actividades socioeconómicas principalmente industriales, tales como las empresas: Distribuidora de combustibles SMG, Tienda de materiales de construcción, Depotmex intercontainer, TMM logistic, dos instituciones de educación superior; ITCM campus III y Universidad Tecnológica de Altamira, además de asentamientos humanos del ejido Armenta. Por otro lado, en el boulevard de los ríos, se observa un canal de drenaje pluvial que termina en la laguna y descarga de agua residual [85].

La flora y fauna presentes en el cuerpo de agua son en su mayoría tular [176], además de observar en campo plantas acuáticas mostradas en la Figura 3.7, el Lirio (*Eichhornia crassipes*) 3.7A, lechuga de agua (*Pistia stratiotes*) 3.7B y garzas grises y garzas blancas como se muestra en 3.7C, por otro lado, en la zona existe actividad de pesca. El lirio acuático es una especie flotadora o fija al sustrato, con raíces fibrosas que alcanzan hasta un metro de profundidad, obtiene sus nutrientes de la columna de agua, requiere nitrógeno, fósforo y potasio, las condiciones que favorecen su crecimiento son temperatura

de 28 a 30 °C y pH de 6.2 a 7 unidades, es resistente a sustancias tóxicas, se considera de las peores malezas acuáticas de agua dulce, ya que está entre las primeras 100 especies invasoras del mundo por la Unión Mundial para la Naturaleza, su fruto es una cápsula que contiene hasta 450 semillas, provoca la capacidad del intercambio de oxígeno en la interfaz aire-agua evitando la transferencia de oxígeno, reduce la infiltración de los rayos solares al mismo tiempo que la sombra que proyecta inhibe el crecimiento del fitoplancton ocasionando una reducción en la densidad poblacional del zooplancton impactando en la cadena alimenticia, aumenta la pérdida de agua por transpiración, reduce la calidad del agua al descomponerse incrementando la sedimentación, además de reducir los niveles de oxígeno disuelto, compite con otras plantas acuáticas como la lechuga de agua, ambas afectan negativamente la población de peces y fauna nativa [181, 182]. A pesar de la competencia por nutrientes entre ambas plantas acuáticas, se observa el crecimiento desmedido de ambas, la lechuga de agua es una flotación perenne que se presenta en ríos, lagos y lagunas en el mundo, se reproduce por semillas que pueden permanecer latentes durante meses además de resistir la sequía y congelación, crece en temperaturas de 15 a 35 °C, incrementa la tasa de sedimentación y degradación de los sitios de anidación de peces, puede ser utilizada como abono verde o fuente de alimento, tiene la capacidad de bioacumular metales pesados, por lo cual el detritus bajo podría ser tóxico, esta planta acuática reduce el oxígeno disuelto en la columna de agua, provocan un sombreado que disminuye o impide el paso de la luz solar [183].

3.1.4. Calidad del agua

La Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) ha establecido los indicadores y escalas pertinentes para clasificar la calidad del agua como excelente, buena, aceptable, contaminada y fuertemente contaminada [184]. La clasificación establecida para la Demanda Bioquímica de Oxígeno a los 5 días (DBO₅) y Demanda Química de Oxígeno (DQO) se observan en las Tablas 3.2 y 3.3 respectivamente, así como la descripción de las clasificaciones en la Tabla 3.4.

Tabla 3.2: Estándar de CONAGUA para DBO₅ [184]

Criterio (mg/l)	Clasificación	Color
DBO ₅ ≤ 3	Excelente	Azul
3 < DBO ₅ ≤ 6	Buena calidad	Verde
6 < DBO ₅ ≤ 30	Aceptable	Amarillo
30 < DBO ₅ ≤ 120	Contaminada	Naranja
DBO ₅ > 120	Fuertemente contaminada	Rojo

Tabla 3.3: Estándar de CONAGUA para DQO [184]

Criterio (mg/l)	Clasificación	Color
DQO ≤ 10	Excelente	Azul
10 < DQO ≤ 20	Buena calidad	Verde
20 < DQO ≤ 40	Aceptable	Amarillo
40 < DQO ≤ 200	Contaminada	Naranja
DQO > 200	Fuertemente contaminada	Rojo

Tabla 3.4: Clasificación de la calidad del agua para DBO₅ y DQO [184]

Clasificación	Descripción
Excelente	No contaminada
Buena calidad	Aguas superficiales con bajo contenido de materia orgánica biodegradable
Aceptable	Con indicio de contaminación. Aguas superficiales con capacidad de autodepuración o con descargas de aguas residuales tratadas biológicamente
Contaminada	Aguas superficiales con descargas de aguas residuales crudas, principalmente de origen municipal
Fuertemente contaminada	Aguas superficiales con fuerte impacto de descargas de aguas residuales crudas municipales y no municipales

Tabla 3.5: *Temperaturas anuales de la zona de cultivo [185]*

Año	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Promedio
Temperaturas máximas													
2012	23.51	23.54	26.29	28.66	29.99	30.71	29.62	29.9	29.32	28.43	26.16	24.82	27.59
2013	22.61	25.96	26.06	28.08	29.04	30.27	29.67	29.95	28.62	27.45	23.79	21.59	26.92
2014	20.45	23.15	25.32	28.28	28.59	30.03	29.17	30.54	29	27.81	23.17	23.3	26.58
2015	20.23	22.12	23.93	28.26	29.32	29.8	30.05	31.11	30.01	29.17	26.64	24.34	27.11
2016	21.5	23.09	26.36	28.3	29.93	30	29.7	29.91	29.43	28.05	25.23	23.5	27.09
2017	23.36	25.62	25.81	28.26	29.58	30.9	29.07	30.08	29.03	27.13	25.38	22.21	27.2
Temperaturas mínimas													
2012	18.56	18.82	21.09	23.31	25.04	26.34	26.45	26.65	26.05	23.98	21.76	19.58	23.15
2013	17.15	20.53	20.04	22.28	24.29	26.31	26.23	26.47	26	24.02	19.28	16.65	22.44
2014	14.48	17.3	19.54	22.55	23.78	26.31	25.95	26.79	26.46	24.59	18.49	19.28	22.15
2015	15.38	17.12	19.39	23.92	25.44	26.11	26.61	27.32	26.64	25.21	22.92	19.8	23.02
2016	16.2	18.2	20.96	23.35	25.74	26.69	27.02	27.28	26.96	25.2	21.95	18.86	23.21
2017	18.36	21	21.71	23.21	25.1	26.58	26.33	27.08	26.45	23.5	21.26	17.35	23.17

Tabla 3.6: *Precipitación pluvial anual (mm/día) [185]*

Año	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Promedio
2012	1.39	2.96	0.5	1.87	1.85	5.06	4.59	5.63	7.87	1.39	1.58	0.35	2.91
2013	0.51	0.29	0.64	0.22	1.71	6.2	2.74	6.59	14.22	4.67	3.22	2.49	3.63
2014	0.58	0.28	1.18	0.35	2.06	5.57	3.77	2.44	11.73	6.64	1.4	1.11	3.1
2015	1.67	0.52	3.96	1.89	2.52	3.16	2.45	2.72	5.39	4.35	4.06	0.37	2.76
2016	0.91	0.53	1.09	1.5	2.7	7.75	2.75	6.88	7.91	5.31	5.02	2.35	3.72
2017	0.83	2.02	2.51	0.88	3.18	3.11	6.45	4.11	11.27	7.43	0.57	0.84	3.61

3.1.5. Condiciones naturales de crecimiento microalgal

El sitio seleccionado para el cultivo microalgal tiene las siguientes coordenadas, latitud: 22.41881 y longitud: -97.87649, los factores naturales que influyen en el crecimiento de la biomasa de microalgas son la temperatura, la precipitación pluvial y la radiación solar. En la Tabla 3.5 se observan las temperaturas máximas y mínimas registradas en los años 2012 al 2017, observándose un promedio de 30 °C máximo en los meses de agosto a septiembre, los meses con menor temperatura son los correspondientes a enero, noviembre y diciembre, anualmente la temperatura de la zona de cultivo oscila entre 22 y 28 °C. Por otra parte, la precipitación oscila entre 2.7 y 3.7 mm/día, correspondiendo a los meses de junio a septiembre los de mayor precipitación, los valores registrados para los años 2012 a 2017 se presentan en la Tabla 3.6 [185].

Tabla 3.7: Radiación solar anual (kW-hr/m²/día) [185]

Año	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Promedio
2012	9.11	9.52	9.32	9.34	9.64	10.68	10.13	10.23	10.06	9.69	9.56	9.28	9.66
2013	9.22	9.35	8.93	9.51	9.81	9.93	10.12	10.19	10.41	9.85	9.57	9.4	9.69
2014	8.69	9.17	9.42	9.44	9.63	10.17	10.11	10.16	19.46	9.79	9.47	9.41	9.66
2015	9.13	8.97	9.46	9.87	9.96	10.06	10.05	10.2	10.19	10.09	10.05	9.59	9.81
2016	8.76	8.62	9.46	9.67	10.09	10.21	10.25	10.37	10.37	9.96	9.81	9.71	9.78
2017	8.97	9.03	9.18	9.4	9.94	10.05	10.24	10.31	10.26	9.8	9.25	9.15	9.64

La radiación solar se recibe de forma directa, difusa y reflejada, la irradiación es necesaria para el crecimiento de las microalgas debido a su variación es necesario determinarla, la radiación recibida durante los años 2012 a 2017 se presenta en la Tabla 3.7, observándose los rangos de 8.6 a 10.4 kW-hr/m²/día, los meses con mayor incidencia son de junio a septiembre, anualmente la radiación promedio oscila entre 9.6 y 9.8 kW-hr/m²/día.

3.2. CARACTERÍSTICAS DEL CUERPO DE AGUA

En esta investigación se consideró como referencia las recomendaciones de la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) para determinar la calidad del agua de la laguna, realizando los análisis de DQO y DBO₅, así como también la medición de pH y temperatura.

Para la determinación de las características del agua de la laguna en estudio, de determinaron 5 puntos de muestreo, en la Tabla 3.8 se muestran las coordenadas de los puntos de muestreo seleccionados.

Tabla 3.8: Puntos de muestreo de la laguna El Conejo.

Punto de muestreo	Latitud	Longitud
1	22.434145	-97.887839
2	22.432960	-97.885143
3	22.429501	-97.883612
4	22.422617	-97.880843
5	22.419409	-97.880087

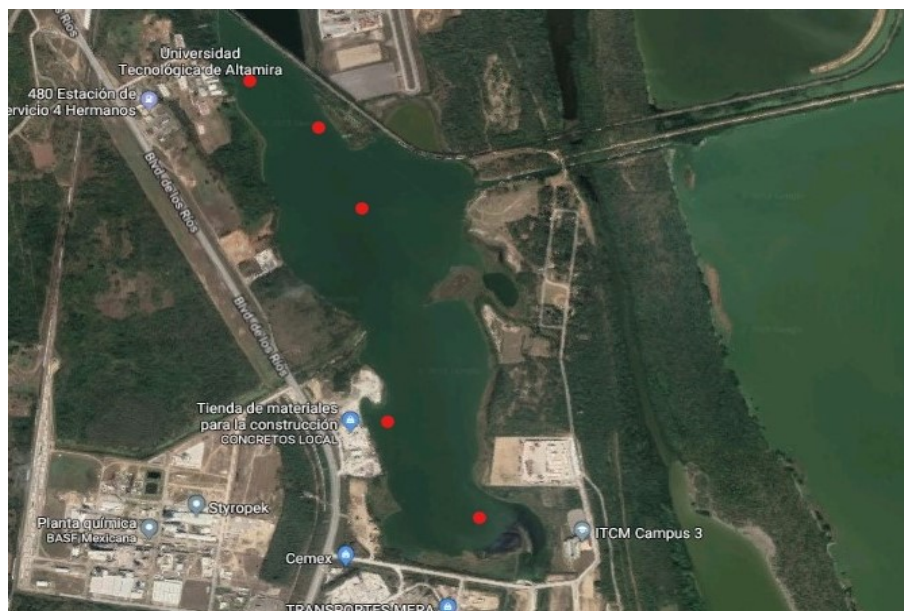


Figura 3.9: *Puntos de muestreo*

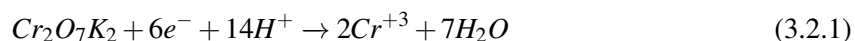
3.2.1. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO)

La DQO es la cantidad de oxígeno consumido en la oxidación química total de constituyentes orgánicos a productos inorgánicos, la materia orgánica se oxida en una proporción del 90 al 100 %, representa una medida de toda la materia orgánica e inorgánica presente en disolución y/o suspendida que puede ser químicamente oxidada por la acción de agentes oxidantes bajo condiciones ácidas, se mide como miligramos de oxígeno equivalentes a la fracción orgánica disuelta y/o suspendida por litro de disolución, en este procedimiento la materia orgánica es oxidada a CO_2 y H_2O .

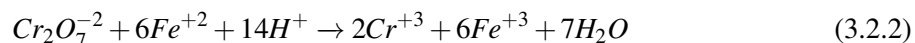
El método utilizado para la determinación de DQO a refluo abierto es el recomendado en la Norma de referencia NMX-AA-030 [186], en este procedimiento la materia orgánica es oxidada con dicromato de potasio en medio ácido con ión plata como catalizador, se añade sulfato de mercurio II para evitar las interferencias por cloruros, el remanente de dicromato se valora con sulfato ferroso amoniacal, partiendo de la cantidad de dicromato reducido y de que un mol de dicromato equivale a 1.5 moles de oxígeno se calcula el valor de DQO, el resultado es la concentración de la masa de oxígeno equivalente

a la cantidad de dicromato consumida por la materia disuelta y suspendida por la muestra de agua tratada con el dicromato como agente oxidante en condiciones definidas.

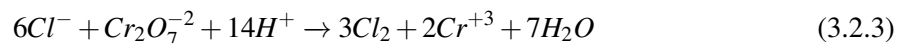
El $K_2Cr_2O_7$ es capaz de oxidar la materia orgánica y varios compuestos inorgánicos reduciéndose a su forma Cr^{+3} de acuerdo a la Ecuación 3.2.1



El exceso de dicromato de titula con una solución de Fe^{+2} generalmente $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ con indicador ferroín, oxidándose a Fe^{+3} como se observa en la Ecuación 3.2.2



Las interferencias por cloruros se limitan al adicionar $HgSO_4$ formando cloro diatómico y cloruro de mercurio como se muestra en las Ecuaciones 3.2.3 y 3.2.4





La DQO o materia oxidable químicamente se determina en mg/L mediante la Ecuación 3.2.5, en donde:

$$\gamma(DQO) = \frac{(V_{FAS_b} - V_{FAS_m}) \cdot C_{FAS} \cdot M_O \cdot v_O}{V_m} \quad (3.2.5)$$

$$M_O \cdot v_O = 8\,000 \text{ mg/mol}$$

$\gamma(DQO)$ = concentración en masa de DQO, expresado en mg/L

C_{FAS} = concentración de cantidad de sustancia de sulfato ferroso amoniacal utilizada en la medición, expresada en mol/L

V_{FAS_b} = volumen de sulfato de ferroso amoniacal (FAS) usado en la porción de prueba, expresado en mL

V_{FAS_m} = volumen de sulfato de ferroso amoniacal (FAS) usado en la titulación contra el blanco de prueba, expresado en mL

V_m = volumen de la porción de prueba, expresado en mL

M_O = masa molar de un átomo de oxígeno, expresado en mg/mol

v_O = número estequiométrico = 0.5

La calidad del agua utilizada en la determinación de DQO es importante para la precisión de los resultados, de acuerdo a la norma de referencia NMX-AA-030 si existe una diferencia de 0.5 mL de Sulfato Ferroso Amoniaco (FAS, por sus siglas en inglés) entre las titulaciones de las muestras de agua destilada con y sin calentamiento el agua es de mala calidad. El agua destilada utilizada para los análisis de este proyecto fue producida en un destilador marca Felisa, las titulaciones de los ensayos de blanco con ebullición requieren de 10 mL de FAS en su titulación mientras las muestras sin ebullición requieren de 10.3 mL de FAS, es decir, la diferencia es de sólo 0.3 mL por lo tanto el agua destilada se considera de buena calidad.

Para la determinación de DQO de la laguna “El Conejo” se realizaron 5 tomas de muestras en cada uno de los puntos de muestreo durante periodos bimestrales utilizando como referencia la NMX-AA-14-1980 que recomienda el uso de recipientes de vidrio o polietileno con capacidad de 2 L debidamente etiquetados, las muestras fueron conservadas con H_2SO_4 a una concentración de 4 mol/L en cantidad necesaria hasta que la muestra alcance el $pH \leq 2$ y manteniendo en refrigeración a $4\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$, ésta preservación permite la duración de la muestra por 30 días, en la Figura 3.10 se observa la metodología seguida para la realización de los análisis de DQO los cuales se realizaron por triplicado para cada muestra.

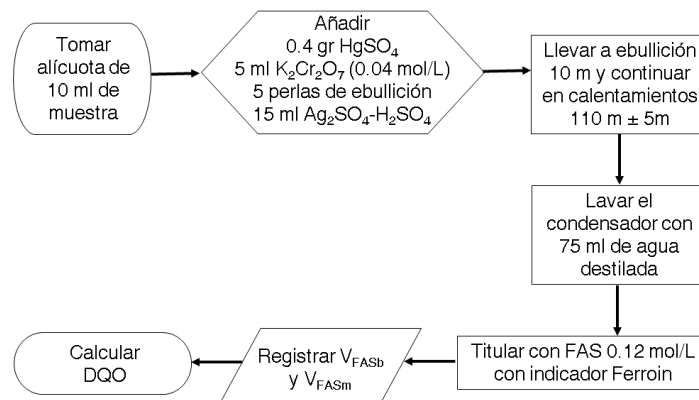


Figura 3.10: Metodología para análisis DQO [186]

3.2.2. Determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅)

La DBO₅ es una estimación de la cantidad de oxígeno que requiere una población microbiana heterogénea para oxidar la materia orgánica de una muestra de agua en un periodo de incubación de 5 días a 20 °C, debido al periodo de tiempo de la medición se emplea el subíndice 5 [187], en este proceso los microorganismos no fotosintéticos metabolizan la materia orgánica biodegradable.

El análisis de DBO₅ se realizó por método respirométrico en el equipo BDO Track II marca HACH, el cual se realiza a 20 °C en un ambiente controlado, en donde se mide la cantidad de oxígeno consumido por las bacterias que oxidan materia orgánica en una muestra de agua, el aire de la botella por encima de la muestra contiene un 21 % de oxígeno que sirve de re abastecimiento a las bacterias. Las barras de agitación en el interior de la botella mueven el oxígeno del aire a la muestra simulando condiciones naturales. En la oxidación de la materia orgánica se produce CO₂ el cual es removido continuamente con gránulos de NaOH en el sello de la botella, el sistema esta sellado para evitar cambios de presión externos, los sensores de presión controlan la presión del aire dentro de la botella, cuando el oxígeno es consumido, la presión en el espacio de la botella decae, esta diferencia de presión es proporcional a la cantidad de oxígeno usado.

Para la determinación de la DBO₅ se utilizaron mezclas compuestas conformadas por partes iguales de las muestras simples tomadas de los cinco puntos de muestreo [187], la medición tuvo 5 repeticiones, el procedimiento de medición se describe en la Figura 3.11, los resultados del análisis se leen directamente en el equipo DBO Track marca HACH.

3.3. CULTIVO DE MICROALGAS

Independientemente del sistema seleccionado para el cultivo microalgal se requiere la aclimatación de las microalgas para inocular el reactor seleccionado, generalmente se comienza el cultivo en volúmenes

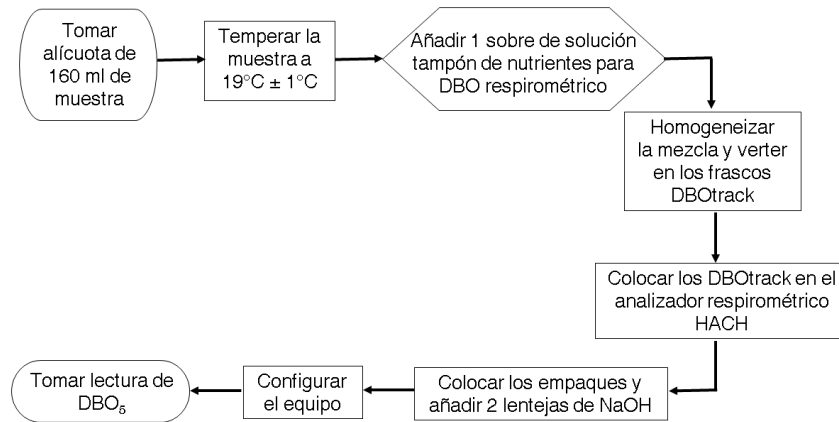


Figura 3.11: Metodología para análisis DBO₅ [188]

de 50-100 mL aumentando gradualmente a litros bajo condiciones controladas de temperatura e irradiancia [45].

Se comienza con la replicación de células *Scenedesmus dimorphus* obtenidas del laboratorio de Biología de la UNAM, se utilizó el fertilizante foliar Bayfolan, el cual contiene vitaminas y fitohormonas que estimulan el metabolismo de las plantas, además contiene ácido indol acético que estimula el crecimiento de las plantas. Al ser utilizado en las microalgas ha demostrado aumentar la producción de biomasa, pigmentos y proteínas, debido a que aporta amonio y nitrato [60], el contenido elemental del Bayfolan se muestra en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9: Contenido del Bayfolan

Compuesto	Porcentaje	Compuesto	Porcentaje
Nitrógeno	11.47 %	Fósforo	8 %
Potasio	6 %	Azufre	0.23 %
Zinc	0.080 %	Fierro	0.050 %
Boro	0.036 %	Manganeso	0.036 %
Calcio	0.025 %	Magnesio	0.025 %
Cobre	0.04 %	Molibdeno	0.005 %
Cobalto	0.002 %	Clorhidrato de tiamina	0.004 %
Ácido indol acético	0.003 %		

Se utilizan 2 mL de inóculo en 4 mL de solución Bayfolan al 0.3 %, posteriormente se realizan los escalamientos como se observa en la Tabla 3.10, generalmente se utilizan relaciones del 10 % volumen de inóculo sobre volumen de medio de cultivo [59, 73, 119], en esta investigación se prefiere una relación del 20 % de inóculo con 80 % del medio de cultivo. Debido al volumen de los escalamientos no se alimenta aire, los cultivos con volumen de 1 a 2 L no requieren aireación, es suficiente una agitación manual diaria [70], considerando que la fuente de iluminación también es una fuente de calor, se opta por utilizar iluminación led de 9 W con un fotoperiodo 12:12. Todas las transferencias de cepas se realizan cada 25 a 30 días en campana de flujo laminar desinfectada con etanol y lámpara UV durante 15 min. Para cultivos aireados o con adición de CO₂, el flujo debe ser filtrado, para lo cual se utilizan filtros estériles de 0.45 micras [99].

Se realizan tres tipos de cultivos: en FBR, en botellas de PET de 5 L para evaluar la influencia de la concentración del inóculo y nutrientes en la productividad de biomasa en condiciones naturales, además en botellas de PET de 1.5 L para evaluar la influencia de los fotoperiodos de la zona en condiciones controladas.

3.3.1. Tratamiento del medio de cultivo

El medio de cultivo seleccionado en esta investigación es agua de la laguna “El Conejo”, con el objetivo de aprovechar sus contaminantes como nutrientes, para prevenir la competencia alimenticia entre microorganismos se necesita la eliminación de microorganismos presentes en el medio. En investigaciones en las cuales han utilizado aguas residuales como medio de cultivo o nutrientes adicionales, estas son esterilizadas para evitar el efecto de contaminación, este tratamiento puede representar un costo adicional en la producción global de biodiésel a partir de microalgas [101]. Basado

Tabla 3.10: Escalamiento de cultivos

V _{inóculo} (mL)	V _{medio de cultivo} (mL)	V _T (mL)
5	20	25
15	60	75
37	148	185

en la literatura se opta por el tratamiento térmico en autoclave a 5 psi y 107 °C durante 5 min seguido de enfriamiento a temperatura ambiente como pretratamiento para su utilización como medio de cultivo como método 1, la desinfección por exposición a luz ultravioleta de 9 W durante 20 min como método 2 y el tratamiento térmico en autoclave a 120 °C y 15 psi durante 5 min como tratamiento 3. Se verifica la ausencia de microorganismos mediante sembrado en estrias en placas petri con Agar Czapek y Agar Dextrosa Saburaud e incubando a 35 °C durante 5 días. Los parámetros DQO, NO_3^{-1} y PO_4^{-3} serán evaluados para determinar el porcentaje de remoción de nutrientes.

3.3.2. Condiciones de cultivo

El FBR se siembra con 20% de inóculo y 80% de medio de cultivo, bajo fotoperiodo natural en condiciones mixotróficas con adición de aire filtrado a 0.45 μm a razón de 8 L/min, las variables serán el fotoperiodo natural e irradiancia de la zona, el pH y temperatura se registraron diario.

Con la finalidad de evitar el excesivo aumento de la temperatura, el FBR será colocado cerca de la ventana del laboratorio de energías renovables, permitiendo así el paso de la radiación solar y evitando el sobrecalentamiento, la agitación del medio de cultivo la realizará el burbujeo de aire (8 L/min) y una bomba de recirculación con una fuerza de 8 L/min.

El proceso de fotosíntesis libera oxígeno, su acumulación dentro del FBR con altos niveles de radiación solar puede causar daño fotooxidativo a las microalgas [110], motivo por el cual debe ser eliminado, en este diseño se utiliza una válvula de alivio en la parte superior para la eliminación de gases en exceso.

3.3.3. Evaluación de la biorremediación *in vitro*

Los cultivos se siembran con 20% de inóculo y 80% de agua de laguna como medio de cultivo, con un volumen de trabajo de 4 L, aireados con bomba de aire de 3 L/min de capacidad, filtrado a través de membrana de 0.45 μm estéril, se dejan crecer durante 40 días, en condiciones naturales de radiación y temperatura, diariamente se toma una muestra por triplicado para realizar la curva de crecimiento, los parámetros nitratos, fosfatos y DQO son monitoreados al inicio y al final del cultivo, mientras que la iluminación y temperatura ambiental se registran diariamente. En la Figura 3.12 se observa el esquema del dispositivo empleado para la biorremediación.

Las mediciones de nitratos y fosfatos se realizan con los kit de medición H1781 y H1713, marca Hanna.

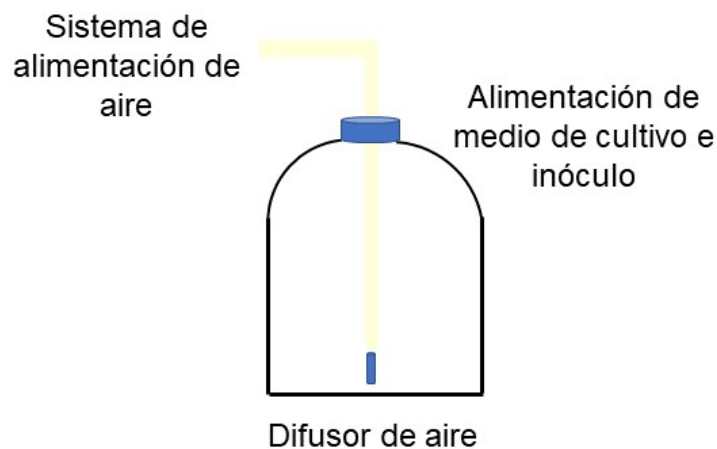


Figura 3.12: Esquema del dispositivo empleado para la biorremediación

3.3.4. Condiciones experimentales de la evaluación de la influencia del fotoperiodo

Se siembran los biorreactores con 20% de inóculo y 80% de medio de cultivo, a un volumen de trabajo de 1.25 L, aireados con bomba de aire de 3 L/min de capacidad, filtrado a través de membrana de 0.45

μm estéril, para alimentar tres botellas mediante manguera y conexiones, se utiliza agua de laguna y bayfolan al 0.3 % como medio de cultivo control, se dejan crecer durante 33 días, en condiciones controladas, iluminación con 2 lámparas LED de 18W, 100-127 V, 50/60 Hz, a temperatura ambiente, se determina la DQO inicial y final para calcular el porcentaje de remoción de nutrientes.

Los fotoperiodos naturales de la zona de Altamira, Tamaulipas se describen en la Tabla 3.1, en condiciones naturales el fotoperiodo puede variar con la estación del año, considerando las horas de iluminación mínima y máxima de la zona se determinaron 4 fotoperiodos de estudio, descritos en la Tabla 3.11.

En la Tabla 3.12 se describe el diseño de experimentos factorial completo, el primer factor es el medio de cultivo, en dos niveles (agua de laguna y Bayfolan), el segundo factor es el fotoperiodo en cuatro niveles, por lo tanto se tienen 8 combinaciones, y se realizan tres réplicas de cada tratamiento, este diseño permite examinar el efecto de cada factor y su interacción en la producción de biomasa. La curva de crecimiento se realizó mediante densidad óptica a 685 nm en un espectrofotómetro UV/Vis modelo cintra 303 marca GBC, todos los experimentos se realizaron por triplicado.

3.3.5. Esterilidad de equipos

Previo a la utilización del FBR, el equipo debe ser esterilizado, entre los métodos reportados para este propósito, Deschenes, et al. [189] utilizan agua ultrafiltrada, tratada con UV y 0.05 % de H_2O_2 durante

Tabla 3.11: *Fotoperiodos naturales promedio de Altamira, Tamaulipas. [173]*

Fotoperiodo (L:O)	
F1	10.5:13.5
F2	11.5:12.5
F3	12.5:11.5
F4	13.5:10.5

Tabla 3.12: *Diseño experimental factorial para la evaluación de fotoperiodos naturales*

Tratamiento	Medio de cultivo	Fotoperiodo (L:O)
1	Agua de laguna eutrofizada	10.5:13.5
2		11.5:12.5
3		12.5:11.5
4		13.5:10.5
5	Bayfolan 0.3 %	10.5:13.5
6		11.5:12.5
7		12.5:11.5
8		13.5:10.5

24 hr, seguido del enjuague del equipo con agua ultrafiltrada tratada con rayos ultravioleta (UV) antes de inocular su FBR, por otro lado, se reporta la esterilización con hipoclorito de sodio al 5 % a razón de 0.14 mL/L durante 24 h con agitación, el cloro residual se elimina con una solución de tiosulfato de sodio al 24.81 % a razón de 0.1 mL/L [190]

De acuerdo a la metodología recomendada en la literatura, se opta por la desinfección del FBR y recipientes de cultivo, con agua destilada clorada con la solución de hipoclorito de sodio comercial (5.40 % P/V [191]), marca Cloralex, propiedad de industrias Alen a razón de 0.14 mL/L, seguido neutralización con tiosulfato de sodio al 24.81 % a razón de 0.1 mL/L [190] y enjuague con agua destilada estéril.

3.3.6. Determinación de biomasa

El peso seco total se puede determinar utilizando muestras de volumen y concentración celular, concentradas en filtros de peso conocido secados en estufa hasta peso constante, la diferencia de peso inicial y final es la cantidad de biomasa (orgánica e inorgánica), dividido entre el volumen de muestra filtrada se obtiene el peso seco total en mg/mL o mg/L [70].

Se realizó una curva de calibración para relacionar la absorbancia a 685 nm con la concentración en peso seco de biomasa de *Scenedesmus dimorphus*, con la finalidad de predecir con precisión la concentración de biomasa en los cultivos [76]. Las condiciones de cultivo fueron: 20 % de inóculo y 80 % medio de cultivo bayfolan al 0.3 %, agitación con adición de aire filtrado (0.45 μ m), fotoperiodo 12:12, iluminación artificial LED de 18 W y temperatura ambiente, las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro UV/VIS modelo Cintra 303, marca GBC.

Se utilizaron 8 diluciones (15, 25, 35, 50, 65, 75, 85 y 100 %) con tres repeticiones, de los cuales 3 mL se destinaron a la medición de absorbancia y 17 mL a la determinación de peso seco con filtros de 0.22 μ m marca Millipore preponderados, los cuales se secaron a 60°C durante 24 h en estufa modelo HV-50, marca Ecoshel, el peso seco de biomasa se obtuvo por diferencia de pesos entre los filtros secos con muestra y los filtros secos vacíos [136].

Se constuyeron las curvas de crecimiento de *Scenedesmus dimorphus*, midiendo por triplicado la absorbancia, promediando la media para calcular la concentración media en peso seco frente al día de cultivo [73].

La determinación de la productividad media de la biomasa P (g/Ld) se calcula a partir de la variación de concentración de la biomasa dentro de un tiempo de cultivo, con la Ecuación 3.3.1 [76].

$$P = \frac{X_f - X_i}{t_f - t_i} \quad (3.3.1)$$

Dónde X_f y X_i son las concentraciones finales e iniciales de biomasa en peso seco, t_f y t_i son los tiempos final e inicial en días.

3.3.7. Cosecha de biomasa

Entre todas las técnicas reportadas para la cosecha se observa que la sedimentación gravitacional es la más económica y no afecta las características finales de la biomasa, como técnica para la primera etapa, y la centrifugación como segunda etapa. La eliminación de humedad se ha realizado en estufa a 65°C [36], 60°C durante 2 días [82], o bien mediante liofilizado de la biomasa [79]

La biomasa se dejó sedimentar 24 hr y posteriormente se centrifugó a 6000 rpm durante 15 min en centrifuga modelo EBA 21, marca Hettich, y se elimina el sobrenadante. Posteriormente se realizó el liofilizado de la biomasa, proceso que consiste en la previa congelación de la muestra y posterior eliminación de la humedad sublimando el agua, preservando la estructura biológica y química de la muestra. La liofilización de las muestras se realizó mediante congelación de la muestra en tubos falcon de 50 mL tapados con papel aluminio provisto de 5 orificios, el proceso se realizó a -80 °C durante 2 días, posteriormente se colocaron en la liofilizadora FreeZone de 2.5 L Benchtop Freeze Dryers, marca Labconco.

3.3.8. Extracción de aceites

Se realizó una extracción asistida por ultrasonido en relación 20 mL:gr, amplitud al 20 %, durante 50 min, a temperatura ambiente en el procesador ultrasónico UP200Ht, marca Hielscher, el proceso se repitió tres veces, seguido de filtración y la evaporación del solventes [55, 73, 140, 192]. La evaporación de solventes se realizó en rotavapor Büchi modelo R-134.

Para la purificación del aceite de microalgas, se añadió a la muestra 3 mL de H₂SO₄ para la eliminar la clorofila, seguido de centrifugación, el sobrenadante que contiene la clorofila se decanta, la muestra se lava dos veces con 5 mL de hexano y se calienta a 90 °C durante 15 min, una vez enfriado se centrifuga, se deja evaporar el solvente del sobrenadante para obtener el lípido [52].

La producción de lípidos se calculó utilizando la Ecuación 3.3.2 (mg/L d), donde C_L es la concentración final de lípidos del lote (mg/L), t el tiempo de cultivo, por otro lado, el rendimiento se determinó con la Ecuación 3.3.3, W_{LT} es el peso del lípido total, $W_{Biomasa}$ es el peso de la biomasa seca [59].

$$P_L = \frac{C_L}{t} \quad (3.3.2)$$

$$R_L = \frac{W_{LT}}{W_{Biomasa}} \quad (3.3.3)$$

Caracterización de biomasa y lípidos

Se obtienen los espectros de infrarrojo (FTIR) en un espectrómetro de transformada de fourier, modelo spectrum 100, marca PerkinElmer, las mediciones se realizaron en el infrarrojo medio en el rango comprendido entre $450-4000 \text{ cm}^{-1}$ y 12 escaneos. La identificación y contenido de lípidos se realizó mediante cromatografía de gases.

Equipos y Materiales

4.1. CARACTERIZACIÓN DEL AGUA DE LA LAGUNA “EL CONEJO”

La determinación de DQO se utilizó el método a reflujo abierto recomendado por la NMX-AA-030-SCFI-2012 [186], en dicha metodología se requieren los siguientes materiales y reactivos:

- Parrilla de calentamiento
- Equipo de reflujo Friedrich
- Bureta
- Manguera látex
- Pinzas universales

- Perlas de ebullición
- Agua destilada
- Disolución de H_2SO_4 [4 mol/L]
- Disolución de $\text{Ag}_2\text{SO}_4 - \text{H}_2\text{SO}_4$
- Disolución $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ [0.040 mol/L]
- Disolución de $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [0.12 mol/L]
- Ferroína, solución indicadora

Para la realización de los análisis de DBO_5 se utilizó el método respirométrico y el equipo DBO Track II marca HACH así como los sobres de solución tampón de nutrientes marca HACH

4.2. CULTIVO DE MICROALGAS

El crecimiento de las microalgas comienza con la reproducción de las mismas, el escalamiento y monitoreo del mismo mediante la determinación de las curvas de crecimiento y calibración.

Materiales:

- Tubos de ensayo de 10 mL y 25 mL
- Micropipeta
- Puntas para micropipeta
- Filtros de jeringa 0.45 μm
- Matraz erlenmeyer 1L
- Lancetas de inoculación estériles
- Agua destilada
- Gradillas
- Solución Bayfolan
- Agua destilada
- Papel filtro de 0.45 μm , marca Millipore

Equipos:

- Bombas de aire 3 - 4 L/min
- Lámpara LED de 18 W

- Balanza analítica
- Autoclave
- Campana de flujo laminar
- Bomba de vacío
- Espectrofotómetro UV/VIS modelo Cintra 303, marca GBC
- Horno para vacío modelo HV-50, marca Ecoshel

4.2.1. Tratamiento del medio de cultivo

Para el tratamiento del agua de la laguna y la verificación de ausencia de microorganismos se utilizó lo siguiente:

- Autoclave
- Recipientes autoclavables
- Cajas petri
- Matraz erlenmeyer de 1L
- Agua destilada
- Agar Dextrosa Sabouraud
- Agar Czapek
- Balanza analítica
- Lancetas de inoculación estériles
- Incubadora Felisa

4.2.2. Condiciones de cultivo

Los materiales que se utilizaron en la realización de los cultivos son los siguientes:

- Fotobiorreactor
- Filtros de jeringa 0.45 μm , marca Corning
- Bombas de pecera (3 L/min)
- Luxometro modelo AS803, marca SS
- Botellas PET de 4 L
- Difusores de aire 2.5 cm de longitud
- Botellas PET de 1.5 L
- Manguera de hule
- Lámparas LED de 18 W, 100-127 V, 50-60 Hz
- Micropipeta
- Puntas para micropipeta
- Autoclave
- Campana de flujo laminar

4.2.3. Esterilidad de fotobiorreactores

En todos los fotobiorreactores se utilizó agua estéril clorada, que posteriormente se neutralizó con una solución de tiosulfato de sodio al 24.81 %, los materiales y reactivos necesarios se enlistan a continuación

Materiales:

- Micropipeta
- Puntas para micropipeta
- Matraz erlenmeyer 1L
- Balanza analítica
- Autoclave

Reactivos:

- Agua destilada
- Hipoclorito de sodio al 5.40%, marca Cloralex
- Tiosulfato de sodio al 24.81 %

4.2.4. Determinación de biomasa

- Horno para vacío modelo HV-50, marca ECOSHEL
- Filtros de 0.22 μm , marca Millipore
- Balanza analítica
- Tubos de ensaye 25 mL
- Tubos de ensaye de 12 mL
- Micropipeta

- Puntas para micropipeta
- Pipetas volumétricas de 1, 5, 10 y 20 mL

4.2.5. Cosecha de biomasa

- Centrifuga modelo EBA 21, marca Hettich
- Tubos falcon de 50 mL
- Liofilizadora FreeZone de 2.5 L Benchtop Freeze Dryers, marca Labconco

4.2.6. Extracción de aceites

Materiales:

- Procesador ultrasónico modelo UP200Ht, marca Hielscher
- Rotavapor modelo R-134, marca Buchi
- Horno de vacío HV-50, marca Ecoshel
- Probeta 100 mL
- Matraz erlenmeyer 125 mL
- Balanza analítica

Los reactivos que se utilizaron son grado A.C.S. marca Fermont, se enlistan a continuación

- Cloroformo

- Metanol
- Hexano
- H₂SO₄

4.2.7. Caracterización de biomasa y lípidos

Equipos

- Espectrofotometro FTIR, modelo spectrum 100, marca PerkinElmer

Análisis y Resultados

5.1. CARACTERÍSTICAS DE LA LAGUNA "EL CONEJO"

Con la finalidad de conocer la carga orgánica del cuerpo de agua en estudio y su grado de contaminación se analizaron la Demanda Química de Oxígeno y la Demanda Bioquímica de Oxígeno, en la Tabla 5.1 se presentan los datos obtenidos de los análisis de DQO, en donde PM representa los puntos de muestreo 1 al 5 y R las repeticiones 1 a 3. En la Tabla 5.2 se muestran los valores obtenidos de DBO₅ de las muestras compuestas en sus 5 repeticiones. Los resultados mostrados corresponden a los bimestres julio-agosto, septiembre-octubre y noviembre-diciembre de 2019.

Tabla 5.1: Resultados de la demanda química de oxígeno

Periodo	Toma de muestra	Repetición	PM_1	PM_2	PM_3	PM_4	PM_5	
Julio-Agosto 2019	1/07/2019	R_1	153.6	153.6	134.4	163.2	163.2	
		R_2	172.8	144	144	148.8	153.6	
		R_3	163.2	144	129.6	144	153.6	
	9/07/2019	R_1	134.4	134.4	96	96	134.4	
		R_2	139.2	129.6	115.2	105.6	124.8	
		R_3	144	120	115.6	96	144	
	13/08/2019	R_1	240	182.4	211.2	326.4	278.4	
		R_2	182.4	182.4	201.6	355.2	278.4	
		R_3	220.8	192	288	278.4	297.6	
		R_1	240	201.6	19.2	57.6	57.6	
		20/08/2019	R_2	211.2	249.6	38.4	28.8	115.2
			R_3	336	172.8	28.8	28.8	115.2
	28/08/2019	R_1	211.2	211.2	144	134.4	134.4	
		R_2	230.4	211.2	163.2	124.8	124.8	
		R_3	220.8	172.8	144	153.6	163.2	
Septiembre-Octubre 2019	11/09/2019	R_1	149.6	158.4	167.2	149.6	132	
		R_2	158.4	167.2	158.4	149.6	132	
		R_3	167.2	149.6	158.4	140.8	132	
	24/09/2019	R_1	123.2	123.2	132	123.2	123.2	
		R_2	123.2	123.2	132	123.2	123.2	
		R_3	123.2	123.2	123.2	132	123.2	
	8/10/2019	R_1	184.8	149.6	193.6	123.2	132	
		R_2	193.6	149.6	193.6	140.8	123.2	
		R_3	193.6	158.4	193.6	132	132	
	15/10/2019	R_1	176	149.6	114.4	140.8	114.4	
		R_2	158.4	158.4	132	140.8	140.8	
		R_3	158.4	132	140.8	158.4	132	
		23/10/2019	R_1	79.2	114.4	88	52.8	70.4
			R_2	79.2	105.6	79.2	61.6	70.4
			R_3	88	105.6	79.2	61.6	79.2
7/11/2019	R_1	123.2	151.04	226.56	236	188.8		
	R_2	123.2	160.48	236	236	179.36		
	R_3	114.4	151.04	236	226.56	179.36		
	14/11/2019	R_1	151.04	169.92	151.04	151.04	141.6	
		R_2	141.6	169.92	151.04	141.6	141.6	
		R_3	151.04	179.36	160.48	151.04	151.04	
	R_1	132.16	160.48	122.72	122.72	113.28		

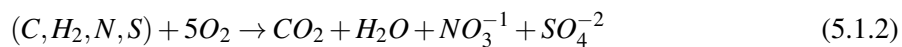
Continúa en la siguiente página...

Periodo	Toma de muestra	Repetición	PM_1	PM_2	PM_3	PM_4	PM_5
Noviembre - Diciembre 2019	20/11/2019	R_2	141.6	151.04	132.16	132.16	132.16
		R_3	132.16	151.04	122.72	122.72	122.72
		R_1	169.92	141.6	103.89	103.89	141.6
	2/12/2019	R_2	188.8	132.16	103.89	122.72	141.6
		R_3	169.92	122.72	94.4	122.72	132.16
		R_1	113.28	141.6	122.72	94.4	94.4
	12/12/2019	R_2	113.28	151.04	122.72	75.52	94.4
		R_3	122.72	141.6	132.16	94.4	103.84

Tabla 5.2: Resultados DBO₅

Periodo	Fecha	(DBO ₅) ₁	(DBO ₅) ₂	(DBO ₅) ₃	(DBO ₅) ₄	(DBO ₅) ₅
Julio-Agosto 2019	1/07/2019	103	118		111	129
	9/07/2019	59	70		47	58
	13/07/2019	76	84	90	88	85
	20/08/2019	49	50	52	47	55
Septiembre-October 2019	11/09/2019	50	32	57	54	42
	8/10/2019	39	39	32	29	43
	15/10/2019	47	46	43	44	40
	23/10/2019	20	23	20	21	28
	30/10/2019	23	20	19	23	24
Noviembre-Diciembre 2019	7/11/2019	60	62	58	56	64
	14/11/2019	24	20	22	23	34
	20/11/2019	41	38	44	44	46
	2/12/2019	16	14	16	18	15
	12/12/2019	22	23	15	16	21

Se realiza un balance estequiométrico, considerando la fórmula empírica de la materia orgánica [193].



donde:

n =número de moles

$n=m/PM$

Una vez obtenidos los valores, se utiliza el software libre phyton y las librerías pandas as pd, researchpy as rp y matplotlib.pyplot as plt, para obtener los estadísticos descriptivos, los cuales son presentados en las Tablas 5.3, 5.7 y 5.11 para la DQO, así como las Tablas 5.5, 5.9 y 5.13 para la DBO₅ para los periodos julio-agosto, septiembre-octubre y noviembre-diciembre.

Tabla 5.3: Estadísticos descriptivos DQO (jul. - ago.)

Estadístico	(DQO)1	(DQO)2	(DQO)3	(DQO)4	(DQO)5
Cuenta	15	15	15	15	15
Media	200.0	173.7	130.8	149.4	162.5
Desviación estándar	53.0	36.2	71.3	98.7	68.4
Mínimo	134.4	120.0	19.2	28.8	57.6
25 %	158.4	144.0	100.8	96.0	124.8
50 %	211.2	172.8	134.4	134.4	144.0
75 %	225.6	196.8	153.6	158.4	163.2
Máximo	336.0	249.6	228.0	355.2	297.6

Se establecen la hipótesis nula (H_0) y alternativa (H_1) para ambos parámetros, DQO y DBO₅, en donde: $H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5$, es decir, todas las medias poblacionales son iguales y H_1 : al menos una media poblacional es diferente, se comprueban mediante la prueba estadística Análisis de Varianza (ANOVA) de un sólo factor. El análisis de varianzas es un método de prueba de igualdad de tres medias o más medias poblacionales por medio de las varianzas muestrales, en donde se requiere la distribución F. Si el valor de la probabilidad es pequeño como 0.05 o menor, se rechaza la igualdad de las medias, de otra manera no se rechaza la igualdad de las medias [194]. Esta prueba permite evaluar si la diferencia de los parámetros evaluados entre los periodos es significativa.

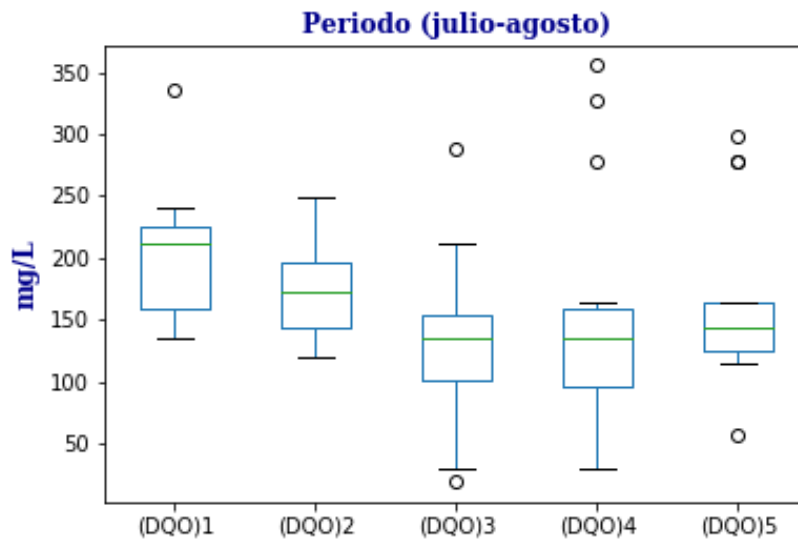


Figura 5.1: Diagrama de caja de DQO (julio-agosto)

Tabla 5.4: ANOVA DQO (jul.-ago.)

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	4	40401.1008	10100.2752	2.135245	0.085478
Residual	70	331118.5920	4730.2656		

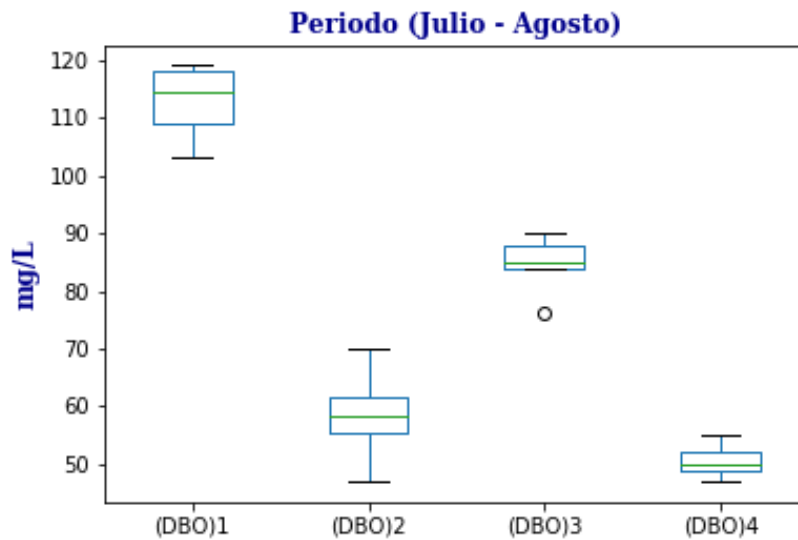


Figura 5.2: Diagrama de caja de DBO₅ (julio-agosto)

Tabla 5.5: Estadísticos descriptivos DBO₅ (jul. - ago.)

Estadístico	(DBO ₅)1	(DBO ₅)2	(DBO ₅)3	(DBO ₅)4
Cuenta	4	4	5	5
Media	112.7	58.5	84.6	50.6
Desviación estándar	7.4	9.3	5.3	3.0
Mínimo	103.0	47.0	76.0	47.0
25 %	109.0	55.2	84.0	49.0
50 %	114.5	58.5	85.0	50.0
75 %	118.25	61.75	88.0	52.0
Máximo	119.0	70.0	90.0	55.0

Tabla 5.6: ANOVA DBO₅ (jul.-ago.)

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	3	10220.127778	3406.709259	81.927217	4.04915e-09
Residual	14	582.15	41.582143		

En el primer periodo julio-agosto el pH del agua se mantuvo en 7, la temperatura varió entre 32 y 33 °C, la DQO osciló entre 130.8 y 200 mg/L, el parámetro DBO₅ osciló entre 50.6 y 112.75 mg/L,

acorde a la CONAGUA con los valores encontrados, el agua de la laguna El Conejo entra en el rango de agua contaminada.

En la Figura 5.1 se presenta el diagrama de caja de los datos obtenidos de DQO en el periodo, donde se observan los valores atípicos de las mediciones. En la Tabla 5.4 se muestran los resultados del análisis de varianza de un factor, en base a los valores de la probabilidad obtenidos de los ANOVA, se acepta la H_0 de la DQO, es decir, las medias de las poblaciones son iguales en el primer bimestre, lo que quiere decir que la laguna El Conejo tiene la misma DQO.

En la Figura 5.2 se presenta el diagrama de caja de los datos obtenidos de DBO_5 , donde sólo se observa un valor atípico. En la Tabla 5.6 se muestran los resultados del análisis de varianza de un factor, con los resultados del ANOVA de DBO_5 se rechaza H_0 y se acepta H_1 al menos una de las medias es diferente, indicando que la demanda bioquímica de oxígeno de la laguna no se mantiene constante a lo largo del periodo de evaluación, es decir, la materia orgánica biodegradable cambia a lo largo del tiempo.

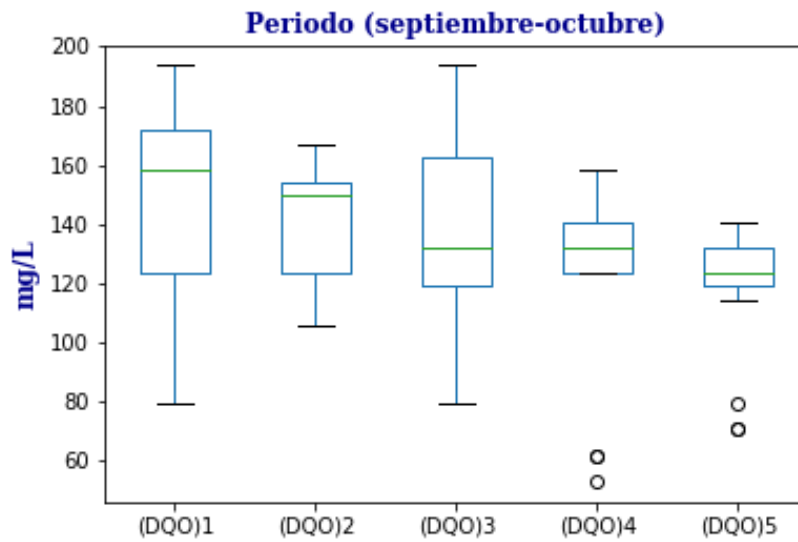


Figura 5.3: Diagrama de caja de DQO (septiembre-octubre)

Tabla 5.7: Estadísticos descriptivos DQO (sep.-oct.)

Estadístico	(DQO)1	(DQO)2	(DQO)3	(DQO)4	(DQO)5
Cuenta	15	15	15	15	15
Media	143.7	137.8	139.0	122.0	117.3
Desviación estándar	39.3	20.6	38.9	34.3	23.6
Mínimo	79.2	105.6	79.2	52.8	70.4
25%	123.2	123.2	118.8	123.2	118.8
50%	158.4	149.6	132	132	123.2
75%	171.6	154.0	162.8	140.8	132.0
Máximo	193.6	167.2	193.6	158.4	140.8

Tabla 5.8: ANOVA DQO (sep.-oct.)

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	4	8043.434667	2010.858667	1.921143	0.116482
Residual	70	73268.565333	1046.693790		

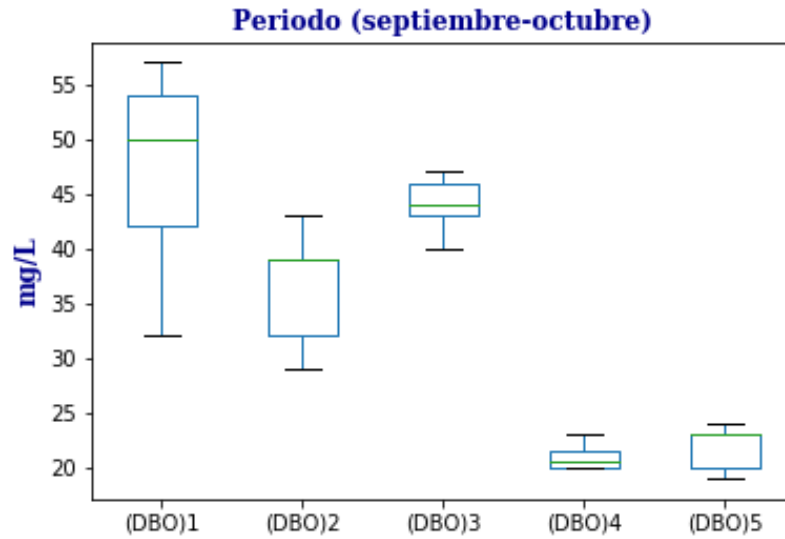


Figura 5.4: Diagrama de caja de DBO₅ (septiembre-octubre)

Tabla 5.9: Estadísticos descriptivos DBO₅ (sep. - oct.)

Estadístico	(DBO ₅)1	(DBO ₅)2	(DBO ₅)3	(DBO ₅)4	(DBO ₅)5
Cuenta	5	5	5	5	5
Media	47.0	36.4	44.0	22.4	21.8
Desviación estándar	10.0	5.7	2.7	3.3	2.1
Mínimo	32.0	29.0	40.0	20.0	19.0
25%	42.0	32.0	43.0	20.0	20.0
50%	50.0	39.0	44.0	21.0	23.0
75%	54.0	39.0	46.0	23.0	23.0
Máximo	57.0	43.0	47.0	28.0	24.0

Tabla 5.10: ANOVA DBO₅ (sep.-oct.)

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	4	2788.24	697.06	22.017056	4.312295e-07
Residual	20	633.20	31.66		

En el segundo periodo septiembre-octubre se observa que el pH continuo en 7, la temperatura varío entre 26 y 33 °C, la DQO osciló entre 117.3 y 143.7 mg/L, rango de valores que indican agua contaminada

según los valores de referencia de la CONAGUA, por otro lado, los datos de DBO_5 varían entre 21.8 y 47 mg/L, estos valores bajos pueden indicar la degradación natural de contaminantes.

En la Figura 5.3 se presenta el diagrama de caja de los datos obtenidos de DQO en el periodo, donde se observan valores atípicos en las mediciones de los puntos de muestreo 4 y 5. En la Tabla 5.8 se muestran los resultados del análisis de varianza de un factor, en base a los valores de la probabilidad obtenidos de los ANOVA se acepta la H_0 de la DQO, las medias de las poblacionales son iguales en el bimestre, indicando que la DQO de la laguna El Conejo es constante en el periodo evaluado.

En el caso de la DBO_5 , la Figura 5.4 se presenta el diagrama de caja de los datos obtenidos, donde no se observan valores atípico. En la Tabla 5.10 se muestran los resultados del análisis de varianza de un factor, con los resultados del ANOVA de DBO_5 se rechaza H_0 y se acepta H_1 al menos una de las medias es diferente, indicando nuevamente que la demanda bioquímica de oxígeno de la laguna no es igual a lo largo del periodo de evaluación, es decir, la materia orgánica biodegradable cambia a lo largo del tiempo.

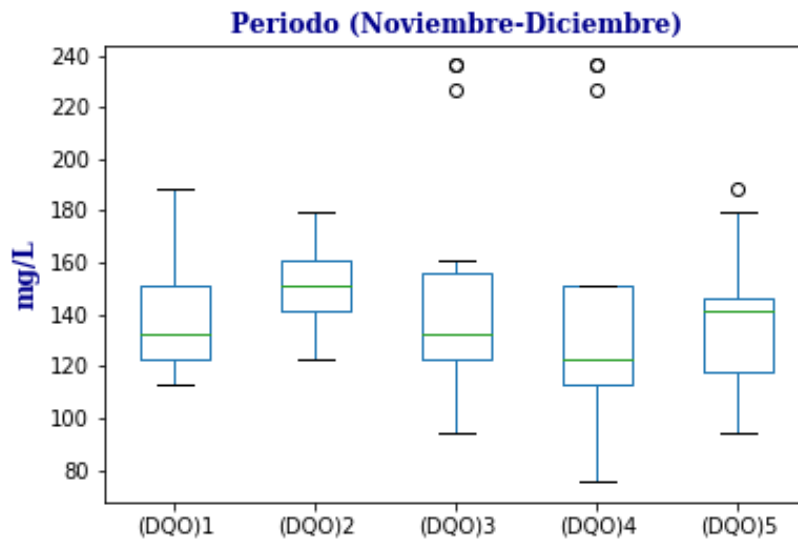


Figura 5.5: Diagrama de caja de DQO (noviembre-diciembre)

Tabla 5.11: Estadísticos descriptivos DQO (nov.-dic.)

Estadístico	(DQO)1	(DQO)2	(DQO)3	(DQO)4	(DQO)5
Cuenta	15	15	15	15	15
Media	139.2	151.6	148.5	142.2	137.1
Desviación estándar	23.1	14.9	47.2	51.3	29.3
Mínimo	113.2	122.7	94.4	75.5	94.4
25%	122.9	141.6	122.72	113.28	118.0
50%	132.1	151.0	132.1	122.7	141.6
75%	151.0	160.4	155.76	151.04	146.3
Máximo	188.8	179.3	236.0	236.0	188.8

Tabla 5.12: ANOVA DQO (nov.-dic.)

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	4	2269.294592	567.323648	0.436697	0.781658
Residual	70	90938.784427	1299.125492		

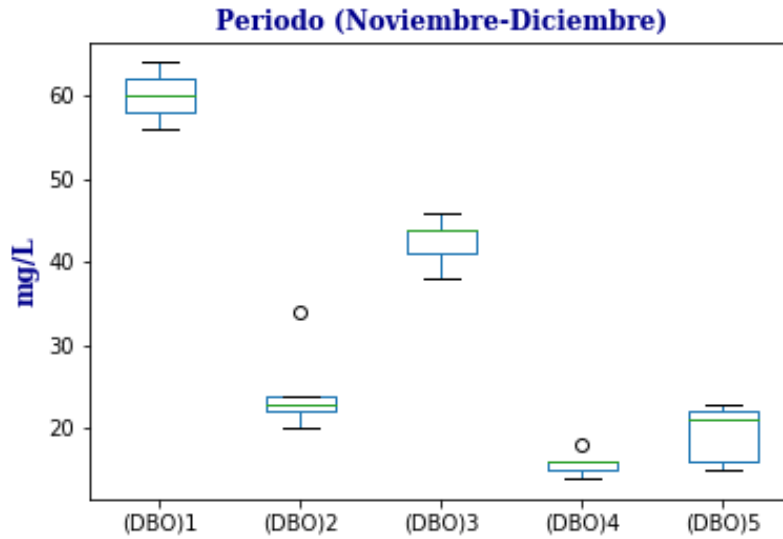


Figura 5.6: Diagrama de caja de DBO₅ (noviembre-diciembre)

Tabla 5.13: Estadísticos descriptivos DBO₅ (nov. - dic.)

Estadístico	(DBO ₅)1	(DBO ₅)2	(DBO ₅)3	(DBO ₅)4	(DBO ₅)5
Cuenta	5	5	5	5	5
Media	60	24.6	42.6	15.8	19.4
Desviación estándar	3.1	5.4	3.13	1.4	3.6
Mínimo	56.0	20.0	38.0	14.0	15.0
25%	58.0	22.0	41.0	15.0	16.0
50%	60.0	23.0	44.0	16.0	21.0
75%	62.0	24.0	44.0	16.0	22.0
Máximo	64.0	34.0	46.0	18.0	23.0

Tabla 5.14: ANOVA DBO₅ (nov.- dic.)

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	4	6855.84	1713.96	131.640553	4.577240e-14
Residual	20	260.40	13.02		

En el tercer periodo noviembre-diciembre se observa que el pH permanece en 7, la temperatura varió entre 18 y 24 °C, la DQO osciló entre 137.19 y 151.6 mg/L, rango de valores que indican agua

contaminada según los valores de referencia de la CONAGUA, por otra parte, los datos de DBO₅ varían entre 15.8 y 60 mg/L, los valores de DBO₅ entre 6 y 30 mg/L clasifican el agua como aceptable, se observa la variación de la calidad del agua de aceptable a contaminada.

En la Figura 5.5 se presenta el diagrama de caja de los datos obtenidos de DQO en el periodo, donde se observan valores atípicos en las mediciones de los puntos de muestreo 3, 4 y 5. En la Tabla 5.12 se muestran los resultados del análisis de varianza de un factor, en base a los valores de la probabilidad obtenidos de los ANOVA, se acepta la H_0 de la DQO, es decir, las medias de las poblaciones son iguales en este tercer bimestre, lo que quiere decir que la laguna El Conejo tiene la misma DQO. En la Figura 5.6 se presenta el diagrama de caja de los datos obtenidos de DBO₅, donde sólo se observa un valor atípico en la segunda y cuarta medición. En la Tabla 5.14 se muestran los resultados del análisis de varianza de un factor, con los resultados del ANOVA de DBO₅, nuevamente se rechaza H_0 y se acepta H_1 al menos una de las medias es diferente, indicando nuevamente que la demanda bioquímica de oxígeno de la laguna no es igual a lo largo del periodo de evaluación, es decir, la materia orgánica biodegradable cambia a lo largo del tiempo.

Tabla 5.15: Calidad del agua de la laguna El Conejo

Periodo	Temp. °C	pH	DQO (mg/L)-Calidad	DBO ₅ (mg/L)-Calidad
Julio-Agosto 2019	32-33	7	130.8 - 200 - Contaminada	50.6 - 112.75 - Contaminada
Septiembre- Octubre 2019	26-33	7	117.3 - 143.7 - Aceptable	21.8 - 47 - Contaminada
Noviembre- Diciembre 2019	18 - 24	7	137.19 - 151.66 - Aceptable	15.8 - 60 - Contaminada

En la Tabla 5.16 se presentan los valores aproximados de la materia orgánica oxidable química y biológicamente en los bimestres analizados.

Tabla 5.16: Balance de materia

Periodo	Materia oxidable químicamente (g/L)	Materia orgánica biodegradable (g/L)
Julio-Agosto 2019	0.245 - 0.375	0.047 - 0.105
Septiembre- Octubre 2019	0.219 - 0.269	0.020 - 0.044
Noviembre- Diciembre 2019	0.257 - 0.284	0.014 - 0.056

En los cuerpos de agua contaminados con metales se corre el riesgo de bioacumulación en la cadena alimentaria, los metales Cadmio, Níquel, Cobre y Zinc, han sido asimilados por *Scenedesmus sp* [57].

La laguna El Conejo ha despertado un interés en la comunidad científica del Instituto Tecnológico de Ciudad Madero, debido a su colindancia y la actividad pesquera de la población aledaña. Soriano [195] demostró la presencia de Cobre, Hierro e Indio en los sedimentos de la laguna El Conejo, afirma que el cobre excede los límites máximos permisibles establecidos en normas canadienses y norteamericanas, además de que no existe una legislación vigente que contemple el elemento Indio como un contaminante. Torres [85] demostró la presencia de un florecimiento algal nocivo ocasionado por la cianobacteria *Planktothrix sp.*. Aunado a la determinación de la calidad del agua, clasificada como fuertemente contaminada en base a sus parámetros DQO, DBO₅ y el excesivo desarrollo de lirio acuático y lechuguilla de agua, es necesario el estudio de alternativas para la biorremediación y restauración dicho ecosistema.

Tabla 5.17: Métodos de tratamiento del medio de cultivo

Método	Descripción
1	Autoclavado a 5 psi, 107 °C, 5 min
2	Luz UV, 9 W, 20 min
3	Autoclavado a 15 psi, 120 °C, 5 min

5.2. CULTIVO DE MICROALGAS

5.2.1. Replicas y escalamiento

Con la finalidad de mantener las cepas de microalgas *Scenedesmus dimorphus*, se realizan las réplicas y los escalamientos de los cultivos, comenzando con un cultivo de 25 mL, escalado a 75 mL y posteriormente a 185 mL, en la Figura 5.7 se muestran las imágenes de los cultivos.

5.2.2. Tratamiento del medio de cultivo

Se prueban tres métodos de tratamiento del agua de la laguna El Conejo para eliminar los microorganismos presentes previo a la inoculación de *Scenedesmus dimorphus*, en la Tabla 5.17 se describen detalladamente.

Es necesario verificar la ausencia de microorganismos, por lo cual, el agua tratada se siembra en placas de agar Czapek y agar Dextrosa Sabouraud, incubándose 5 días a 35 °C. En la Figura 5.8, se observan unidades formadoras de colonias, es decir, crecimiento de microorganismos que no se identificaron en las placas sembradas con aguas tratadas correspondiente a los métodos de tratamiento 1 y 2, en consecuencia se considera que estos métodos no son eficaces en la eliminación de microorganismos del agua de la laguna, por lo tanto, el tratamiento a utilizar en el transcurso de esta investigación es el método 3, el autoclavado a 15 psi, 120 °C, durante 5 min.



Figura 5.7: *Replicación de células y escalamiento de cultivos*

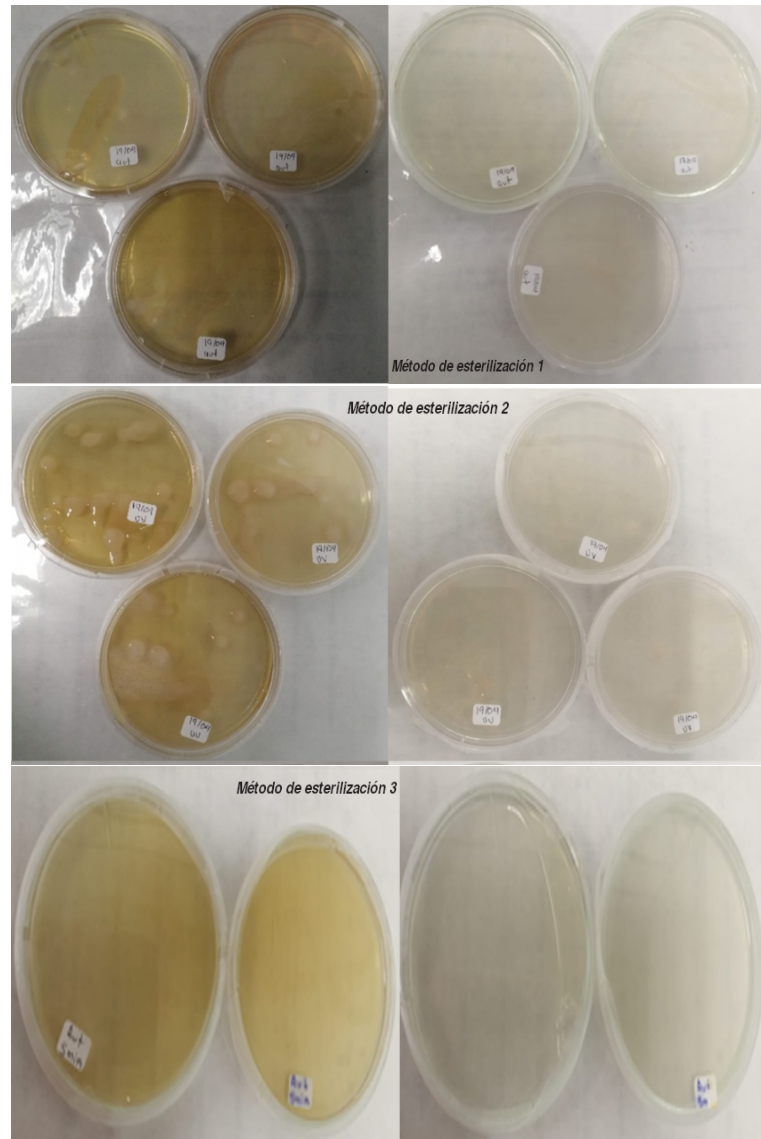


Figura 5.8: Resultados del análisis microbiológico del agua de Laguna “El Conejo”, sometida a los métodos de tratamiento para desinfección.

5.3. CULTIVO DE *SCENEDESMUS DIMORPHUS*

En la siguiente sección se presenta la curva de calibración para la determinación de biomasa de los tres tipos de cultivo, las productividades de biomasa y lípidos obtenidos.

5.3.1. Determinación de biomasa

La medición de la absorbancia es un método de cuantificación, utilizado para relacionar la cantidad de biomasa en peso seco con la lectura de absorbancia, debido a eso es importante revisar que el medio de cultivo no interfiera en la lectura de los datos a la λ utilizada, por lo cual, se realizó la lectura de la absorbancia del agua de la laguna El Conejo después del tratamiento. Se utilizó un espectrofotómetro UV/VIS modelo Cintra 303, marca GBC para realizar la lectura de absorbancia de la muestra, la cual fue 0.0, en la Figura 5.9 se muestran los espectros de emisión UV/VIS de la celda de cuarzo y la muestra. Se realizó la prueba t de Student considerando varianzas iguales, para comprobar la H_0 : las absorbancias medias de los medios de cultivo (agua de laguna y bayfolan al 0.3%) son iguales, en caso se aceptarse la curva de calibración puede utilizarse para determinar las concentraciones microalgales de los cultivos en cualquiera de los dos medios de cultivo. Los resultados de la prueba t se muestran en la Tabla 5.18, de acuerdo con el valor crítico se acepta la hipótesis nula, ambos medios de cultivo tiene la misma absorbancia media, por lo tanto, la curva de calibración puede ser utilizada para realizar las curvas de crecimiento en los medios de cultivo agua de laguna y bayfolan al 0.3%.

Las microalgas contienen clorofila en sus cloroplastos, las clorofilas A y B se leen en el rango de 652 a 750 nm [60], la clorofila A tiene una banda centrada alrededor de 685 nm *in vivo* [105]. Por lo tanto, se realizó la curva de calibración relacionando el peso seco con la absorbancia a 685 nm de longitud de onda, en la Figura 5.10 se observan las diluciones para medir la absorbancia y peso seco, así como los filtros con muestra y las concentraciones utilizadas en el procedimiento.

Tabla 5.18: Prueba t para dos muestras, suponiendo varianzas iguales

	Agua de laguna	Bayfolan 0.3 %
Media	-0.025522635	-0.042882595
Varianza	4.75E-05	2.81E-06
Observaciones	20	20
Varianza agrupada	2.5E-05	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	38	
Estadístico t	10.94745427	
P (T<=t) una cola	1.30E-13	
Valor crítico de t (una cola)	1.68595446	
p(T<=t) dos colas	2.60E-13	
Valor crítico de t (dos colas)	2.024394164	

En la Figura 5.11 se observa la curva de calibración, que presenta la línea de tendencia y se obtiene la Ecuación 5.3.1 de regresión lineal que relaciona la absorbancia con el peso de biomasa seca de *Scenedesmus dimorphus*, el coeficiente de correlación de 0.9928. Con esta Ecuación se puede determinar la concentración en g/L de biomasa en cualquier cultivo sólo midiendo la absorbancia a 685 nm.

$$y = 2.6113x - 0.0094 \quad (5.3.1)$$

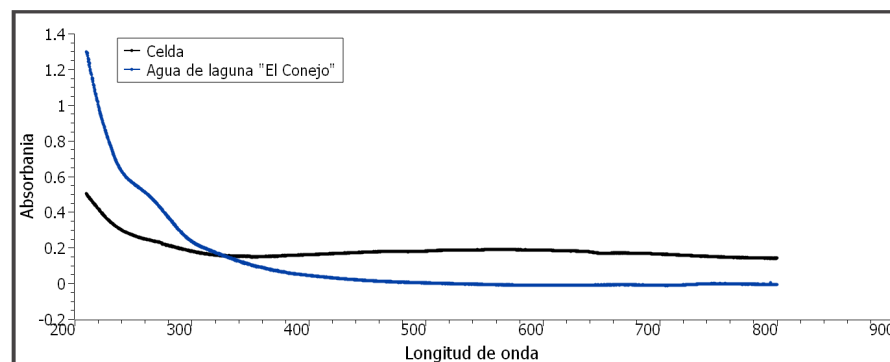


Figura 5.9: Absorbancia del agua de la laguna



Figura 5.10: Proceso de elaboración de curva de calibración

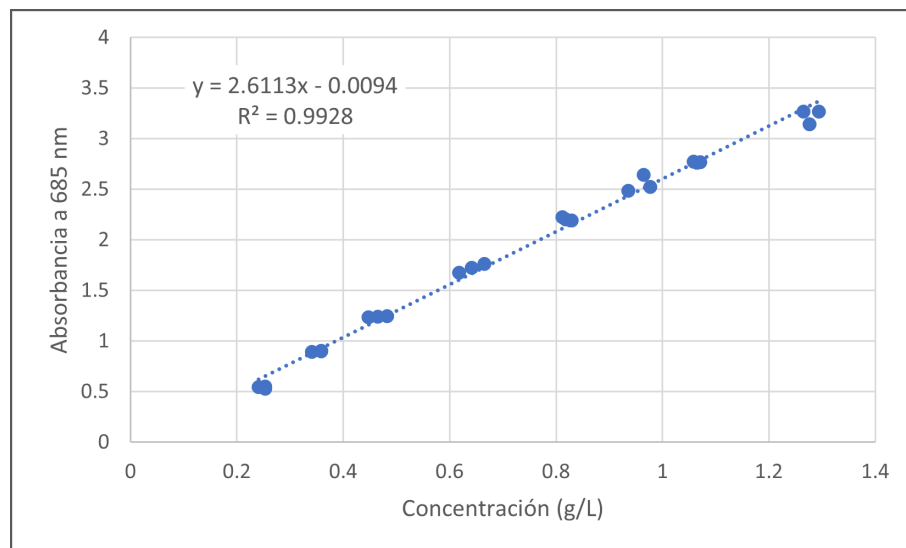


Figura 5.11: Curva de calibración de biomasa seca de *Scenedesmus dimorphus* vs absorbancia a 685 nm

5.3.2. Obtención de biomasa seca y lípidos

El proceso de cosecha comienza con una sedimentación gravitacional primaria, seguida de centrifugación a 6000 rpm durante 15 min en centrifuga modelo EBA 21, marca Hettich, se desecha el sobrenadante, la biomasa se somete a congelación a -80°C y por último liofilización.

Los lípidos fueron obtenidos mediante extracción con solventes asistida por ultrasonido, en una relación 1:20 biomasa:solvente con cloroformo:metanol en relación 2:1 V:V, en tres periodos de 50 min. El extracto se filtró al vacío en embudo de cristal con filtro integrado de $0.45 \mu\text{m}$, el filtrado se sometió a rotavaporación para la recuperación del solvente y separación de aceite. La muestra de aceite se lava con 5 mL de Hexano, se somete a calentamiento a 90°C durante 15 min, seguido de la centrifugación, el sobrenadante contiene el aceite, se repite el lavado en dos ocasiones para recuperar todo el aceite, se observa sedimento de biomasa en los tubos falcon, el extracto se deja evaporar en condiciones ambientales, posteriormente se somete a desecación durante un día. Una vez lavado y secado el aceite obtenido se procede a su caracterización.

5.4. DIMENSIONAMIENTO DE UN FOTOBIORREACTOR DE CAPA PLANA CON SEDIMENTADOR

El FBR diseñado es un sistema cerrado que permite un control de los parámetros de cultivo, el modelo de placa plana proporciona una gran área de superficie de iluminación, buena trayectoria de luz y relativamente mayor productividad de biomasa así como baja acumulación de oxígeno disuelto [1], además tienen una relación que permite una transmisión de luz eficiente en comparación con los cilíndricos, la cual se calcula con la Ecuación 5.4.1.

Los FBR de capa plana se caracterizan por tener una mayor superficie de irradiancia, éste modelo está conformado de un prisma cuadrangular y de 50 cm ancho por 48 cm alto por 5 cm de fondo y un prisma triangular unido de 50 cm de base por 20 cm de altura, como se muestra en la Figura 5.12. Se operará con el llenado a 38 cm de altura sobre el prisma cuadrangular, por lo tanto, la superficie efectiva del FBR se calcula con la Ecuación 5.4.2, mientras que el volumen efectivo se determina con la Ecuación 5.4.3, por último la relación S/V es calculada con la Ecuación 5.4.4. Medidas aproximadas han sido utilizadas en la fabricación de fotobiorreactores planos, 45 por 48 cm, con diferentes longitudes laterales 1.9, 3.8 y 7.6 cm dependiendo de su volumen de cultivo 5, 10 o 20 L [41]

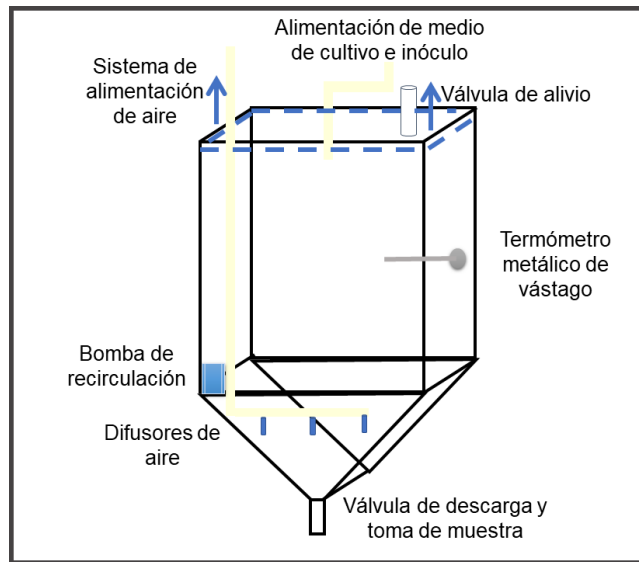


Figura 5.12: Dimensionamiento de un FBR de capa plana.

$$\text{Relación } \frac{S}{V} = \frac{\text{Área de la placa lateral}}{\text{Volumen del equipo}} \quad (5.4.1)$$

$$S = 0.5m \cdot 0.38m + \frac{0.5m \cdot 0.2m}{2} = 0.24m^2 \quad (5.4.2)$$

$$V = 0.05m \cdot 0.5m \cdot 0.38m + \frac{0.5m \cdot 0.2m}{2} \cdot 0.05 = 0.012m^3 \quad (5.4.3)$$

$$\frac{S}{V} = 0.24m^2 / 0.012m^3 = 20.0m^{-1} \quad (5.4.4)$$

La relación S/V es la relación entre la superficie iluminada y el volumen, a mayor valor mayor concentración celular [110], la relación recomendada por [111, 196] oscila en el rango de 20 a 200

m^{-1} . Por lo tanto, el FBR propuesto cuenta con la relación S/V mínima recomendada, por otro lado, la geometría propuesta tiene el propósito de permitir la sedimentación de la biomasa cultivada.

El volumen efectivo del FBR es de 12 L, el cual es adecuado para el pretratamiento y almacenamiento por lotes del agua de laguna como medio de cultivo. La superficie efectiva de cultivo del FBR será de 0.24 m^2 .

Para mantener un equilibrio entre el aire alimentado y el O_2 producido en la etapa de las fotosíntesis de microalgas, es necesario destinar un espacio en el FBR para el intercambio de gases, ya que en la etapa de fotorrespiración el O_2 producido es consumido para generar CO_2 [106], debido a esto se diseñó el FBR con un volumen total de 14.5 L, para prevenir la acumulación excesiva de gases se instaló una válvula de alivio de gases.

Se seleccionó como material de fabricación adecuado el plexiglás o polimetilmetacrilato de 6 mm de espesor para la construcción del FBR, utilizado ampliamente como sustituto del vidrio, debido a que proporciona alta transparencia, durabilidad, resistencia química y menor fragilidad [56, 115, 197, 198]. También se han utilizado recipientes cilíndricos de vidrio [36] y bolsas de polietileno [61]

Para la carga de medio de cultivo e inóculo se instala una tubería de policloruro de vinilo (PVC) de 2.5 cm de diámetro, que sale del FBR con un codo de 90° , una extensión de 40 cm y otro codo de 90° hacia arriba con una extensión de 8 cm y tapón capa roscado, con la finalidad de alimentar el reactor y cerrar el sistema, operación que se realizó siempre dentro de la campana de flujo laminar en un ambiente estéril para impedir la contaminación del cultivo. Se utilizó alimentación por lotes

En el fondo del FBR se instala una válvula para la descarga del cultivo, debido a que se planea realizar una sedimentación gravitacional al finalizar el periodo de cultivo, se diseñó con un fondo cónico.

En el cuerpo del FBR a la mitad de la altura, se instaló un termómetro metálico de vástago en un costado a la altura de 25 cm, para el monitoreo de la temperatura del cultivo.

Los cultivos microalgales en un metabolismo mixotrófico consumen carbono orgánico e inorgánico, en éste proyecto el carbono orgánico es proporcionado por el medio de cultivo, mientras que el inorgánico es provisto por una alimentación de aire, con un contenido de CO₂ atmosférico de 0.036 mg/L, la alimentación de aire es filtrada mediante filtros de jeringa estériles de 0.45 μ m y distribuida mediante una tubería de policloruro de vinilo clorado (CPVC) con tres distribuidores de gas de 2.5 cm de longitud, de manera que evite la sedimentación de partículas en el fondo del FBR y permita la sedimentación de microalgas en el fondo una vez detenida la agitación. Los distribuidores de aire seleccionados son el mismo tipo de difusor utilizado por Xu et al. [61].

La aereación se provee mediante dos bombas de acuario con caudal de 4 L/min cada una, acopladas a la tubería de aire, éste tipo de dispositivos ya han sido utilizados para aereación de cultivo microalgales [57]

La operación del FBR se realizó en modo lote, con 20% de inóculo y 80% de medio de cultivo en condiciones iniciales, posteriormente se cosecha, desinfecta y rellena nuevamente en condiciones naturales de radiación, temperatura y fotoperiodo. La limpieza del FBR entre lotes se realiza mediante el desmontado de la tapa superior, indicada con una línea azul punteada en la Figura 5.12, lavado y sellado nuevamente, posteriormente se realiza el esterilizado.

5.4.1. Cultivo en FBR de capa plana

En la Figura 5.13 se observa el fotobiorreactor construido para el cultivo a escala de éste proyecto, con un volumen de trabajo de 12 L, fabricado en polimetilmetacrilato de 6 mm de espesor. El cual fue alimentado con el 20% de inóculo y 80% de medio de cultivo, en la Figura 5.14 se muestra la curva de crecimiento microalgal de los cultivos realizados en el FBR.

Tabla 5.19: Resultados de los cultivos en FBR.

Exp.	Cinóculo	Temp.	Lux	C_i (g/L)	C_f (g/L)	Prod. (g/L d)	Biomasa obtenida	% Cosecha
1	0.24	28.92	1453.00	0.225	0.465	0.016	2.25	75.1
2	0.29	27.16	1458.62	0.275	0.485	0.014	2.03	77.0
3	0.34	26.80	1934.66	0.327	0.612	0.019	2.64	75.9

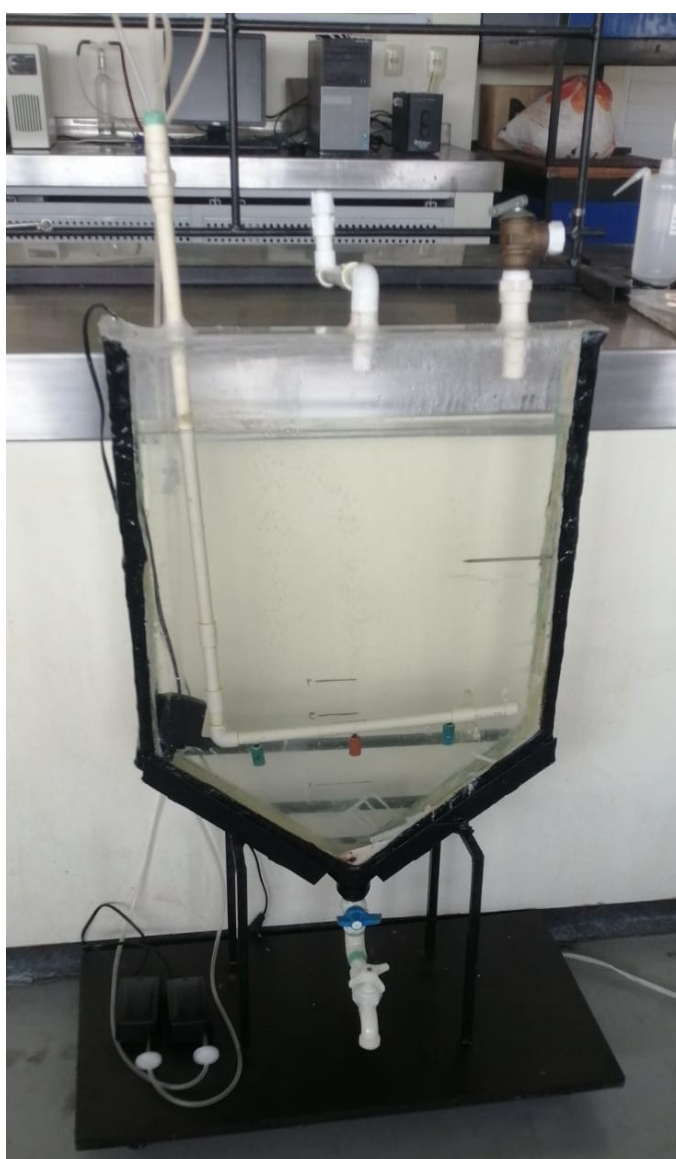


Figura 5.13: Fotobiorreactor de capa plana.

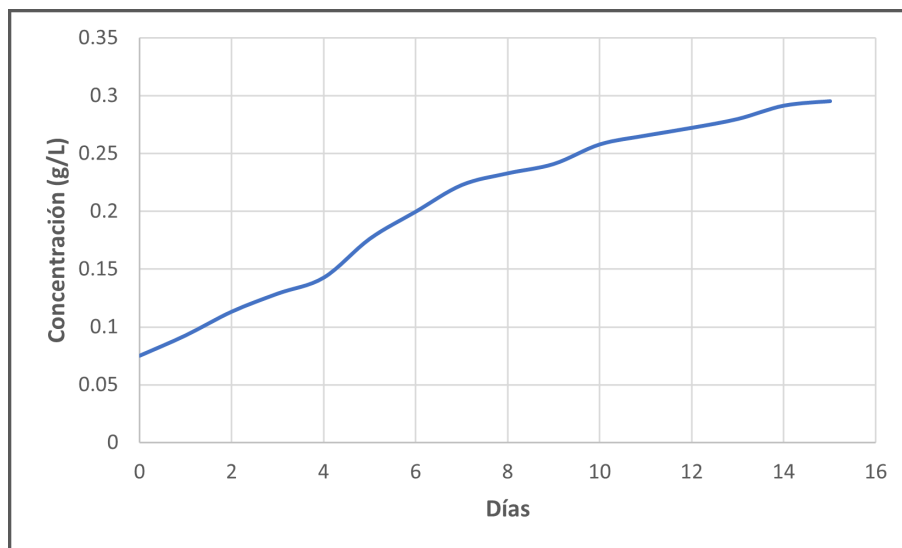


Figura 5.14: Curva de crecimiento microalgal en FBR.

Tabla 5.20: Remoción de nutrientes en los cultivos de *Scenedesmus dimorphus* en FBR

Exp.	NO_3^- (ppm)	PO_4^- (ppm)	DQO _i (ppm)	NO_3^- (ppm)	PO_4^- (ppm)	DQO _f (ppm)	% Rem NO_3^-	% Rem PO_4^-	% Rem DQO
1	22.7	0.9	124.8	17.5	0.9	115.2	22.9	0	7.7
2	31.7	0.9	115.2	25.3	0.9	107.5	20.2	0	6.7
3	41.6	0.9	86.4	30.0	0.9	80	27.9	0	7.4

Los resultados de los cultivos realizados en el FBR de capa plana dimensionado y construido en este proyecto se muestran en la Tabla 5.19. Con base en los datos, se obtiene una productividad de biomasa promedio de 0.016 g/L d y aproximadamente se cosecha el $76 \pm 0.95\%$ de la biomasa producida con sedimentación gravitacional durante 24 horas. En un estudio de revisión de flocculantes para microalgas se informó que para *Scenedesmus dimorphus* sólo se había probado el almidón catiónico con una eficiencia del 97%, el quitosano diluido en los ácidos cítrico, nítrico, fosfórico y clorhídrico presento eficiencias del 5.5, 55, 69, y 85% en la sedimentación de *Chlorella vulgaris* [199].

las concentraciones de nutrientes y su respectiva remoción se presentan en la Tabla 5.20, con base en los datos, se concluye que el tiempo de cultivo de 15 días no es suficiente para realizar una remoción de fosfatos, sólo se degrada un $23.66 \pm 3.90\%$ de nitratos y $7.26 \pm 0.51\%$ de DQO. Al término de 15

días el medio de cultivo aún contiene nutrientes aprovechables para las microalgas, sin embargo, no se realizaron cultivos en mayores periodos de tiempo.

La productividad mínima de biomasa obtenida fue 0.019 g/L día, un valor superior a la que reporta Chandra et al. [78] cuando cultiva *Scenedesmus dimorphus* en medio BG-11 adicionado con 0.1 g/L de urea que fue de 0.0015 g/L día, en condiciones de iluminación de 2500 a 3500 Lux, con un fotoperiodo de 16:8 en 11 días de cultivo a 25°C. Mientras que Laraib et al. [82] obtiene 0.096 g/L día en BG-11 con fotoperiodo 12:12 y adición de CO₂ en 20 días, incrementan la productividad al suplementar el cultivo con 2 % P/V de hidrolizado de orujo de manzana a 0.14 g/L día, es decir, presenta mayor productividad de biomasa en metabolismo mixotrófico. La elevada productividad obtenida en éste estudio en comparación con los resultados obtenidos por Chandra et al [78] se atribuyen a la mayor concentración de nutrientes de éste estudio, confirmada por la remoción del 7.26 ± 0.51 % de DQO. Del mismo modo, Manzoor et al. [19] obtienen un incremento en la productividad de biomasa de 0.096 g/L día a 0.119 g/L día, al adicionar 5 g de hidrolizado de bagazo de caña al cultivo en BBM, 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 16:8.

5.4.2. Composición de la biomasa cultivada en FBR

La biomasa obtenida en los distintos cultivos realizados en el FBR se mezclaron para obtener una mezcla homogénea, se analizó mediante análisis FTIR, en la Figura 5.15 se observan las señales obtenidas, los grupos funcionales fueron identificados mediante bibliografía y se presentan en la Figura 5.16.

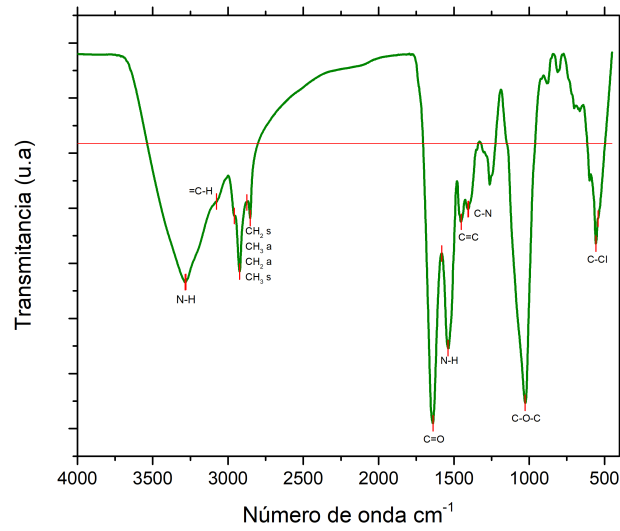


Figura 5.16: Grupos funcionales identificados en el espectro FTIR de la microalga *Scenedesmus dimorphus* cultivada en FBR

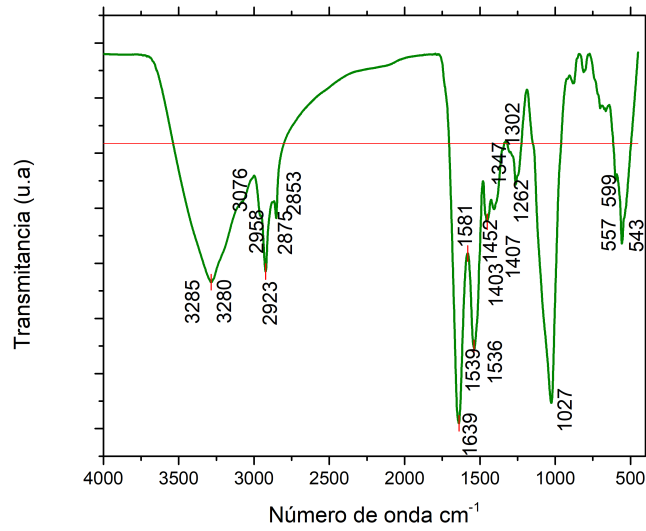


Figura 5.15: Espectro FTIR de la microalga *Scenedesmus dimorphus* cultivada en FBR

Tabla 5.21: Bandas FTIR encontradas en *Scenedesmus dimorphus* cultivada en FBR

Biomasa FBR	Rango de número de onda cm^{-1}	Grupo funcional	Referencia
543			
547	400-800	C-Cl	[200]
599			
1490-1710 Banda de carbohidratos [201]			
1027	980-1072	C-O-C polisacáridos	[202]
1262			[203]
1302	1230-1310	C-N amida secundaria	
1347	1191-1356	P=O ác. nucleicos fosfodiéster	[202]
1403			
1407	1390-1430	C-N estiramiento	[203]
1452	1392-1460	C-O	[204]
1450-1720 Banda de aminoácidos [205]			
1490-1710 Banda de proteínas [201]			
1452	1450-1456	CH_2, CH_3 lípidos y proteínas	[202]
1536			[203]
1539	1515-1570	N-H amida secundaria	
1581	1565-1615	C=N, C=C	[200]
1639	1630-1680	C=O amida secundaria	[203]
2800-3000 Banda de lípidica [201]			
2853			[200]
2875			
2923	2850-2960	CH_2 simétrico ác. nucleicos	
2958			
3076	3000-3100	=C-H	[200]
3280			
3285	3170-3370	N-H amida secundaria	[203]

Debido a la extracción de los aceites con cloroformo-metanol, se obtienen señales en el rango 543 a 599, que caen dentro de la banda correspondiente al enlace C-Cl del cloroformo, lo que indica la presencia de solvente residual en el aceite. Se encuentran los grupos funcionales correspondientes a la formación de carbohidratos, lípidos y proteínas. En estudios previos se ha demostrado el contenido de proteínas en la biomasa de *Scenedesmus dimorphus* [19].

En la Tabla 5.21 se enlistan las señales obtenidas en el análisis, así como los grupos funcionales a los que corresponde, la biomasa de *Scenedesmus dimorphus* cultivada en FBR plano almacenó en su estructura alquenos, confirmados por las bandas 1581 y 3076 cm^{-1} , ácidos nucleicos en las bandas, 1347, 2853 a 2958, además de la presencia de proteínas confirmada por las señales 1262, 1302, 1403,

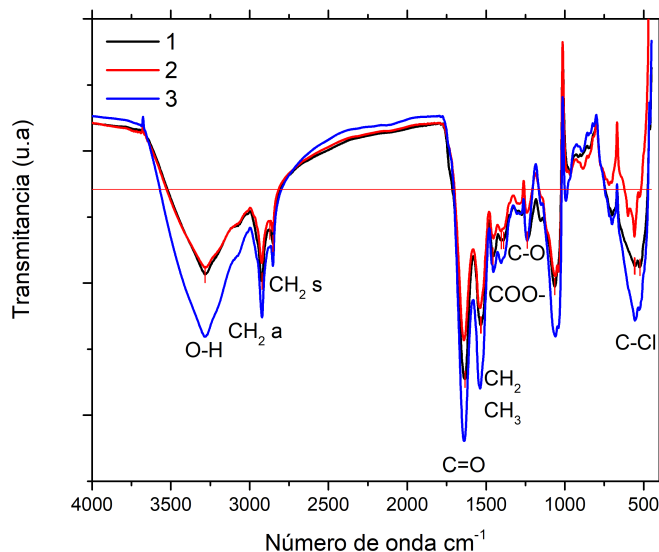


Figura 5.17: Grupos funcionales identificados mediante FTIR del aceite de la microalga *Scenedesmus dimorphus* cultivada en FBR

1407, 1452, 1536, 1539 1639, 32880 y 3285. Las señales sobrepuestas de los grupos C=O en conjunto con las señales 1581, 3076 y 2853 a 2958 confirman la presencia de ácidos grasos con dobles enlaces.

Los resultados obtenidos coinciden con los reportados en otras especies de *Scenedesmus*, Dileck et al. [202] y Zhang et al. [206] hallaron los grupos funcionales C-O-C, P=O, N-H, C=O, CH₂ y CH₃ en las especies *S. oblicuos* y *S. sp.* Arif et al. [40] también encontró los grupos mencionados anteriormente, además de C-O y C=O en *Tetradesmus dimorphus* conocida como *Scenedesmus dimorphus*.

5.4.3. Perfil de lípidos de biomasa cultivada en FBR

Se realizó la extracción de los lípidos de la biomasa cultivada en el FBR plano mediante la extracción con solventes asistida con ultrasonido como se describió en la metodología, los lípidos se analizaron mediante espectrometría FTIR, los espectros se muestran en la Figura 5.17 y el detalle de los picos se muestran en la Tabla 5.22.

Tabla 5.22: Picos del espectro FTIR del lípido de *Scenedesmus dimorphus* cultivada en FBR

1	2	3	Rango	Grupo funcional	Referencia
	1039	1041		C-O	
1064	1060	1059	900-1200	polisacáridos	[204]
1403		1404	1392-1460	C-O grupo carboxilo	
1456	1453	1454	1425-1477	CH ₂ , CH ₃ lípidos	[202]
1535	1536	1537	1530-1560	N-H, C-N proteínas	[200]
	1581	1582	1590-1699	COO- grupo carboxilo	
1633	1640	1639	1638-1655	C=O amida I	[204]
2852		2852	2850±3	CH ₂ s ¹ fosfolípidos	
2922	2923	2922	2920±3	CH ₂ a ² fosfolípidos	[200]
3283	3280	3283	2500-3500	O-H ác. carboxílicos	[203]

La biomasa de la microalga *Scenedesmus dimorphus* contenía proteínas y carbohidratos además de lípidos, debido a la naturaleza de la biomasa se pueden observar señales en las longitudes 1040,1060,1536 cm⁻¹ pertenecientes a polisacáridos y proteínas, además del enlace C=O en el rango de la amida I [200,204]. Grace et al. [207] también reportó la presencia de señales correspondientes a polisacáridos, amidas e incluso a ácidos nucleicos en la espectroscopia FTIR realizada a los lípidos extraídos de *Chlamydomonas sp.*, *Pseudomuriella sp.* y *Monoraphidium contortum*.

Para la identificación de ésteres alifáticos se deben presentar las señales correspondientes a los grupos funcionales C=O y C-O, correspondientes a los rangos 1730-1750 cm⁻¹ y 1100-1300 cm⁻¹ [200]. O bien la regla de las tres bandas, la primera banda corresponde al enlace C=O entre 1735-1750 cm⁻¹, la segunda a los enlaces C-C y C-O llamada C-C-O entre 1160-1210 cm⁻¹, que se puede presentar cercana a 1240 cm⁻¹ cuando el carbono extremo es un radical metil y forma un acetato, finalmente la tercera banda corresponde a la vibración del enlace O-C-C 1030-1000 cm⁻¹. En base a lo anterior el lípido obtenido de la biomasa cultivada en el FBR de capa plana durante 15 días no contiene ésteres.

La Figura 5.17 muestra los grupos funcionales encontrados en la espectroscopía FTIR, la presencia de los grupos C-O, COO-, O-H de grupos carboxilo y los radicales CH₂ y CH₃ indican la presencia de ácidos carboxílicos. Esta técnica no ha sido utilizada para la identificación de los lípidos de microalga, sin embargo, se ha reportado el contenido de ácidos carboxílicos en los lípidos de *Scenedesmus dimorphus*, entre ellos el ácido palmítico, ácido oleico y ácido linolénico [36,42].

5.5. EVALUACIÓN DE LA BIORREMEDIACIÓN *IN VITRO*

Se establecen cultivos de *Scenedesmus dimorphus* en botellas PET de 5 L previamente desinfectadas a un volumen de trabajo de 4 L con un 20 % de inóculo y 80 % de agua de laguna tratada como medio de cultivo, midiendo condiciones iniciales y finales de DQO, NO₃⁻¹ Y PO₄⁻³, el crecimiento se desarrolla bajo condiciones de temperatura y radiación naturales, durante 40 días. Aleatoriamente se registra la iluminación del día y la temperatura ambiente. En la Tabla 5.23 se reportan las concentraciones del inóculo, la temperatura ambiental e iluminación promedio durante el tiempo de cultivo, las concentraciones iniciales y finales son utilizadas para calcular la productividad, en base a la concentración final, el volumen total y la biomasa obtenida se estima el porcentaje de cosecha obtenido por el método seleccionado.

En la Tabla 5.24 se reportan los parámetros NO₃⁻¹, PO₄⁻³, DQO iniciales, finales y los porcentajes de remoción de nutrientes en cada uno de los cultivos. En la Figura 5.18 se ilustran los cultivos de *Scenedesmus dimorphus* en crecimiento. Por otro lado, en la Figura 5.19 se observan las curvas de crecimiento contruidas con la Ecuación 5.3.1.

La productividad de biomasa de *Scenedesmus dimorphus* obtenida en 40 días de cultivo fue de 0.030 ± 0.008 g/L día, obtenida con sedimentación gravitacional del 74.28 ± 5.52% de eficiencia. la productividad de los cultivos en botes de 4 L fue mayor a la productividad obtenida en el FBR, esto se atribuye al periodo de cultivo. La remoción fue del 74.24 ± 27.99% de nitratos, 35.59 ± 36.97% de



Figura 5.18: *Cultivos de Scenedemus dimorphus en PET*

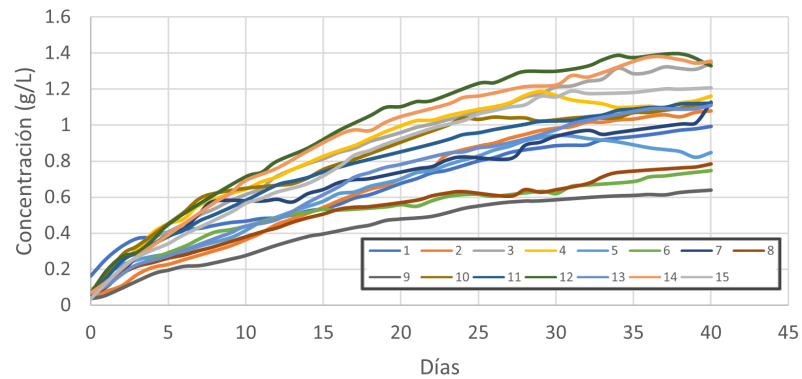


Figura 5.19: Curvas de crecimiento de *Scenedesmus dimorphus*

Tabla 5.23: Cultivos de *Scenedesmus dimorphus* en botellas PET de 5 L

Exp.	Cinóculo (g/L)	Temp.	Lux	C_i (g/L)	C_f (g/L)	Prod. (g/L d)	Biomasa obtenida (g)	% Cosecha
1	0.57	27.60	3208.35	0.115	1.315	0.030	4.02	80.50
2	0.13	27.72	2903.08	0.125	1.185	0.027	3.61	84.95
3	0.41	28.32	2548.97	0.080	1.580	0.038	4.71	78.45
4	0.35	28.60	2568.64	0.060	1.555	0.037	4.44	75.18
5	0.35	28.60	2568.64	0.055	1.030	0.024	2.47	63.11
6	0.32	30.26	2086.39	0.140	1.030	0.022	2.95	75.37
7	0.21	30.64	1972.21	0.215	1.270	0.026	3.41	70.73
8	0.21	30.64	1972.21	0.175	0.940	0.019	2.82	78.89
9	0.15	30.15	2625.06	0.100	0.770	0.017	2.39	66.91
10	0.31	29.39	3486.59	0.060	1.340	0.032	4.00	78.55
11	0.29	29.39	3486.59	0.070	1.530	0.037	4.67	80.32
12	0.28	27.81	5937.46	0.170	1.850	0.042	5.17	73.54
13	0.30	27.68	6088.36	0.150	1.340	0.030	3.78	74.23
14	0.30	27.68	6088.36	0.150	1.910	0.040	4.84	66.69
15	0.23	27.34	5119.84	0.095	1.430	0.033	3.89	71.59

Tabla 5.24: Remoción de nutrientes en los cultivos de *Scenedesmus dimorphus* en botellas PET de 5 L

Exp.	$\text{NO}_3^{-1}{}_i$ (ppm)	$\text{PO}_4^{-3}{}_i$ (ppm)	DQO _i (ppm)	$\text{NO}_3^{-1}{}_f$ (ppm)	$\text{PO}_4^{-3}{}_f$ (ppm)	DQO _f (ppm)	% Rem NO_3^{-1}	% Rem PO_4^{-3}	% Rem DQO
1	29.8	0.9	303.72	17.8	0.48	82.08	40.27	46.67	75.18
2	25.2	0.9	127.64	20.4	0.90	109.44	19.05	0	12.20
3	13	0.9	145.92	6.9	0.12	72.96	46.92	86.67	50
4	20.9	0.9	383.04	0.3	0.15	221.92	98.56	83.33	42.06
5	16.8	0.9	97.28	0	0.9	87	100	0	10.57
6	12.1	0.9	79.04	1	0.19	51.68	91.74	78.89	34.62
7	17	0.9	130.72	4.2	0.9	75.98	75.29	0	41.88
8	18.8	0.9	133.6	0.1	0.26	108.8	99.47	71.11	18.66
9	11.2	0.9	109.44	8	0.27	70.4	28.57	70	35.67
10	14.1	0.9	236.8	1.4	0.72	73.6	90.07	20	68.92
11	20.5	0.9	230.4	0.5	0.34	54.4	97.56	62.22	76.39
12	37.8	0.9	115.2	1.7	0.9	48	95.5	0	58.33
13	23.3	0.9	92.8	4.7	0.9	64	79.83	0	31.03
14	22.4	0.9	144.0	2.1	0.9	80.0	90.63	0	44.44
15	44.0	0.9	233.6	17.5	0.9	115.2	60.23	0	50.68

fosfatos y $43.37 \pm 20.75\%$ de DQO, las elevadas desviaciones estándar se deben a las condiciones no controladas de concentración de inóculo, temperatura, luz, fotoperiodo y concentraciones de nutrientes en el medio de cultivo.

En la Figura 5.19 se observa que en el día 40 el crecimiento se encontraba comenzando la fase estacionaria, las concentraciones oscilaron de 0.61 a 1.38 g/L, las tasas de remoción reflejan el contenido de nutrientes, por lo tanto, se concluye que el cultivo puede seguir creciendo después de 40 días.

Las temperaturas ambientales de la zona registradas durante los cultivos fueron de 28.78 ± 1.19 °C, las cuales se encuentran dentro del rango de crecimiento de las microalgas.

Los inóculos que suelen utilizarse para los cultivos son del 10% en volumen, en algunos casos por número de células, en éste caso se optó por utilizar un 20% de inóculo, además de medir su concentración con la curva de calibración, el cual fue de 0.29 ± 0.10 g/L.

Los datos obtenidos son insuficientes para generar un modelo del comportamiento del crecimiento microalgal bajo condiciones naturales de radiación y temperatura, debido a que también la concentración de nutrientes del medio de cultivo es variable. Sin embargo, se puede concluir que el agua de la laguna El Conejo puede bioremediarse con el crecimiento de *Scenedesmus dimorphus*, reduciendo la contaminación por nitratos y DQO en $74.24 \pm 27.99\%$ y $43.37 \pm 20.75\%$ respectivamente, aprovechando el fotoperiodo natural y sin la necesidad de utilizar una fuente de irradiación artificial o nutrientes adicionales.

Productividad de lípidos

Se determinó la productividad y el rendimiento de lípidos obtenidos en los cultivos con las Ecuaciones 3.3.2 y 3.3.3 descritas en el capítulo 3. Los resultados se detallan en la Tabla 5.25, no se consideró necesario evaluar la composición de la biomasa obtenida en esta etapa, debido a que en el etapa anterior se confirmó la presencia de carbohidratos, lípidos y proteínas en la biomasa de *Scenedesmus dimorphus*.

Tabla 5.25: Productividad y rendimiento de lípidos de *Scenedesmus dimorphus* cultivada en botellas PET de 5 L

Exp.	Biomasa (g)	Lípidos (g)	Productividad (mg/L d)	Rendimiento
1	4.02	0.1634	1.08	4.06
2	3.61	0.2722	1.79	7.53
3	4.71	0.3342	2.20	7.10
4	4.44	0.8095	5.33	18.22
5	2.47	0.4615	3.04	18.68
6	2.95	0.7844	5.16	26.59
7	3.41	0.4251	2.80	12.45
8	2.82	0.4028	2.65	14.29
9	2.39	0.3587	2.36	15.01
10	4.00	0.5585	3.67	13.96
11	4.67	1.2081	7.95	25.87
12	5.17	0.639	4.20	12.36
13	3.78	0.5752	3.78	15.22
14	4.84	0.912	6.00	18.84
15	3.89	0.5732	3.77	14.74

La productividad de lípidos fue de 3.71 ± 1.79 mg/L/día y una concentración 0.14 ± 0.07 g/L, mientras que el rendimiento fue de 14.99 ± 6.23 %. *Scenedesmus dimorphus* ha presentado mayores concentraciones de lípidos al cultivarse en medio BG-11 y en aguas residuales de ácido láctico con y sin nutrientes adicionales, 1.04, 1.15 y 1 g/L de lípidos respectivamente, utilizando fuentes de luz de 1500 lux [42]. Cabe destacar que la investigación y desarrollo de biocombustibles a partir de microalgas debe ser sustentable y económicamente viable, por lo cual, se deben minimizar los recursos energéticos para su producción.

Por otro lado, el rendimiento obtenido en éste proyecto fue menor al que presentó *Scenedesmus dimorphus* cuando se cultivo en aguas residuales municipales bajo el fotoperiodo 16:8 y $150 \mu\text{mol}/\text{m}^2$, que fue del 35 % [36]. También fue menor al rendimiento obtenido cuando se cultivo en medio BG-11 con 0.1 g/L de urea añadida con un 34 % de lípidos [78], el bajo rendimiento de lípidos se atribuye al cultivo bajo condiciones ambientales, los fotoperiodos naturales de la zona varían de 10.5 a 13.5 horas de luz, estudios afirman que la intensidad luminosa y el fotoperiodo tienen influencia en la síntesis de compuestos orgánicos, metabolismo de nutrientes y generación de biomasa [66, 100, 105, 208].

Perfil lipídico del aceite obtenido de *Scenedesmus dimorphus*

En la Figura 5.20 se muestran los espectros de cada una de las muestras, en la Figura 5.21 se indican los grupos funcionales correspondientes a las señales encontradas en los espectros FTIR. El detalle de las bandas y grupos funcionales se enlista en la Tabla 5.26.

Se confirma la presencia de ésteres con base en la regla de las tres bandas propuesta de Smith [203], ($1030\text{-}1100 \text{ cm}^{-1}$ O-C-C), ($1160\text{-}1210 \text{ cm}^{-1}$ C-C-O) y ($1730\text{-}1750 \text{ cm}^{-1}$ C=O) excepto en las muestras 6, 7 y 10 al 15. Stuart [200] afirma que la presencia de las señales en las bandas principales C=O ($1730\text{-}1750 \text{ cm}^{-1}$) y C-O ($1100\text{-}1300 \text{ cm}^{-1}$) son suficientes para indicar la presencia de ésteres, donde las muestras 6 y 9 no cumplen los criterios. Las muestras 6 y 9 también presentan señales en la

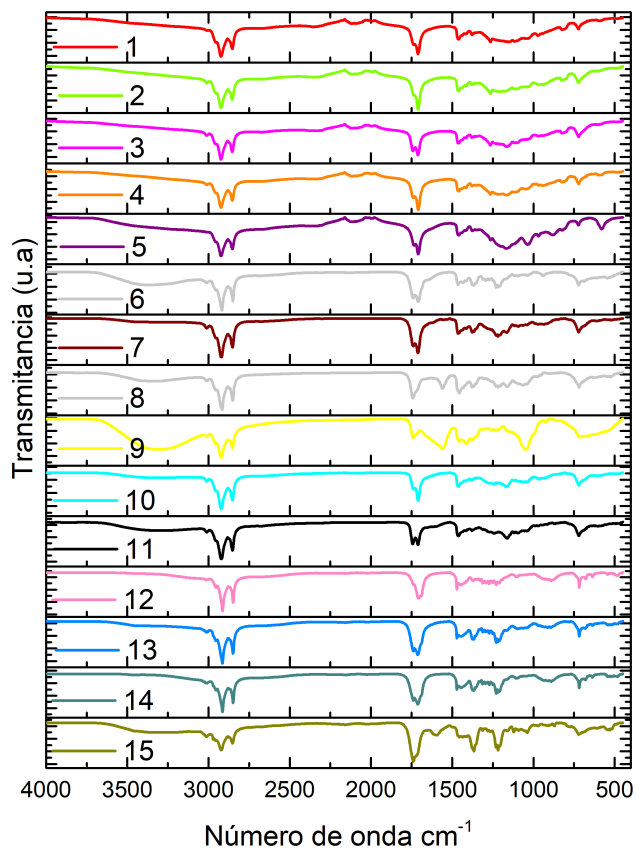


Figura 5.20: Espectros de aceites de *Scenedesmus dimorphus*

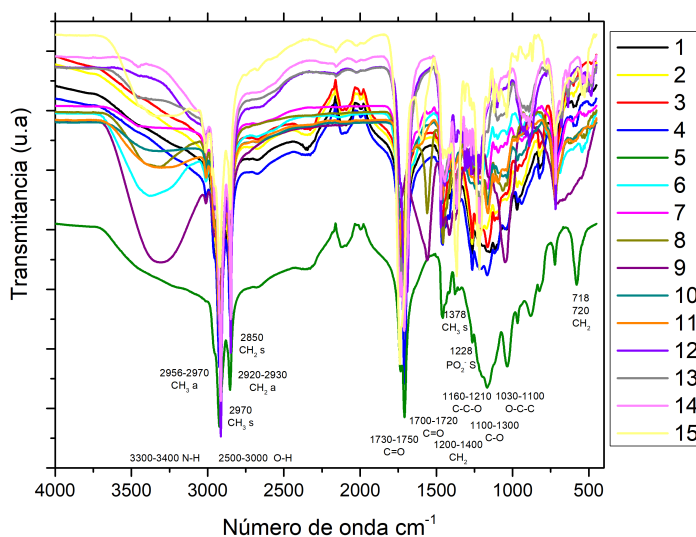


Figura 5.21: Grupos funcionales identificados en los espectros de aceites de *Scenedesmus dimorphus*

Tabla 5.26: Picos del espectro FTIR del lípido de *Scenedesmus dimorphus* obtenido de la biorremediación del agua de laguna El Conejo

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Rango	Grupo funcional
941				720	720	720	719	718	721	720	718	718	718	718	718-720	CH ₂
			1046					1048							900-960	O-H fuera del plano
															1047 ±2	C-O-P
		1038	1039	1035			1039									
1040			1046					1048							1030-1100	O-C-C
1051	1051		1051					1051								
							1064									
1071																
1098	1099															
1116	1118	1118														
1116																
1148																
1163		1164	1165	1167		1165	1162		1165	1162						
1171																
1192				1195											1100-1300	C-O éster
1196																
1206	1206		1207		1207	1207	1206				1209	1209	1209	1207		
1216	1217	1217	1217	1216		1217	1217					1217	1217	1217		
1228		1228	1228			1228	1229				1229	1229	1229	1229		
								1244								
1265	1265	1264														
																1272

Continúa en la siguiente página...

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Rango	Grupo funcional
1163		1164	1165	1167		1165	1162		1165	1162						
	1171														1160-1210	C-C-O
1192				1195												
1196																
	1206		1207		1207	1207	1206				1209	1209	1209	1207		
	1217	1217	1217	1216		1217	1217					1217	1217	1217		
1216																
1228		1228	1228			1228	1229		1244		1229	1229	1229	1229	1210-1400	CH ₂
	1265	1265	1264													
		1367				1366	1366				1272					
											1312			1366		
	1217	1217	1217	1216		1217	1217					1217	1217	1217		
1216																
1228		1228	1228			1228	1229				1229	1229	1229	1229	1210-1320	C-O Ác. carboxílicos
	1265	1265	1264						1244							
											1272					
		1228	1228			1228	1229				1229	1229	1229	1229	1228 ± 2	PO ₂ ⁻ s
1228																
	1378	1378			1377	1377	1377							1378		CH ₃ s
1378																
	1415	1418	1415					1415					1413		1395-1440	O-H dentro del plano
1417														1435		

Continúa en la siguiente página...

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Rango	Grupo funcional
														1435		
1458	1461	1458	1458	1457							1445	1445	1445		1425-1477	CH ₂ , CH ₃
1461	1461				1464	1463	1456			1463	1463		1455			
		1461									1471	1471			1460 ± 2	CH ₃ a
1461					1464	1463				1463	1463				1464 ± 2	CH ₂ tijera
											1471	1471			1472 ± 2	CH ₂ tijera
											1691				1590-1699	COO-grupos carboxi- licos
1710	1710	1709	1709	1709	1709	1710			1710	1710	1708	1711	1711		1710-1720	C=O grupos carboxi- licos
1735			1739	1734		1739			1739		1736	1738	1738	1738	1730-1750	C=O
1735		1741					1741	1740		1743						
					2850	2852	2851		2852	2852	2849	2849	2849	2852	2850 ± 2	CH ₂ s
							2871				2871	2871	2871		2870 ± 2	CH ₃ s
2854	2854	2854	2853	2850	2850	2852	2851		2852	2852	2849	2849	2849	2852	2850-2875	CH ₂ ,CH ₃
							2871				2871	2871	2871			
											2871	2871	2871			

Continúa en la siguiente página...

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Rango	Grupo funcional
2923	2923	2923	2923	2923	2923	2921	2921	2921	2921	2921	2921	2921	2921	2921	2920-2930	CH ₂ s
2954	2954	2954	2954	2954	2954	2955	2955	2955	2954	2954	2954	2954	2954	2954	2956±2	CH ₃ a
								3011						2970	2960-2970	CH ₃
														3012	3010 ± 2	=CH
								3011						3012	3000-3050	=CH ₂ s
								3297								
					3367			3303							33000-34000	N-H
					3378			3316								
								3322								
								3330								
								3343								
					2850	2852	2851		2852	2852	2849	2849	2849	2852	2500-3500	O-H ác. carboxílicos
2854	2854	2854	2854	2853	2850	2852	2851		2852	2852	2849	2849	2849	2852		
							2871				2871	2871	2871			
2923	2923	2923	2923	2923		2921			2921	2921	2921	2921	2921	2921		
	2954	2954			2954		2955	2955	2954		2954	2954	2954	2954		
														2970		
								3011						3012		
								3290								
								3297								
					3367			3303								

Continúa en la siguiente página...

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Rango	Grupo funcional
					3378			3316								
								3322								
								3330								
								3343								

banda correspondiente a N-H, pueden deberse a un arrastre de proteínas, y al traslape de la señal OH de los ácidos carboxílicos. Los lípidos de las muestras 9 y 15 presentan el estiramiento =CH que se atribuye a un ácido graso poliinsaturado en la mezcla de lípidos, el enlace confirmatorio C=C no suele reflejarse en el espectro FTIR, debido a su naturaleza vegetal, los lípidos de microalgas en gran parte son los lípidos de membrana llamados fosfolípidos, ubicados en las bandas 3010, 2956, 2920, 2870, 2850, 1730, 1473, 1472, 1468, 1463, 1460, 1405, 1378, 1400–1200, 1228, 1170, 1070, 1047, 972, 730, 720, 718 cm^{-1} [200]. En resumen, los lípidos obtenidos contienen ésteres, ácidos carboxílicos y fosfolípidos.

5.6. EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL FOTOPERÍODO

Se establecen los cultivos en las condiciones descritas en la metodología, la Figura 5.22 muestra el ejemplo del sistema utilizado.

En las Tablas siguientes se presentan los resultados obtenidos bajo los cuatro fotoperiodos estudiados, F1 (10.5:13.5 L:O), F2 (11.5:12.5 L:O), F3 (12.5:11.5 L:O), F4 (13.5:10.5 L:O). La Tabla 5.27 muestra las productividades de biomasa obtenidas, mientras que la Tabla 5.28 muestra los resultados del análisis de varianza (ANOVA) de dichas productividades.



Figura 5.22: Cultivos de *Scenedesmus dimorphus* en PET de 1.5 L

Tabla 5.27: Productividad de biomasa en ambos medios de cultivo bajo los diferentes fotoperiodos analizados

Factor A Medio de cultivo	Factor B - Productividad de biomasa g/Ldía			
	F1(10.5:13.5)	F2(11.5:12.5)	F3(12.5:11.5)	F4(13.5:10.5)
Agua de laguna	0.055	0.043	0.040	0.023
	0.054	0.050	0.033	0.025
	0.052	0.041	0.035	0.023
Bayfolan al 0.3 %	0.038	0.036	0.033	0.023
	0.038	0.036	0.033	0.023
	0.036	0.036	0.033	0.026

Tabla 5.28: Resultados del análisis ANOVA de las productividades de biomasa en ambos medios de cultivo bajo distintos fotoperiodos

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	de Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidades	Valor crítico para F
Muestra	0.0001706	1	0.000170667	27.489	8.042E-05	4.493
Columnas	0.0015143	3	0.000504778	81.306	6.692E-10	3.238
Interacción	0.000385	3	0.000128333	20.671	9.449E-06	3.238
Dentro del grupo	9.9333E-05	16	6.20833E-06			
Total	0.0021693	23				

La Ho es que las productividades de biomasa son iguales en todos los tratamientos, con un nivel de significancia del 0.05, de acuerdo con los resultados, se rechaza la Ho y se demuestra que existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de productividad de biomasa entre ambos

medios y los fotoperiodos de cultivo. Para identificar la diferencia entre los fotoperiodos se realiza el ANOVA de un solo factor y prueba de Tuckey para cada medio de cultivo.

Tabla 5.29: Resultados del análisis ANOVA de las productividades de biomasa obtenidas para agua de laguna eutrofizada

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidades	Valor crítico para F
Entre grupos	0.001471	3	0.000490333	50.29	1.55 E-05	4.0661
Dentro de los grupos	0.00078	8	0.00000975			
Total		11				

Tabla 5.30: Prueba de Tuckey HSD de las productividades de biomasa para agua de laguna eutrofizada en los fotoperiodos analizados

	F1	F2	F3	F4
F1	-	0.0090	0.0177	0.0300
F2	-	-	0.0087	0.0210
F3	-	-	-	0.0123
F4	-	-	-	-

Los resultados del ANOVA de un solo factor para los resultados de las productividades de biomasa en agua de laguna eutrofizada se muestran en la Tabla 5.29, con base en los resultados, se rechaza la H_0 , es decir, existe diferencia significativa en el promedio de la productividad de biomasa entre los cuatro fotoperiodos evaluados. Los resultados de la prueba de HSD de Tuckey con un nivel de significancia de 0.05 se muestran en la Tabla 5.30, $HSD=0.00816$ y probabilidad de 1.55 E-05, se observa variación entre los fotoperiodos F1 y F2, F1 y F3, F1 y F4, además F2 y F3, F2 y F4, F3 y F4, la mayor diferencia de medias se observa entre los fotoperiodos F1 y F4.

Tabla 5.31: ANOVA de las productividades de biomasa obtenidas en Bayfolan 0.3%

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidades	Valor crítico para F
Entre grupos	0.00042833	3	0.000142778	53.54	1.22 E-05	4.0661
Dentro de los grupos	2.1333 E-05	8	2.66667 E-06			
Total		11				

Se realizó el ANOVA de un solo factor para los resultados de las productividades de biomasa en Bayfolan 0.3 %, mostrado en la Tabla 5.31, con base en los resultados se rechaza la H_0 , es decir, existe diferencia significativa en el promedio de la productividad de biomasa entre los cuatro fotoperiodos evaluados. Los resultados de la prueba de HSD de Tuckey con un nivel de significancia de 0.05 se muestran en la Tabla 5.32, $HSD=0.00427$ y probabilidad de 1.22×10^{-5} , se observa variación entre los fotoperiodos F1 y F4, F2 y F4, F3 y F4.

Tabla 5.32: Prueba de Tuckey HSD de las productividades de biomasa en Bayfolan 0.3 %

	F1	F2	F3	F4
F1	-	-0.000666667	-0.003	0.012333333
F2	-	-	-0.002333333	0.013
F3	-	-	-	0.015333333
F4	-	-	-	-

Como se muestra en la Figura 5.23, la productividad de biomasa en los cultivos con agua de laguna eutrofizada decrece a medida que se incrementan las horas de luz, por otro lado, en los cultivos con Bayfolan al 0.3 % se observa un ligero incremento de productividad, alcanzando un máximo $0.032 \text{ g/Ldía} \pm 0.0005$ en el fotoperiodo tres, sin embargo, al aumentar las horas luz en el fotoperiodo cuatro la productividad cae drásticamente a $0.024 \pm 0.0017 \text{ g/Ldía}$. En la Figura 5.24 se muestran las curvas de crecimiento de los cultivos en agua de laguna y en la Figura 5.25 los cultivados en Bayfolan al 0.3 % como medio de control.

Se realizó una curva de calibración de absorbancia contra concentración en peso seco de biomasa de *Scenedesmus dimorphus* para representar en la Figura 5.24 las curvas de crecimiento de *Scenedesmus dimorphus* en agua de laguna eutrófica y en la Figura 5.25 las curvas de crecimiento en bayfolan al 0.3 %. En la Figura 5.24 se observa una disminución en la concentración de biomasa en peso seco a

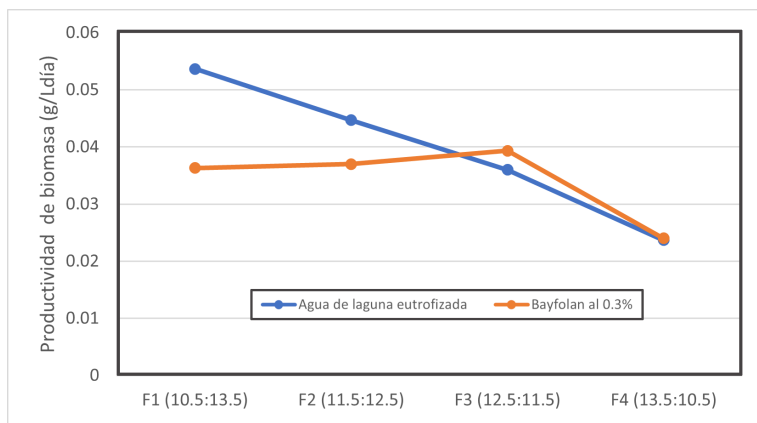


Figura 5.23: Comportamiento de las productividades de biomasa en los fotoperiodos analizados

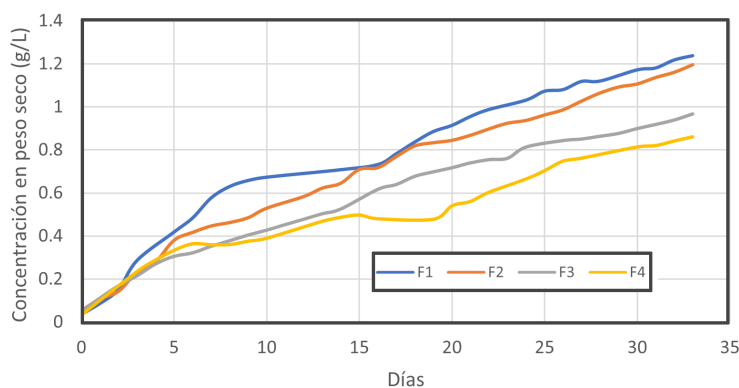


Figura 5.24: Curvas de crecimiento de *Scenedesmus dimorphus* cultivada en agua de laguna eutrofizada en agua de laguna El Conejo

medida que se incrementan las horas luz del fotoperiodo, la concentración máxima fue de 1.23 g/L en F1 y la mínima de 0.86 g/L en F4, las curvas de crecimiento no alcanzaron la fase estacionaria.

En la Figura 5.25 se observa una concentración máxima de 1.38 g/L en el F1, una concentración mínima de 1.08 g/L en el F4 al término del cultivo, sin embargo, en éste medio de cultivo no se observa la fase de crecimiento estacionario para los fotoperiodos F1, F2 y F3, sólo en el F4, en el día 22 se observa una concentración de 1.12 g/L en el día 22, esto implica que a mayor tiempo de exposición de luz en el fotoperiodo el crecimiento es más veloz, alcanzando su fase de crecimiento estacionaria seguida de la fase de muerte.

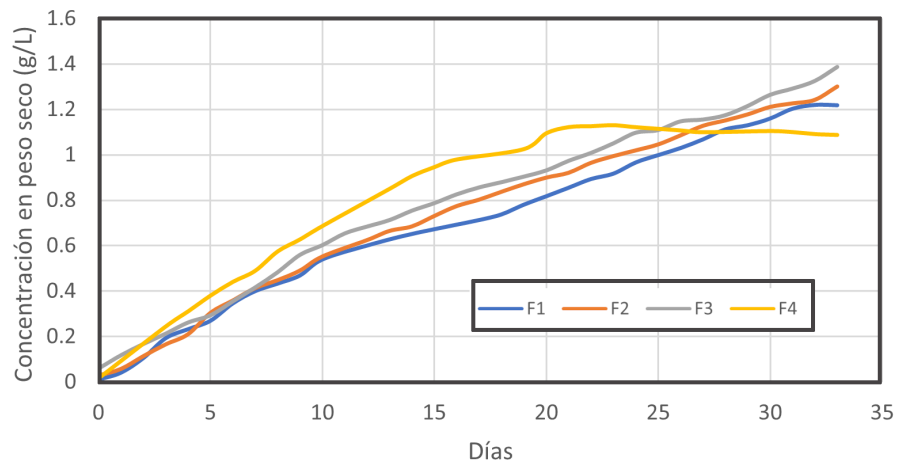


Figura 5.25: Curvas de crecimiento de *Scenedesmus dimorphus* cultivada en Bayfolan al 0.3%

Tabla 5.33: Porcentaje de remoción de demanda química de oxígeno (DQO) en ambos medios de cultivo bajo los diferentes fotoperiodos analizados

Factor A Medio de cultivo	Factor B - Remoción de DQO (%)			
	F1(10.5:13.5)	F2(11.5:12.5)	F3(12.5:11.5)	F4(13.5:10.5)
Agua de laguna	95.1	93.1	87.8	59.9
	97.1	91.9	82.5	61
	94.5	91.0	80.5	60.5
Bayfolan al 0.3 %	59.5	89.0	87.2	43.6
	60.1	87.6	89.6	40.8
	61.2	89.1	89.7	45.1

Tabla 5.34: Resultados del análisis ANOVA del porcentaje remoción de DQO en ambos medios de cultivo bajo distintos fotoperíodo

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidades	Valor crítico para F
Muestra	868.8066667	1	868.8066667	247.25	3.758 E-11	4.49
Columnas	4986.058333	3	1662.019444	473.00	7.934 E-16	3.23
Interacción	1380.293333	3	460.0977778	130.94	1.805 E-11	3.23
Dentro del grupo	56.22	16	3.51375			
Total	7291.378333	23				

Tabla 5.35: Resultados del análisis ANOVA del porcentaje remoción de DQO obtenidos para agua de laguna eutrofizada

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidades	Valor crítico para F
Entre grupos	2240.995833	3	746.9986111	170.77	1.366 E-07	4.0661
Dentro de los grupos	34.99333333	8	4.374166667			
Total	2275.989167	11				

Tabla 5.36: Prueba de Tuckey HSD del porcentaje de remoción de DQO para agua de laguna eutrofizada en los fotoperiodos analizados

	F1	F2	F3	F4
F1	-	3.566666667	11.96666667	35.1
F2	-	-	8.4	31.5333333
F3	-	-	-	23.1333333
F4	-	-	-	-

En la Tabla 5.33 se presentan los resultados de los porcentajes de remoción de DQO en ambos medios de cultivo bajo los cuatro fotoperiodos analizados, mientras que en la Tabla 5.34 se presentan los resultados obtenidos del análisis de varianza de los datos. La Ho es que la remoción de DQO es igual

en todos los tratamientos, en base a los resultados se rechaza la H_0 y se demuestra que existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los porcentajes de remoción entre ambos medios de cultivo y los fotoperiodos evaluados. Se realizó el ANOVA de un factor y prueba de Tuckey para cada medio de cultivo con la finalidad de identificar la diferencia entre los fotoperiodos.

El ANOVA de un solo factor para los resultados de la remoción de DQO en agua de laguna eutrófica se muestra en la Tabla 5.35, con base en los resultados se rechaza la H_0 , es decir, existe diferencia significativa en la remoción de DQO. Los resultados de la prueba de HSD de Tuckey con un nivel de significancia de 0.05 se muestran en la Tabla 5.36, $HSD=5.46$ y probabilidad de $1.366 \text{ E-}07$, se observa variación entre los fotoperiodos F1 y F3, F1 y F4, además F2 y F3, F2 y F4, F3 y F4, la mayor diferencia de medias se observa entre los fotoperiodos F1 y F4.

El ANOVA de un solo factor para los resultados de la remoción de DQO en Bayfolan 0.3 % se muestra en la Tabla 5.37, con base en los resultados se rechaza la H_0 , es decir, existe diferencia significativa en la remoción de DQO entre los cuatro fotoperiodos. Los resultados de la prueba de HSD de Tuckey con un nivel de significancia de 0.05 se muestran en la Tabla 5.38, $HSD=4.26$ y probabilidad de $1.686 \text{ E-}09$, se observa variación entre los fotoperiodos F1 y F2, F1 y F3, F1 y F4, además F2 y F4, F3 y F4, la mayor diferencia de medias se observa entre los fotoperiodos F3 y F4.

Tabla 5.37: Resultados del análisis ANOVA del porcentaje remoción de DQO en Bayfolan 0.3 %

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidades	Valor crítico para F
Entre grupos	4125.35583	3	1375.11861	518.26	1.68 E-09	4.0661
Dentro de los grupos	21.2266667	8	2.6533333			
Total		11				

Tabla 5.38: Prueba de Tuckey HSD del % remoción de DQO en Bayfolan 0.3 %

	F1	F2	F3	F4
F1	-	-28.3	-28.56	14.43
F2	-	-	-0.26	42.73
F3	-	-	-	43
F4	-	-	-	-

Debido a que la biomasa presenta diferencias significativas en la productividad bajo los fotoperiodos F1 y F4 en ambos medios de cultivo, se realizó la caracterización con espectrofotometría FT-IR de la biomasa y la cromatografía de gases de los lípidos extraídos. Las muestras se identificaron considerando el medio y fotoperiodo de cultivo. ALF1 y ALF4 se refieren a la biomasa y lípido obtenido del cultivo en agua de laguna eutrofizada bajo los fotoperiodos F1(10.5:13.5) y F4(13.5:10.5), BF1 y BF4 se refieren a la biomasa y lípido obtenido del cultivo en Bayfolan 0.3 % bajo los fotoperiodos F1(10.5:13.5) y F4(13.5:10.5).

Influencia del fotoperiodo en las características de la biomasa

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) es una espectroscopia vibratoria molecular que disecciona grupos químicos funcionales en diferentes regiones de absorbancia entre 4000 y 400 cm^2 . Las tres composiciones celulares principales, por ejemplo, lípidos, proteínas y carbohidratos, tienen una absorbancia característica en diferentes regiones de frecuencia del espectro infrarrojo medio, lo que le da a FT-IR el potencial de ser una herramienta eficaz para las composiciones bioquímicas de microalgas [201].

La Figura 5.26 muestra el espectro de la biomasa liofilizada que fue cultivada en agua de laguna eutrofizada, mientras que la Figura 5.27 muestra el espectro de la cultivada en Bayfolan 0.3 %. En la Tabla 5.39 se muestra el detalle de las señales obtenidas en el análisis FTIR de cada una de las muestras agrupadas por rango de longitud de onda y su respectivo grupo funcional. Los resultados del análisis FTIR corresponden a la presencia de lípidos y ácidos carboxílicos, además de enlaces fosfodiésteres, característicos de los fosfolípidos presentes en las microalgas [64, 68].

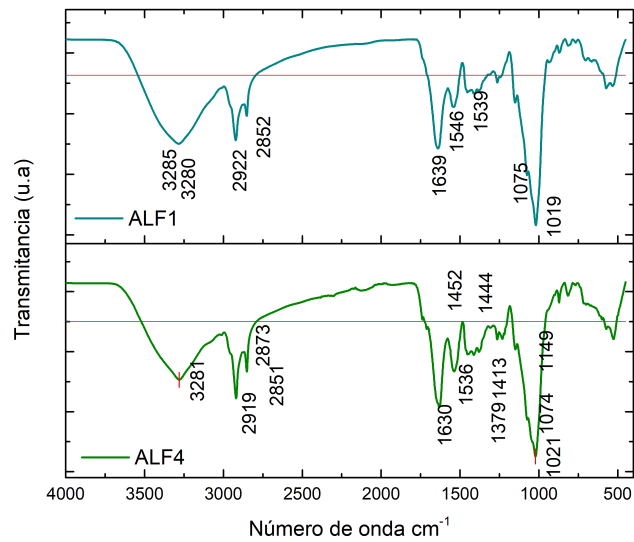


Figura 5.26: Espectros FTIR de *Scenedesmus dimorphus* cultivada en agua de laguna eutrofizada, bajo los fotoperiodos F1 y F4

Se realizó la identificación y contenido de lípido mediante cromatografía de gas, con la metodología AOAC 996.06 2001, los resultados se muestran en la Tabla .

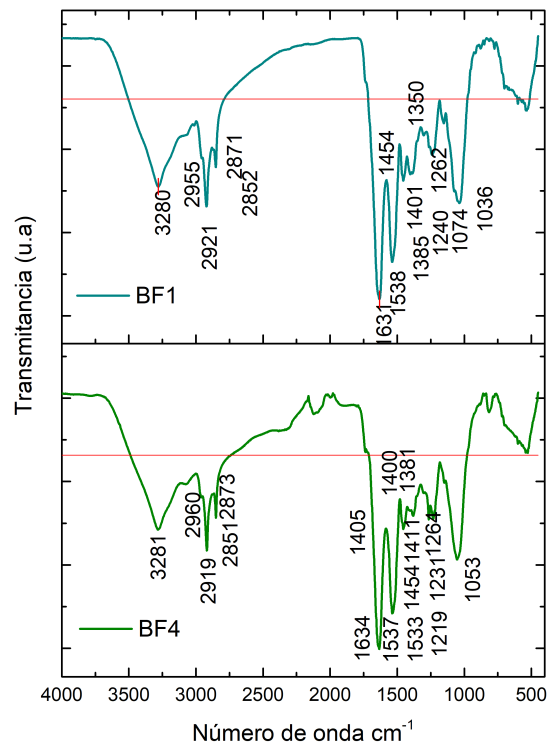


Figura 5.27: Espectros FTIR de *Scenedesmus dimorphus* cultivada en Bayfolan al 0.3%, bajo los fotoperiodos F1 y F4

Tabla 5.39: Bandas características en FTIR

ALF1	ALF4	BF1	BF4	Rango de número de onda cm^{-1}	Grupo funcional	Referencia
950-1200 Banda de carbohidratos [201]						
1019	1021	1036	1056	980-1072	C-O-C polisacáridos	[202, 209]
		1036	1053	1030-1099	P=O ác.nucleicos	[204]
1075	1074	1074				
1075	1074	1074		1070-1140	C-O-C	[203]
1151	1149			1134-1174	C-O-C polisacáridos	[202]
			1219	1210-1240	P=O ác. nucleicos	[207]
		1240				
		1240		1230-1244	P=O ác. nucleicos	[204]
		1240	1231	1230-1310	C-N amida secundaria	[203]
		1262	1264			
		1350		1191-1356	P=O ác. nucleicos fosfodiéster	[202]
	1379			1370-1398	CH ₃ ,CH ₂ ,C-O, proteínas y grupos carboxilos	[204]
	1413	1401	1400 1405 1411	1390-1430	C-N estiramiento amida	[203]
	1413 1444	1401	1400 1405 1411	1392-1460	C-O grupos carboxilo	[204]
1450-1720 Banda de aminoácidos [205]						
1490-1710 Banda de proteínas [201]						
	1452	1454	1454	1450-1456	CH ₂ ,CH ₃ lípidos y proteínas	[204]

Continúa en la siguiente pagina...

Tabla 5.39: Continua...

ALF1	ALF4	BF1	BF4	Rango de número de onda cm^{-1}	Grupo funcional	Referencia
1539	1536	1538	1533	1515-1570	N-H amida secundaria	[203]
1546			1537			
1639	1630	1631	1634	1630-1680	C=O amida secundaria	[203]
2800-3000 Banda de lípidica [201]						
2852	2851	2852	2851	2850-2960	CH ₂ simétrico ác.nucleicos	[200]
2874	2873	2871	2873	2960-2975	CH ₃ asimétrico lípidos	[204]
2922	2919	2921	2919	2916-2936	CH ₂ asimétrico, lípidos	[200]
		2955	2960	2952-2972	CH ₃ simétrico, lípidos	[200]
3280	3281	3280	3281	3170-3370	N-H amida secundaria	[203]
3285						

En la Figura 5.28 se observan los grupos funcionales identificados en el espectro FTIR de la microalga *Scenedesmus dimorphus* cuando se cultivo en agua de laguna y bayfolan al 0.3% bajo los fotoperiodos 1 y 4. Se identificó la presencia de los grupos funcionales que forman los carbohidratos, aminoácidos, proteínas y lípidos, debido a que las microalgas son organismos que se componen de estos compuestos [97]. Asimismo, Arif et al. [40] predijo la abundancia de carbohidratos, proteínas y lípidos por los picos correspondientes del espectro FTIR de grupos funcionales tales como grupos aldehído, carboxilo y éster de varias especies de microalgas. Las proteínas son una secuencia de amoniácidos, llamada estructura primaria, donde los enlaces amida secundarios unen las unidades repetidas en una proteína [203]. En el espectro infrarrojo se pueden observar 9 bandas de amidas, denominadas A, B, I- VII, entre ellas la

amida I es la más intensa que representa el enlace C=O que ocurre en la región 1600-1700 acoplada a la flexión N-H y C-N [205]. La amida I se observa en el rango 1585-1724 cm^{-1} , la amida II en el rango 1490-1585 cm^{-1} [201].

La muestra de biomasa obtenida en agua de laguna bajo fotoperiodo 1 (ALF1) no presenta señales entre 1191-1244 cm^{-1} correspondiente a la presencia de ácidos nucleicos, por otro lado, la confirmación de las amidas secundarias se da por la presencia de dos enlaces C-N y un enlace N-H, las amidas secundarias están presentes en las proteínas, a pesar de tener 4 señales en enlaces N-H no presenta las señales confirmatorias en C-N de una amida secundaria, sin embargo, presenta las señales 1639, 3280 y 3285 cm^{-1} , del grupo C=O y dos señales N-H, confirmando la presencia de una amida primaria [203].

El nitrógeno es un componente esencial en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos en las microalgas y se relaciona con su crecimiento [57]. De igual manera, la degradación de DQO se asocia a la productividad de biomasa.

La biomasa obtenida de los cultivos en agua de laguna con fotoperiodo cuatro (ALF4), y en bayfolan con los fotoperiodos uno (BF1) y cuatro (BF4) presentan las señales correspondientes a la presencia de

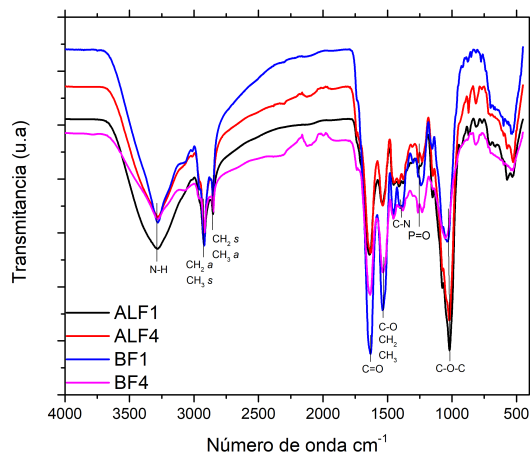


Figura 5.28: Grupos funcionales identificados mediante FTIR de la biomasa de microalga *Scenedesmus dimorphus*

amida I [205] y amida II [201], la presencia de amidas I y II es característica de cadenas proteicas [207]. Sólo la muestra BF4 presenta tres señales en el rango C-N estiramiento amida, y dos señales en el rango N-H de amida secundaria junto al grupo C=O de amida secundaria, considerando que las amidas secundarias enlazan las unidades repetidas de la proteína y deben presentarse dos señales en C-N, una en N-H y el C=O [203], se puede afirmar que sólo la muestra BF4 presenta dos amidas secundarias formadoras de proteína. Fernandez et al. [60] afirma que el uso de bayfolan en el cultivo de microalgas favorece el incremento de pigmentos y proteínas en las microalgas.

En cuanto a las bandas representativas de un perfil de lípidos se observa la similitud de las señales entre las muestras, los lípidos tienen bandas de absorción características, la banda de absorción del estiramiento C=O del éster y la vibración del estiramiento C-H en las cadenas de ácido alrededor de $2800-3000\text{ cm}^{-1}$, esta última puede caracterizar el contenido de lípidos [201]. Los grupos CH_3 y CH_2 asimétricos y simétricos en la banda $2800-3000$ son hidrocarburos de lípidos, estas señales son representativas de la acumulación de lípidos en microalgas [207], Por lo tanto se concluye que todas las muestras tienen el mismo perfil de lípidos.

Con respecto a la banda de $950-1200\text{ cm}^{-1}$ que caracteriza la absorción de los polisacáridos se puede concluir que las microalgas cultivadas en bayfolan presentan mayor contenido de carbohidratos.

Conclusiones y Trabajos Futuros

6.1. CONCLUSIONES

El agua de la laguna “El Conejo” es rica en materia orgánica, el rango de temperatura de la zona de estudio se encuentra dentro del rango de desarrollo de las microalgas, así como el pH neutro se mantiene constante a lo largo del muestreo y dentro del rango de crecimiento de microalgas, por lo cual, se puede utilizar como medio de cultivo para el crecimiento microalgal.

La relación entre los parámetros fisicoquímicos y la época es muy estrecha, los análisis estadísticos demostraron que la DQO se mantiene uniforme en toda la laguna a lo largo del semestre evaluado, mientras que la DBO₅ cambia con el tiempo, ya que es un parámetro más sensible al fotoperiodo de luz natural y la calidad de la radiación en la columna de agua, tiene influencia en la población de los

microorganismos presentes en el cuerpo de agua, a mayor actividad fotosintética mayor generación de oxígeno y por ende mayor degradación de la materia orgánica.

De acuerdo al historial de precipitación de los meses de julio a diciembre, se concluye que la lluvia no causa dilución de la contaminación del cuerpo de agua, es decir que la disminución de los parámetros de DQO y DBO₅ se debe a la capacidad de degradación natural del cuerpo de agua en estudio, la cual no es suficiente para degradar toda la carga de contaminantes.

El agua de la laguna "El Conejo" sirve como medio de cultivo para la microalga *Scenedesmus dimorphus*, previamente tratada térmicamente en autoclave a 121°C, 15 psi durante 5 min, éste pretratamiento fue eficaz en la eliminación de microorganismos. El pretratamiento es necesario para la eliminación de *Planthotrix sp.* y posterior biorremediación del agua aprovechando la capacidad de crecimiento mixotrófico de la especie *S. dimorphus*.

El FBR plano con sedimentador dimensionado en éste trabajo permite el crecimiento de *S. dimorphus*, la alimentación de medio de cultivo e inoculación en un ambiente estéril, la aireación del cultivo, el monitoreo de la temperatura, toma de muestras, además de la sedimentación de la biomasa. La productividad de biomasa obtenida en las pruebas, fue de 0.016 g/L día, este bajo valor se atribuye al corto periodo de cultivo, la caracterización FTIR de la biomasa confirma la presencia de ácidos carboxílicos y ausencia de ésteres en los lípidos.

La eficiencia de sedimentación gravitacional en el FBR con sedimentador fue de $76 \pm 0.95\%$, mayor que la eficiencia de sedimentación en los botes PET de 5L de capacidad, la cual fue de $74.28 \pm 5.52\%$.

El agua de la laguna El Conejo puede ser biorremediada mediante el crecimiento de *Scenedesmus dimorphus* bajo temperatura, fotoperiodo e irradiación natural, obteniendo 0.030 g/L día de productividad de biomasa, y la remoción de $74.24 \pm 27.99\%$ de nitratos y $43.37 \pm 20.75\%$ de DQO.

Los lípidos extraídos de la biomasa obtenida de la biorremediación del agua de la laguna El Conejo, tienen una productividad de 3.71 ± 1.79 mg/L/día, concentración 0.14 ± 0.07 g/L, rendimiento de 14.99 ± 6.23 % de lípidos totales, que se conforman de ésteres de triglicéridos, ácidos carboxílicos y fosfolípidos.

Los ANOVA demostraron que existen diferencias significativas en la productividad de biomasa y remoción de DQO en ambos medios de cultivo. Las pruebas de Tuckey demostraron que la mayor diferencia entre productividades de biomasa y remoción de DQO para los cultivos en agua de laguna eutrofizada se da entre los fotoperiodos 1 y 4, el incremento de horas de luz produce una disminución en la productividad de biomasa y remoción de DQO, la mayor productividad de biomasa se obtuvo en el fotoperiodo 1 con 10.5:13.5 horas L:O, 0.054 g/Ld y una remoción del 95.6 %.

En los cultivos realizados en bayfolan 0.3 % la prueba de Tuckey demuestra que no se observan diferencias significativas en la productividad de biomasa en los fotoperiodos 1, 2 y 3, sin embargo, si se observan diferencias significativas en la remoción de DQO entre los grupos, excepto F2 y F3, la mayor diferencia se observa entre F3 y F4. Por lo tanto, en los cultivos bajo los fotoperiodos 2 y 3, con 11.5:12.5 y 12.5:11.5 horas L:O, se obtendrían productividades de biomasa y remoción de DQO sin diferencias significativas.

6.2. TRABAJOS FUTUROS

Después de comprobar la productividad de biomasa de *Scenedesmus dimorphus* en el agua eutrofizada de la laguna El Conejo y tener conocimiento de la presencia de metales en los sedimentos de dicha laguna [195], se propone realizar como trabajo futuro la evaluación de la biosorción de cobre y hierro como alternativa a la biorremediación de contaminación por metales.

Las biomasa obtenida es rica en carbohidratos y pigmentos, con baja productividad de lípidos, por lo cual se propone como trabajo futuro la bioconversión conjunta de carbohidratos y lípidos a bioetanol y biodiésel.

6.3. PUBLICACIONES

- Póster "Diversidad microalgal de la laguna El Conejo en Altamira, Tamaulipas para la eliminación de agentes contaminantes. Propuesta de Estudio". En Simposio Internacional "Biodiversidad, plásticos y alternativas para su eliminación", realizado del 6 al 7 de Junio de 2019 en Veracruz, Veracruz.
- Pérez-Bravo, Sheila Genoveva, Mendoza-Martínez, Ana María, Castañeda-Chávez, María del Refugio y Aguilera-Vázquez, Luciano. Bioenergía a partir de microalgas en México. Revista de Energías Renovables. 2019. 3-8: 23-34. ECORFAN-Perú. DOI: 10.35429/JRE.2019.8.3.23.34
- Pérez-Bravo, Sheila Genoveva, Aguilera-Vázquez, Luciano, Castañeda-Chávez, María del Refugio, y Gallardo-Rivas, Nohra Violeta. (2022). Condiciones del proceso de transesterificación en la producción de biodiésel y sus distintos mecanismos de reacción. Tip revista especializada en ciencias químico-biológicas, 25. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.481>

Bibliografía

- [1] T. Fazal, A. Mushtaq, F. Rehman, A. Ullah Khan, N. Rashid, W. Farooq, M. S. Ur Rehman, and J. Xu, “Bioremediation of textile wastewater and successive biodiesel production using microalgae,” *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 82, pp. 3107–3126, 2018. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.10.029>
- [2] R. S. Malani, V. Shinde, S. Ayachit, A. Goyal, and V. S. Moholkar, “Ultrasound–assisted biodiesel production using heterogeneous base catalyst and mixed non–edible oils,” *Ultrasonics Sonochemistry.*, 2018. [Online]. Available: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350417718311325>
- [3] D. D. Alcalá Galiano, M. C. Cujilema Quitio, G. León Revelo, L. Baryolo González, and L. Ramos Sánchez, “Producción enzimática de biodiésel con biomasa lignocelulósica,” *Tecnología Química*, vol. 38, no. 1, pp. 138–152, 2018.
- [4] A. B. Chhetri, K. C. Watts, and M. R. Islam, “Waste cooking oil as an alternate feedstock for biodiesel production,” *Open Acces energies*, pp. 3–18, 2008. [Online]. Available: www.mdpi.org/energies
- [5] V. A. Alder, “Energías renovables, biocombustibles y microalgas marinas,” *Ciencia e Investigación.*, vol. 68, no. 1, pp. 29–40, 2018.
- [6] R. Naveenkumar and G. Baskar, “Process optimization, green chemistry balance and techno-economic analysis of biodiesel production from castor oil using heterogeneous nanocatalyst,” *Bioresour. Technol.*, vol. 320, p. 124347, 2021. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124347>
- [7] A. Converti, A. A. Casazza, E. Y. Ortiz, P. Perego, and M. Del Borghi, “Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production,” *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, vol. 48, no. 6, pp. 1146–1151, 2009.
- [8] F. Alam, S. Mobin, and H. Chowdhury, “Third generation biofuel from algae,” *Procedia Engineering*, vol. 105, no. 1, pp. 763–768, 2014. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.proeng.2015.05.068>

- [9] E. C. Odjadjare, T. Mutanda, and A. O. Olaniran, "Potential biotechnological application of microalgae: a critical review," *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 37, no. 1, pp. 37–52, 2017.
- [10] S. de Planeación y Transmisión Energética; Dirección General de Planeación e Información Energética, "Balance Nacional de Energía 2021," México, p. 208, 2021.
- [11] I. E. Medina Ramírez, N. A. Chávez Vela, and J. Jáuregui Rincón, "Biodiésel, un combustible renovable," *Investigación y Ciencia*, vol. 55, pp. 62–70, 2012.
- [12] L. I. Negrín Hernández, I. López Díaz, E. Pérez Ruiz, L. Concepción Fandiño, and L. Rodríguez Machin, "Análisis de lubricidad en mezcla diésel-biocombustible utilizando el ensayo de espiga en disco," *Revista Iberoamericana de Ingeniería Mecánica*, vol. 22, no. 1, pp. 47–53, 2018.
- [13] I. Tobío Pérez, E. A. Melo Espinosa, J. Suárez Hernández, J. A. Sotolongo Pérez, and R. Piloto Rodríguez, "Evaluación de mezclas de biodiésel de *Jatropha curcas* (L .) en bancos de motores diésel Evaluation of mixtures of *Jatropha curcas* (L .) biodiesel in diesel engine banks Materiales y Métodos," *Pastos y Forrajes*, vol. 41, no. 4, pp. 300–309, 2018.
- [14] L. Rodríguez, J. Juscamaita, and J. Vargas, "Efecto of EM-Bokashi medium on the laboratory rearing of the marine micro alga *Tetrasemis suceic* K." *Ecología Aplicada*, vol. 6, pp. 2–7, 2007.
- [15] R. Beltrán Rodríguez L., Alexandri Rionda, C. F. F. de J., S. Barrera Ríos, B. Hernández Miranda, and M. d. P. Guerrero Hernández, "Balance nacional de energía 2016," *SENER*, pp. 1–136, 2016. [Online]. Available: <https://www.gob.mx/sener/documentos/balance-nacional-de-energia>
- [16] J. Van Gerpen, B. Shanks, and R. Pruszko, "Biodiesel Production Technology," pp. 1–110, 2004.
- [17] S. Dey, N. M. Reang, P. K. Das, and M. Deb, "A comprehensive study on prospects of economy, environment, and efficiency of palm oil biodiesel as a renewable fuel," *J. Clean. Prod.*, vol. 286, p. 124981, 2021. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124981>
- [18] J. Stokes, R. Tu, M. Peters, G. Yadav, L. A. Fabiano, and W. D. Seider, "Omega-3 fatty acids from algae produced biodiesel," *Algal Res.*, vol. 51, no. August, p. 102047, 2020. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102047>
- [19] M. Manzoor, Q. u. A. Ahmad, A. Aslam, F. Jabeen, A. Rasul, P. M. Schenk, and J. I. Qazi, "Mixotrophic cultivation of *Scenedesmus dimorphus* in sugarcane bagasse hydrolysate," *Environ. Prog. Sustain. Energy*, vol. 39, no. 2, pp. 1–9, 2019.
- [20] A. Lomas, "Estudio del comportamiento del motor de gasolina chevrolet luv 2200 utilizando bioetanol a partir del residuo de papa con la mezcla E10," pp. 1–11, 2018.
- [21] J. Montiel Montoya, "Potencial y riesgo ambiental de los bioenergéticos en México," *Ra Ximhai - Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable*, vol. 6, pp. 57–62, 2010.
- [22] E. A. Llanes Cedeño, J. C. Rocha Hoyos, D. B. Peralta Zurita, and J. C. Leguísamo Milla, "Evaluación de emisiones de gases en un vehículo liviano a gasolina en condiciones de altura. Caso de estudio Quito, Ecuador," *Enfoque UTE*, vol. 9, no. 2, pp. 149–158, 2018.

- [23] A. Barajas, L. Garzón, A. González, A. Guzmán, V. Kafarov, N. Moreno, M. Nuñez, V. Plata, and G. Velásquez, “Bioprospección de microalgas colombianas para la producción de biodiésel,” *Revista Virtual Pro*, pp. 1–55, 2011.
- [24] M. Kumar and M. P. Sharma, “Selection of potential oils for biodiesel production,” *Renewable and Sustainable Energy Reviews.*, vol. 56, pp. 1129–1138, 2016. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.032>
- [25] M. d. C. Ortiz Tapia, P. García Alamilla, L. M. Lagunes Gálvez, M. I. Arregoitia Quezada, R. García Alamilla, and M. A. León Chávez, “Biodiesel production from crude palm oil (*Elaeis guineensis* Jacq). Ascending path method application,” *Acta Universitaria.*, vol. 26, no. 5, pp. 3–10, 2016. [Online]. Available: <http://www.actauniversitaria.ugto.mx/index.php/acta/article/view/910>
- [26] I. Taggar and M. Sachdeva Taggar, “Recent trends in biodiesel production — an overview,” *International Journal of Applied Engineering Research.*, vol. 9, no. 10, pp. 1151–1158, 2014. [Online]. Available: <http://www.ripublication.com/ijaer.htm>
- [27] Castro Martínez, C. and Beltrán Arredondo, L. I. and Ortíz Ojeda, J. C., “Producción de biodiésel y bioetanol: ¿Una alternativa sustentable a la crisis energética?” *Ra Ximhai - Revista de Sociedad Cultura y Desarrollo.*, vol. 8, no. 3, pp. 93–100, 2012.
- [28] C. Landeros-Sanchez, F. Lango-Reynoso, M. d. R. Castaneda-Chavez, I. Galaviz-Villa, I. Nikolskii-Gavrilov, M. Palomarez-Garcia, C. Reyes-Velazquez, and M. M. Minguez-Rodriguez, “Assessment of Water Pollution in Different Aquatic Systems: Aquifers, Aquatic Farms on the Jamapa River, and Coastal Lagoons of Mexico,” *J. Agric. Sci.*, vol. 4, no. 7, pp. 186–196, 2012.
- [29] R. Ayala Ruiz, Miriam Cristina; Molina León, Idolina; Pérez Munguia, Ricardo Miguel; Sánchez Ríos, Ángel Sebastián; Aguilar Aguilar, “Evaluación de la calidad y contaminación del agua del río Tuxpan, Michoacán, México.” *Rev. Latinoam. el Ambient. y las Ciencias*, vol. 9, no. 21, pp. 711–722, 2018.
- [30] R. P. González-Dávila, R. Ventura-Houle, F. R. De-la Garza-Requena, and L. Heyer-Rodríguez, “Caracterización fisicoquímica del agua de la laguna La Vega Escondida, Tampico, Tamaulipas-México,” *Tecnol. y ciencias del agua*, vol. 10, no. 1, pp. 01–29, 2019.
- [31] G. Garduño Solórzano, M. C. Rodríguez Palacio, M. Martínez García, R. E. Quintanar Zúñiga, C. Lozano Ramírez, J. E. Campos Contreras, and A. C. Monsalvo Reyes, “Cultivos de microalgas del Lago de Catemaco , Veracruz,” *Rev. Latinoam. Biotecnol. Ambient. y Algal*, vol. 2, no. 2, pp. 67–80, 2011.
- [32] INEGI, “Agenda Estadística de los Estados Unidos Mexicanos,” 2006.
- [33] D. F. Lozano Garcia, S. P. Cuellar Bermudez, E. del Rio Hinojosa, F. Betancourt, G. S. Aleman Nava, and R. Parra Saldivar, “Potential land microalgae cultivation in Mexico: From food production to biofuels,” *Algal Research.*, vol. 39, no. February, p. 101459, 2019. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101459>
- [34] Y. Chisti, “Biodiesel from microalgae beats bioethanol,” *Biotechnology Advances.*, vol. 26, no. 3, pp. 126–131, 2007. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>

- [35] K. W. Chew, J. Y. Yap, P. L. Show, N. H. Suan, J. C. Juan, T. C. Ling, D. Lee, and J. Chang, "Microalgae biorefinery: High value products perspectives," *Bioresource Technology*, vol. 229, pp. 53–62, 2017. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.006>
- [36] N. P. Kudahettige, J. Pickova, and F. G. Gentili, "Stressing algae for biofuel production: Biomass and biochemical composition of *Scenedesmus dimorphus* and *Selenastrum minutum* grown in municipal untreated wastewater," *Front. Energy Res.*, vol. 6, no. DEC, pp. 1–10, 2018.
- [37] A. Hernández Pérez and J. I. Labbé, "Microalgas, cultivo y beneficios," *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, vol. 49, no. 2, pp. 157–173, 2014.
- [38] V. Akubude, K. Nwaigwe, and E. Dintwa, "Production of biodiesel from microalgae via nanocatalyzed transesterification process: A review," *Materials Science for Energy Technologies*, vol. 2, pp. 216–225, 2019.
- [39] M. Medina Villadiego, Y. Ospino Roa, and L. Tejada Benítez, "Esterificación y transesterificación de aceites residuales para obtener biodiésel," *Luna Azul*, vol. enero-juni, no. 40, pp. 25–34, 2015.
- [40] M. Arif, Y. Li, M. M. El-Dalatony, C. Zhang, X. Li, and E. S. Salama, "A complete characterization of microalgal biomass through FTIR/TGA/CHNS analysis: An approach for biofuel generation and nutrients removal," *Renew. Energy*, vol. 163, pp. 1973–1982, 2021. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.10.066>
- [41] L. Wang, Y. Y. Li, M. Sommerfeld, and Q. Hu, "Synergistic effect of pretreatment and fermentation process on carbohydrate-rich *Scenedesmus dimorphus* for bioethanol production," *Bioresour. Technol.*, vol. 129, pp. 289–295, 2013. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2016.10.026>
- [42] C. Zhang, D. J. Wu, and C. Q. Zhong, "Cultivating *Scenedesmus dimorphus* in lactic acid wastewater for cost-effective biodiesel production," *Sci. Total Environ.*, vol. 792, p. 148428, 2021. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148428>
- [43] M. Martínez Hernández, S. Suastes Acosta, C. Lozano Ramírez, and M. C. Rodríguez Palacio, "Lipidic profile of *Lagerheinia sp.* isolated of industrial," *Avances en Ciencias e Ingeniería*, vol. 9, no. 1, pp. 25–33, 2018.
- [44] D. Zhou, B. Qiao, G. Li, S. Xue, and J. Yin, "Continuous production of biodiesel from microalgae by extraction coupling with transesterification under supercritical conditions," *Bioresource Technology*, 2017. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.097>
- [45] K. Uma Devi, G. Swapna, and S. Suneetha, *Microalgae in bioremediation: sequestration of greenhouse gases, clearout of fugitive nutrient minerals, and subtraction of toxic elements from waters*. Elsevier Inc., 2014. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00019-4>
- [46] R. Toranzo, G. Ferraro, M. V. Beligni, G. L. Perez, D. Castiglioni, D. Pasquevich, and C. Bagnato, "Natural and acquired mechanisms of tolerance to chromium in a *Scenedesmus dimorphus* strain," *Algal Res.*, vol. 52, no. June, p. 102100, 2020. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102100>

- [47] M. Mondal, G. Halder, G. Oinam, T. Indrama, and O. N. Tiwari, *Bioremediation of organic and inorganic pollutants using microalgae*. Elsevier B.V., 2019. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63504-4.00017-7>
- [48] T. Fazal, A. Mushtaq, F. Rehman, A. Ullah Khan, N. Rashid, W. Farooq, M. S. U. Rehman, and J. Xu, “Bioremediation of textile wastewater and successive biodiesel production using microalgae,” *Renewable Sustainable Energy Reviews*., vol. 82, no. February, pp. 3107–3126, 2018. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.10.029>
- [49] W. Lu, M. D. Asraful Alam, S. Liu, J. Xu, and R. Parra Saldivar, “Critical processes and variables in microalgae biomass production coupled with bioremediation of nutrients and CO₂ from livestock farms : A review,” *Science of the Total Environment*., p. 70, 2019. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135247>
- [50] B. M. Hernández Reyes, M. C. Rodríguez Palacio, C. Lozano Ramírez, and P. Castilla Hernández, “Remoción de nutrientes por tres cultivos de microalgas libres e inmovilizados,” *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal*, vol. 3, no. 1, pp. 80–94, 2012.
- [51] V. A. Vacca Jimeno, E. R. Angulo Mercado, D. M. Puentes Vallesteros, J. G. Torres Yepéz, and M. E. Plaza Vega, “Uso de la microalga *Chlorella sp.* viva en suspensión en la decoloración del agua residual de una empresa textil,” *Prospect*, vol. 15, no. 1, pp. 1–7, 2017. [Online]. Available: <http://www.scielo.org.co/pdf/prosp/v15n1/1692-8261-prosp-15-01-00093.pdf>
- [52] M. Sacristán de Alva, V. M. Luna Pabello, E. Cadena Martínez, and A. F. Alva Martinez, “Producción de biodiésel a partir de microalgas y una cianobacteria cultivadas en diferentes calidades de agua,” *Agrociencia*, vol. 48, no. 3, pp. 271–284, 2014.
- [53] H. Fan, K. Wang, C. Wang, F. Yu, X. He, J. Ma, and X. Li, “A comparative study on growth characters and nutrients removal from wastewater by two microalgae under optimized light regimes,” *Environ. Technol. Innov.*, vol. 19, no. 5, p. 100849, 2020. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100849>
- [54] T. M. Mata, R. Almeida, and N. S. Caetano, “Effect of the culture nutrients on the biomass and lipid productivities of microalgae *Dunaliella tertiolecta*,” *Chemical Engineering Transactions*., vol. 32, no. April, pp. 973–978, 2013.
- [55] A. Xaaldi Kalhor, A. D. Mohammadi Nassab, E. Abedi, A. Bahrami, and A. Movafeghi, “Biodiesel production in crude oil contaminated environment using *Chlorella vulgaris*,” *Bioresour. Technol.*, vol. 222, pp. 190–194, 2016. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.110>
- [56] O. Paladino and M. Neviani, “Airlift photo-bioreactors for *Chlorella vulgaris* cultivation in closed-loop zero waste biorefineries,” *Biomass and Bioenergy*, vol. 144, no. January 2020, p. 105926, 2021. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105926>
- [57] L. de Souza, A. S. Lima, Â. P. Matos, R. M. Wheeler, J. A. Bork, A. L. Vieira Cubas, and E. H. S. Moecke, “Biopolishing sanitary landfill leachate via cultivation of lipid-rich *Scenedesmus* microalgae,” *J. Clean. Prod.*, vol. 303, 2021.

- [58] R. Kothari, V. V. Pathak, V. Kumar, and D. P. Singh, "Experimental study for growth potential of unicellular alga *Chlorella pyrenoidosa* on dairy waste water: An integrated approach for treatment and biofuel production," *Bioresour. Technol.*, vol. 116, pp. 466–470, 2012. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.121>
- [59] M. Nayak, A. Karemore, and R. Sen, "Performance evaluation of microalgae for concomitant wastewater bioremediation, CO₂ biofixation and lipid biosynthesis for biodiesel application," *Algal Research*, vol. 16, pp. 216–223, 2016. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.020>
- [60] L. C. Fernández-Linares, C. Guerrero Barajas, E. Durán Páramo, and J. A. Badillo Corona, "Assessment of *Chlorella vulgaris* and indigenous microalgae biomass with treated wastewater as growth culture medium," *Bioresour. Technol.*, vol. 244, pp. 400–406, 2017. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.141>
- [61] X. Xu, Y. Shen, and J. Chen, "Cultivation of *Scenedesmus dimorphus* for C/N/P removal and lipid production," *Electron. J. Biotechnol.*, vol. 18, no. 1, pp. 46–50, 2015. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.12.003>
- [62] M. K. Enamala, S. Enamala, M. Chavali, J. Donepudi, R. Yadavalli, B. Kolapalli, T. V. Aradhyula, J. Velpuri, and C. Kuppam, "Production of biofuels from microalgae - A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae," *Renewable Sustainable Energy Reviews.*, vol. 94, no. May 2017, pp. 49–68, 2018. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.05.012>
- [63] A. Hernández Rojo, D. Jiménez Islas, and J. A. Venegas Sánchez, "Comparación de la producción de biodiésel de *Chlorella Protothecoides* y *Scenedesmus sp* mediante la adición de CO₂ de la fermentación alcohólica," *Revista de Sistemas Experimentales*, vol. 4, no. 12, pp. 11–17, 2017. [Online]. Available: http://www.ecorfan.org/bolivia/researchjournals/Sistemas_Experimentales/vol4num12/Revista_de_Sistemas_Experimentales_V4_N12_2.pdf
- [64] N. Rashid, M. S. Ur Rehman, M. Sadiq, T. Mahmood, and J.-I. Han, "Current status, issues and developments in microalgae derived biodiesel production," *Renewable and Sustainable Energy Reviews.*, vol. 40, pp. 760–778, 2014. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.104>
- [65] B.-C. Liu, Zhi-Yuan; Wang, Guang-Ce; Zhou, "Effect of carbon source on growth and lipid accumulation in *Chlorella sorokiniana* GXNN01," *Bioresource Technology.*, vol. 99, pp. 4717–4722, 2008.
- [66] H. Taher, S. Al-Zuhair, A. H. Al-Marzouqi, Y. Haik, and M. Farid, "Effective extraction of microalgae lipids from wet biomass for biodiesel production," *Biomass and Bioenergy*, vol. 6, pp. 3–11, 2014. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.02.034>
- [67] S. H. Shah, I. Ahmed Raja, Q. Mahmood, and A. Pervez, "Improvement in lipids extraction processes for biodiesel production from wet microalgal pellets grown on diammonium phosphate and sodium bicarbonate combinations," *Bioresource Technology.*, vol. 214, pp. 199–209, 2016. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.036>

- [68] E. C. Goncalves, A. C. Wilkie, M. Kirst, and B. Rathinasabapathi, “Metabolic regulation of triacylglycerol accumulation in the green algae: identification of potential targets for engineering to improve oil yield,” *Plant Biotechnology Journal*, vol. 14, no. 8, pp. 1649–1660, 2016.
- [69] L. Mayorga, C. and Manso, “Crecimiento de la microalga *Dunaliella salina* en un cultivador raceway en condiciones de laboratorio, Growth of the *Dunaliella salina* microalga in a raceway cultivator in laboratory conditions,” *Revista de Iniciación Científica*, vol. 3, no. 1, pp. 85–91, 2017.
- [70] B. O. Arredondo Vega and D. Voltolina, *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*, CIBNOR, Ed. Centro de Investigaciones Bioógicas del Noreste, 2007.
- [71] J. G. Elias Castelo, “Efecto del consumo de nitrógeno de la microalga *Desmodesmus communis* sobre la composición bioquímica, productividad de la biomasa, comunidad bacteriana y longitud de los telómeros,” Ph.D. dissertation, Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S. C., 2018. [Online]. Available: <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/1732>
- [72] M. Martínez Hernández, S. L. Suastes Acosta, C. Lozano Ramírez, and R. P. M. C., “Lipidic profile of *Lagerheinia Sp.* isolated of industrial,” *Avances en Ciencias e Ingeniería.*, vol. 9, no. 1, pp. 25–33, 2018.
- [73] T. T. Mamo and Y. S. Mekonnen, “Microwave-assisted biodiesel production from microalgae, *Scenedesmus* species, using goat bone-made nano-catalyst,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 190, no. 4, pp. 1147–1162, 2020.
- [74] A. Widjaja and Y. Chien, C. and Ju, “Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*,” *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers.*, vol. 40, no. 1, pp. 13–20, 2009.
- [75] A. K. Sharma, P. K. Sahoo, S. Singhal, and G. Joshi, “Exploration of upstream and downstream process for microwave assisted sustainable biodiesel production from microalgae *Chlorella vulgaris*,” *Bioresour. Technol.*, vol. 216, pp. 793–800, 2016. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.013>
- [76] S. Z. Ayatollahi, F. Esmailzadeh, and D. Mowla, “Integrated CO₂ capture, nutrients removal and biodiesel production using *Chlorella vulgaris*,” *Journal Environmental Chemical Engineering*, p. 104763, 2020. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104763>
- [77] U. Suparmaniam, M. K. Lam, Y. Uemura, S. H. Shuit, J. W. Lim, P. L. Show, K. T. Lee, Y. Matsumura, and P. T. K. Le, “Flocculation of *Chlorella vulgaris* by shell waste-derived bioflocculants for biodiesel production: Process optimization, characterization and kinetic studies,” *Sci. Total Environ.*, vol. 702, p. 134995, 2020. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134995>
- [78] R. Chandra, D. Goswami, and E. Biotech, “*Scenedesmus dimorphus* and *Scenedesmus quadricauda* two potent indigenous microalgae strains for biomass production and CO₂ mitigation.pdf>,” *J. Algal Biomass Utiln.*, vol. 2, no. 4, pp. 42–49, 2011. [Online]. Available: <https://pdfs.semanticscholar.org/9874/6c87fce372e744d9ba4071fb23867f6abd7d.pdf>

- [79] V. Anand, M. Kashyap, A. Ghosh, and B. Kiran, "Spectroscopic insights exploring triacylglyceride accumulation in *Scenedesmus sp.* via biomolecular transitions," *Bioresour. Technol. Reports*, vol. 12, no. October, p. 100593, 2020. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100593>
- [80] M. Faried, M. Samer, E. Abdelsalam, R. S. Yousef, Y. A. Attia, and A. S. Ali, "Biodiesel production from microalgae: Processes, technologies and recent advancements," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 79, pp. 893–913, 2017. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.199>
- [81] J. Sandoval Herrera and D. Rubio Fernández, "Revisión de artículos sobre floculación de microalgas," *Revista de Investigación.*, vol. 9, no. 2, pp. 114–132, 2016.
- [82] N. Laraib, A. Hussain, A. Javid, S. M. Bukhari, W. Ali, M. Manzoor, and F. Jabeen, "Mixotrophic cultivation of *Scenedesmus dimorphus* for enhancing biomass productivity and lipid yield," *Iran. J. Sci. Technol. Trans. A Sci.*, vol. 45, no. 2, pp. 397–403, 2021. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1007/s40995-020-01055-3>
- [83] G. S. Araujo, L. J. B. L. Matos, J. O. Fernandes, S. J. M. Cartaxo, L. R. Gonçalves, F. A. N. Fernandes, and W. R. L. Farias, "Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method," *Ultrasonics Sonochemistry.*, vol. 20, no. 1, pp. 95–98, 2013. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.07.027>
- [84] L. Crisóstomo Vázquez, C. Alcocer Morales, C. Lozano Ramírez, and M. C. Rodríguez Palacio, "Fitoplancton de la Laguna del Carpintero, Tampico, Tamaulipas , México," *Interciencia*, vol. 41, no. 2, pp. 103–109, 2016. [Online]. Available: <http://www.redalyc.org/html/339/33944255005/>
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.066>
- [85] R. T. Moreno, "Estudio de microalgas del sistema lagunario del sur de Tamaulipas," Ph.D. dissertation, Instituto Tecnológico de Ciudad Madero, 2020.
- [86] J. Humbert, "Toxins of cyanobacteria," in *Handb. Toxicol. Chem. Warf. AGENTS*. Elsevier Inc., 2009, p. 9. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374484-5.00027-4>
- [87] D. V. D. Merwe, "Chapter 31. Cyanobacterial (Blue-Green Algae) Toxins," in *Handb. Toxicol. Chem. Warf. Agents*. Elsevier Inc., 2015, pp. 421–430. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800159-2.00031-2>
- [88] F. Özogul and I. Hamed, "Chapter 3 - Marine-based toxins and their health risk," in *Food Qual. Balanc. Heal. Dis.* Elsevier Inc., 2018, p. 36. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-811442-1/00003-1>
- [89] "ITIS - Report: *Scenedesmus dimorphus*." [Online]. Available: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=6143#null
- [90] "*Scenedesmus dimorphus* (turpin) kützing, 1834 - ocean biodiversity information system."
- [91] "Taxonomy browser (*Tetrademus dimorphus*)." [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=119574&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

- [92] S. M. McCarthy, J. H. Melman, O. K. Reffell, and S. W. Gordon-Wylie, *Synthesis and partial characterization of biodiesel via base-catalyzed transesterification*, 2nd ed. Elsevier, 2020. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-815497-7.00024-5>
- [93] M. A. Chia, A. T. Lombardi, and D. G. G. M. M. Melão, “Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media.” *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, vol. 85, no. 4, pp. 1427–1438, 2013. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24141409>
- [94] D. Brito, A. Castro, J. Colivet, E. Gómez, and R. Mora, “Cinética de crecimiento de un cultivo mixto de las microalgas *Hyaloraphidium contortum* y *Pseudokirchneriella subcapitata*,” *Interciencia*, vol. 38, no. 8, pp. 604–608, 2013. [Online]. Available: <http://www.redalyc.org/pdf/339/33928557009.pdf>
- [95] V. S. Dolla, “Agricultural science and technology in China,” *J. Sci. Technol. Policy China*, vol. 2, no. 1, pp. 79–93, 2011.
- [96] C. R. Paes, G. R. Faria, N. A. B. Tinoco, D. J. F. A. Castro, E. Barbarino, and S. O. Lourenco, “Growth, nutrient uptake and chemical composition of *Chlorella sp.* and *Nannochloropsis oculata* under nitrogen starvation,” *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, vol. 44, pp. 275–292, 2016.
- [97] S. G. C. Avula, J. M. Belovich, and Y. Xu, “Determination of fatty acid methyl esters derived from algae *Scenedesmus dimorphus* biomass by GC–MS with one-step esterification of free fatty acids and transesterification of glycerolipids,” *J. Sep. Sci.*, vol. 40, no. 10, pp. 2214–2227, 2017.
- [98] Y. Silveira Font, L. Gómez Luna, M. D. Kufundala Wemba, D. Salazar Hernández, and Y. Ortega Díaz, “Variación de la composición de pigmentos de *Chlorella vulgaris* Beijerinck, con la aplicación del campo magnético estático,” *Revista Cubana de Química*, vol. 30, no. 1, pp. 55–67, 2018.
- [99] G. Y. Yew, X. Tan, K. W. Chew, J. S. Chang, Y. Tao, N. Jiang, and P. L. Show, “Thermal-Fenton mechanism with sonoprocessing for rapid non-catalytic transesterification of microalgal to biofuel production,” *Chem. Eng. J.*, vol. 408, p. 127264, 2021. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.127264>
- [100] A. K. Patel, J. M. Joun, M. E. Hong, and S. J. Sim, “Effect of light conditions on mixotrophic cultivation of green microalgae,” *Bioresour. Technol.*, vol. 282, no. January, pp. 245–253, 2019. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.024>
- [101] T. Trivedi, D. Jain, N. S. Mulla, S. S. Mamatha, S. R. Damare, R. A. Sreepada, S. Kumar, and V. Gupta, “Improvement in biomass, lipid production and biodiesel properties of a euryhaline *Chlorella vulgaris* NIOCCV on mixotrophic cultivation in wastewater from a fish processing plant,” *Renew. Energy*, vol. 139, no. 3, pp. 326–335, 2019. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.02.065>
- [102] O. Castillo, S. Torres Badajoz, C. Núñez Colín, V. Peña Caballero, and J. Herrera Méndez, C.H. and Rodríguez Núñez, “Biodiesel production from microalgae: Progress and biotechnological prospects | Producción de biodiésel a partir de microalgas: avances y perspectivas biotecnológicas,” *Hidrobiológica*, vol. 27, no. 3, pp. 337–352, 2017.

- [103] L. Zhang, K. C. Loh, A. Kuroki, Y. Dai, and Y. W. Tong, “Microbial biodiesel production from industrial organic wastes by oleaginous microorganisms: Current status and prospects,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 402, no. July 2020, 2021.
- [104] A. Rarrek, S. Rehfeldt, and H. Klein, “Evaluation of CO_2 gas supply of large open algae ponds,” *Chem. Eng. Sci.*, vol. 187, no. April, pp. 432–443, 2018. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.ces.2018.04.050>
- [105] A. Lehmuskero, M. Skogen Chauton, and T. Boström, “Light and photosynthetic microalgae: A review of cellular- and molecular-scale optical processes,” *Progress in Oceanography.*, vol. 168, pp. 43–56, 2018. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2018.09.002>
- [106] B. Wang, C. Q. Lan, and M. Horsman, “Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses,” *Biotechnology Advances.*, vol. 30, no. 4, pp. 904–912, 2012. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.01.019>
- [107] A. Pawlowski, J. L. Mendoza, J. L. Guzmán, M. Berenguel, F. G. Ación, and S. Dormido, “Effective utilization of flue gases in raceway reactor with event-based pH control for microalgae culture,” *Bioresource Technology.*, vol. 170, pp. 1–9, 2014. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.088>
- [108] J. Zhan, J. Rong, and Q. Wang, “Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect,” *International Journal Hydrogen Energy*, vol. 42, no. 12, pp. 1–13, 2017. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.12.021>
- [109] D. Morales Pirajan, “Diseño de fotobiorreactores para el cultivo de microorganismos a partir de estímulos lumínicos,” Ph.D. dissertation, Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, 2018.
- [110] I. Galvan Rincón, E. Sierra Rangel, and D. Venegas Camelo, “Diseño conceptual de un biorreactor para producir biocombustibles a partir de microalgas,” p. 64, 2014.
- [111] J. U. Grobbelaar, “Chapter 14. Mass production of microalgae at optimal photosynthetic rates,” in *Photosynthesis*, 2013, pp. 357–371.
- [112] Qiang Hu, M. Sommerfeld, E. Jarvis, M. Ghirardi, M. Posewitz, M. Seibert, and A. Darzins, “Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances,” *The Plant Journal.*, vol. 54, no. 4, pp. 621–639, 2008.
- [113] P. A. Ramos Rodríguez, A. Hernández Milán, E. A. Melo Espinosa, L. M. Zumalacárregui, de Cárdenas, O. Pérez Ones, L. Pérez Ruíz, and R. Piloto Rodríguez, “Caracterización del biodiésel obtenido del aceite de *Jatropha curcas* L.,” *Afinidad*, vol. 75, no. 581, pp. 6(45—51), 2018. [Online]. Available: <https://www.raco.cat/index.php/afinidad/article/view/335962>
- [114] A. Raheem, P. Prinsen, A. K. Vuppaladadiyam, M. Zhao, and R. Luque, “A review on sustainable microalgae based biofuel and bioenergy production: Recent developments,” *Journal of Cleaner Production.*, vol. 181, pp. 42–59, 2018.
- [115] C. Y. Chen, Y. H. Chang, and H. Y. Chang, “Outdoor cultivation of *Chlorella vulgaris* FSP-E in vertical tubular-type photobioreactors for microalgal protein production,” *Algal Res.*, vol. 13, pp. 264–270, 2016. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.12.006>

- [116] S. Karuppasamy, A. S. Musale, B. Soni, B. Bhadra, N. Gujarathi, M. Sundaram, A. Sapre, S. Dasgupta, and C. Kumar, “Integrated grazer management mediated by chemicals for sustainable cultivation of algae in open ponds,” *Algal Res.*, vol. 35, no. September, pp. 439–448, 2018. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.09.017>
- [117] T. P. Lam, T.-M. Lee, C.-Y. Chen, and J.-S. Chang, “Strategies to control biological contaminants during microalgal cultivation in open ponds,” *Bioresource Technology*, vol. 252, pp. 180–187, 2018. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.088>
- [118] H. L. Rubio Fernández, Diego; Moreno Saboya, “Agitación y transferencia de masa de CO_2 en fotobiorreactores tipo airflit,” *Revista de Investigación*, vol. 10, no. 2, pp. 49–61, 2017.
- [119] F. M. Pereira, C. C. Loures, M. S. Amaral, F. M. Gomes, G. A. Pedro, M. A. Machado, C. E. Reis, and M. B. Silva, “Evaluation of fatty acids production by *Chlorella minutissima* in batch bubble-column photobioreactor,” *Fuel*, vol. 230, no. April, pp. 155–162, 2018. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.04.170>
- [120] A. Doshi, S. Pascoe, L. Coglán, and T. J. Rainey, “Economic and policy issues in the production of algae-based biofuels : A review,” *Renewable Sustainable Energy Reviews.*, vol. 64, pp. 329–337, 2016. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.06.027>
- [121] R. K. Srivastava, “Bioenergy production by contribution of effective and suitable microbial system,” *Mater. Sci. Energy Technol.*, vol. 2, pp. 308–318, 2019.
- [122] M. B. Navas, I. D. Lick, P. A. Bolla, M. L. Casella, and J. F. Ruggera, “Transesterification of soybean and castor oil with methanol and butanol using heterogeneous basic catalysts to obtain biodiesel,” *Chem. Eng. Sci.*, vol. 187, pp. 444–454, 2018. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.ces.2018.04.068>
- [123] L.-D. Zhu, Z.-H. Li, D.-B. Guo, F. Huang, Y. Nugroho, and K. Xia, “Cultivation of *Chlorella sp.* with livestock waste compost for lipid production,” *Bioresource Technology.*, vol. 223, pp. 296–300, 2017.
- [124] M. F. Demirbas, “Biofuels from algae for sustainable development,” *Applied Energy*, vol. 88, no. 10, pp. 3473–3480, 2011. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.01.059>
- [125] P. Spolaore, C. Joannis Cassan, E. Duran, and A. Isambert, “Commercial Applications of Microalgae,” *Bioscience Bioenergy.*, vol. 101, no. 2, pp. 87–96, 2006.
- [126] R. Valdez Ojeda, M. González Muñoz, R. Us Vázquez, J. Narváez Zapata, J. C. Chavarria Hernández, S. López Adrián, F. Barahona Pérez, T. Toledano Thompson, G. Garduño Solórzano, and R. M. Escobedo Gracia Medrano, “Characterization of five fresh water microalgae with potential for biodiesel production,” *Algal Researcher.*, vol. 7, pp. 33–44, 2015.
- [127] Y. Chisti, “Biodiesel from microalgae,” *Biotechnology Advances*, vol. 26, no. 3, pp. 126–131, 2008. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
- [128] K. L. Yeh and J. S. Chang, “Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris*

- ESP-31,” *Bioresour Technol*, vol. 105, pp. 120–127, 2012. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22189073>
- [129] A. Illman, A. Scragg, and S. Shales, “Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium,” *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 27, pp. 631–635, 2000.
- [130] T. M. Mata, A. A. Martins, and N. S. Caetano, “Microalgae for biodiesel production and other applications: A review,” *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 14, no. 1, pp. 217–232, 2010.
- [131] Y. Shen, Z. Pei, W. Yuan, and E. Mao, “Effect of nitrogen and extraction method on algae lipid yield,” *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, vol. 2, no. 1, pp. 51–57, 2009.
- [132] N. Bordoloi, R. Narzari, D. Sut, R. Saikia, R. S. Chutia, and R. Kataki, “Characterization of bio-oil and its sub-fractions from pyrolysis of *Scenedesmus dimorphus*,” *Renew. Energy*, vol. 98, pp. 245–253, 2016. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2016.03.081>
- [133] E. Günerken, E. D’Hondt, M. H. Eppink, L. Garcia Gonzalez, K. Elst, and R. H. Wijffels, “Cell disruption for microalgae biorefineries,” *Biotechnology Advances.*, vol. 33, no. 2, pp. 243–260, 2015.
- [134] P. D. Patil, V. G. Gude, A. Mannarswamy, P. Cooke, N. Nirmalakhandan, P. Lammers, and S. Deng, “Comparison of direct transesterification of algal biomass under supercritical methanol and microwave irradiation conditions,” *Fuel*, vol. 97, pp. 822–831, 2012. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2012.02.037>
- [135] C. L. Teo, H. Jamaluddin, N. A. Ohd Zain, and A. Idris, “Biodiesel production via lipase catalysed transesterification of microalgae lipids from *Tetraselmis* sp.” *Renewable Energy*, vol. 68, pp. 1–5, 2014.
- [136] A. Patel, N. Arora, V. Pruthi, and P. A. Pruthi, “A novel rapid ultrasonication-microwave treatment for total lipid extraction from wet oleaginous yeast biomass for sustainable biodiesel production,” *Ultrason. Sonochem.*, 2018. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.05.002>
- [137] J. Y. Lee, C. Yoo, S.-Y. Jun, C.-Y. Ahn, and H.-M. Oh, “Bioresource technology comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae,” *Bioresource Technology.*, vol. 101, no. 1, pp. S75—S77, 2010. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.058>
- [138] A. M. Pereira Neto, R. A. Sotana de Souza, A. D. Leon Nino, J. D. Aparecida Da Costa, R. Sbrolini Tiburcio, T. Abreu Nunes, T. C. Sellare de Mello, T. K. F., F. M. Prado Saldanha-Corrêa, and S. M. Flores Giancesella, “Improvement in microalgae lipid extraction using a sonication-assisted method,” *Renewable Energy*, vol. 55, pp. 525–531, 2013. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2013.01.019>
- [139] A. L. Ahmad, N. H. Mat Yasin, C. J. Derek, and J. K. Lim, “Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review,” *Renewable Sustainable Energy Reviews.*, vol. 15, no. 1, pp. 584–593, 2011.

- [140] T. T. Nguyen, Y. Uemura, M. K. Lam, N. Mansor, and J. W. Lim, “Revealing the effect of reaction parameters towards alkyl group distribution in in-situ transesterification of *Chlorella vulgaris*,” *Energy Convers. Manag.*, vol. 185, no. December 2018, pp. 223–231, 2019. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2019.01.113>
- [141] J. V. A. Raj, B. Bharathiraja, B. Vijayakumar, S. Arokiyaraj, J. Iyyappan, and R. Praveen Kumar, “Biodiesel production from microalgae *Nannochloropsis oculata* using heterogeneous Poly Ethylene Glycol (PEG) encapsulated ZnOMn²⁺ nanocatalyst,” *Bioresource Technology*, 2019. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.030>
- [142] P. D. Patil, V. G. Gude, H. K. Reddy, T. Muppaneni, and S. Deng, “Biodiesel production from waste cooking oil using sulfuric acid and microwave irradiation processes,” *Journal of Environmental Protection*, vol. 2012, no. January, pp. 107–113, 2012. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.4236/jep.2012.31013>
- [143] M. D. Macías Sánchez, A. Robles Medina, E. Hita Peña, M. J. Jiménez Callejón, L. Estéban Cerdán, P. A. González Moreno, and E. Molina Grima, “Biodiesel production from wet microalgal biomass by direct transesterification,” *Fuel*, vol. 150, pp. 14–20, 2015.
- [144] M. Karimi, “Exergy-based optimization of direct conversion of microalgae biomass to biodiesel,” *Journal of Cleaner Production*, vol. 141, pp. 50–55, 2016. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.09.032>
- [145] H. Cao, Z. Zhang, X. Wu, and X. Miao, “Direct biodiesel production from wet microalgae biomass of *Chlorella pyrenoidosa* through *in situ* transesterification,” *BioMed Research International*, pp. 1–6, 2013.
- [146] R. Sivaramakrishnan and A. Incharoensakdi, “Utilization of microalgae feedstock for concomitant production of bioethanol and biodiesel,” *Fuel*, vol. 217, no. January, pp. 458–466, 2018. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.12.119>
- [147] P. D. Patil, H. Reddy, T. Muppaneni, T. Schaub, F. O. Holguin, P. Cooke, P. Lammers, N. Nirmalakhandan, Y. Li, X. Lu, and S. Deng, “In situ ethyl ester production from wet algal biomass under microwave-mediated supercritical ethanol conditions,” *Bioresource Technology*, vol. 139, pp. 308–315, 2013. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.045>
- [148] N. Sumprasit, N. Wagle, N. Glanpracha, and A. P. Annachhatre, “Biodiesel and biogas recovery from *Spirulina platensis*,” *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 119, pp. 196–204, 2017. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.11.006>
- [149] E. S. Umdu, M. Tuncer, and E. Seker, “Transesterification of *Nannochloropsis oculata* microalga’s lipid to biodiesel on Al₂O₃ supported CaO and MgO catalysts,” *Bioresource Technology*, vol. 100, no. 11, pp. 2828–2831, 2009. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.027>
- [150] T. Mathimani, L. Uma, and D. Prabakaran, “Homogeneous acid catalysed transesterification of marine microalga *Chlorella sp.* BDUG 91771 lipid - An efficient biodiesel yield and its characterization,” *Renewable Energy*, vol. 81, pp. 523–533, 2015. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2015.03.059>

- [151] B. Behera, M. Selvam S, B. Dey, and P. Balasubramanian, “Algal biodiesel production with engineered biochar as a heterogeneous solid acid catalyst,” *Bioresour. Technol.*, vol. 310, no. January, 2020.
- [152] V. Cordero-Ravelo and J. Schallenberg-Rodriguez, “Biodiesel production as a solution to waste cooking oil (WCO) disposal. Will any type of WCO do for a transesterification process? A quality assessment,” *J. Environ. Manage.*, vol. 228, no. August, pp. 117–129, 2018. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.08.106>
- [153] A. Rosas Barajas, A. Aguilar Ortega, I. Cornejo Corona, Z. Rizo Fernández, S. E. Córdova de la Cruz, L. G. Ramos Fraustro, and J. d. J. Esparza Claudio, “Análisis de las cadenas de suministro de bioetanol y biodiésel en México : Estudios de caso, Analysis of bioethanol and biodiésel supply chains in Mexico : case studies,” *Nova Scientia.*, vol. 10, no. 20, pp. 13–29, 2018.
- [154] A. Demirbas and S. Karlioglu, “Biodiesel production facilities from vegetable oils and animal fats,” *Energy Sources*, vol. 29, no. 2, pp. 133–141, 2007.
- [155] K. Ramachandran, T. Suganya, N. Nagendra Gandhi, and S. Renganathan, “Recent developments for biodiesel production by ultrasonic assist transesterification using different heterogeneous catalyst: A review,” *Renewable Sustainable Energy Reviews.*, vol. 22, pp. 410–418, 2013. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2013.01.057>
- [156] A. S. Badday, A. Z. Abdullah, K. T. Lee, and M. S. Khayoon, “Intensification of biodiesel production via ultrasonic-assisted process: A critical review on fundamentals and recent development,” *Renewable Sustainable Energy Reviews.*, vol. 16, no. 7, pp. 4574–4587, 2012. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2012.04.057>
- [157] C. K. Phwan, H. Chyuan Ong, W.-H. Chen, T. Chuan Ling, E. Poh Ng, and P. Loke Show, “Overview : Comparison of pretreatment technologies and fermentation processes of bioethanol from microalgae,” *Energy Conversion Management.*, vol. 173, no. May, pp. 81–94, 2018. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.07.054>
- [158] T. Marulanda López, L. F. Zapata Osorno, and M. C. Jaramillo Flórez, “Producción de bioetanol a partir de *Elodea sp.*” *Ingenierías USBmed*, vol. 8, no. 1, p. 37, 2017.
- [159] V. Klassen, O. Blifernez Klassen, L. Wobbe, A. Schlüter, O. Kruse, and J. H. Mussgnug, “Efficiency and biotechnological aspects of biogas production from microalgal substrates,” *Journal of Biotechnology.*, vol. 234, pp. 7–26, 2016. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.07.015>
- [160] Y.-M. Yun, S.-K. Cho, K.-W. Jung, M.-S. Kim, H.-S. Shin, and D.-H. Kim, “Inhibitory effect of chloroform on fermentative hydrogen and methane production from lipid-extracted microalgae,” *International Journal of Hydrogen Energy (2014)*, vol. 39, no. 33, pp. 19 256–19 261, 2014. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.04.167>
- [161] Q. M. Rahman, B. Zhang, L. Wang, and A. Shahbazi, “A combined pretreatment, fermentation and ethanol-assisted liquefaction process for production of biofuel from *Chlorella sp.*” *Fuel*, vol. 257, no. July, p. 116026, 2019. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116026>

- [162] J. Vilaboa Arroniz, J. López Collado, D. E. Platas Rosado, and I. Vilaboa Arroniz, “El mito de los biocombustibles en México. The myth of biofuels in Mexico,” *Tropical and Subtropical Agroecosystems.*, vol. 22, pp. 431–441, 2019.
- [163] R. Giesemann, “Reporte de sustentabilidad 2017-2018,” pp. 1–53, 2018. [Online]. Available: <chrome-extension://klbibkeccnjlkjkiokjodocebajanakg/suspended.html#ttl=ReporteSustentabilidad2017web.pdf&pos=0&uri=https://grupoalego.com/resources/files/ReporteSustentabilidad2017web.pdf>
- [164] S.-H. Ho, S.-W. Huang, C.-Y. Chen, T. Hasunuma, A. Kondo, and J.-S. Chang, “Biore source Technology Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock,” *Bioresource Technology.*, vol. 135, pp. 191–198, 2013. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.015>
- [165] K. H. Kim, I. S. Choi, H. M. Kim, S. G. Wi, and H. J. Bae, “Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation,” *Bioresource Technology.*, vol. 153, pp. 47–54, 2014. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.059>
- [166] L. Sanchez Rizza, M. E. Sanz Smachetti, D. N. M., L. G. Salerno, and L. Curatti, “Bioprospecting for native microalgae as an alternative source of sugars for the production of bioethanol,” *Algal Research.*, vol. 22, pp. 140–147, 2017. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.12.021>
- [167] V. T. C. Neves, E. Andrade Sales, and L. W. Perelo, “Influence of lipid extraction methods as pre-treatment of microalgal biomass for biogas production,” *Renewable Sustainable Energy Reviews.*, vol. 59, pp. 160–165, 2016. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.303>
- [168] B. Zhao, J. Ma, Q. Zhao, L. Laurens, E. Jarvis, S. Chen, and C. Frear, “Efficient anaerobic digestion of whole microalgae and lipid-extracted microalgae residues for methane energy production,” *Bioresour. Technol.*, vol. 161, pp. 423–430, 2014. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.079>
- [169] J. L. Ramos Suárez and N. Carreras, “Use of microalgae residues for biogas production,” *Chemical Engineering Journal.*, vol. 242, pp. 86–95, 2014.
- [170] A. L. Amparán Cruz and Colaboradores, “Plan Municipal de Desarrollo 2016-2018 del Municipio de Altamira, Tamaulipas.” p. 306, 2017. [Online]. Available: http://po.tamaulipas.gob.mx/wp-content/uploads/2017/02/cxlii-12-260117-ANEXO_ALTAMIRA.pdf
- [171] F. Acién, J. Fernández Sevilla, J. Magán, A. González Céspedes, and E. Molina, “Evaluación global de la producción de biocombustibles con microalgas: Establecimiento de capacidades, limitaciones y factores determinantes de la viabilidad del proceso,” *Revista Latinoam Biotecnol Amb Algal*, vol. 3, no. 1, pp. 40–58, 2012.
- [172] P. Schenk, S. R. Thomas Hall, E. Stephens, C. Marx Ute, J. H. Mussgnug, C. Posten, O. Kruse, and B. Hankamer, “Second generation biofuels : high-efficiency microalgae for biodiesel production,” *Bioenerg. Res.*, vol. 1, pp. 20–43, 2008.

- [173] W. Spark, “El clima promedio en Altamira.” [Online]. Available: <https://es.weatherspark.com/y/7906/Clima-promedio-en-Altamira-M{é}xico-durante-todo-el-a{~{n}}o#Sections-Precipitation>
- [174] A. de Altamira, “Gobierno Municipal de Altamira Administración 2018-2021. Alcaldesa Alma Laura Amparan Cruz.” [Online]. Available: <http://www.altamira.gob.mx/pesca-de-altamira-tamaulipas.html>
- [175] INEGI, “Cartografía de Altamira, Tamaulipas.” [Online]. Available: http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/Productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/geografia/imagen_cartografica/1_20_000/1_20/702825553395_geo.pdf
- [176] S. G. de Gobierno, “Programa municipal de ordenamiento territorial y desarrollo urbano de Altamira, Tamaulipas,” *Periodico Oficial del Estado Tamaulipas*, no. Plan 2012, p. 2015, 2016.
- [177] C. N. del Agua, “Índice de Calidad del Agua.” [Online]. Available: <https://www.gob.mx/conagua/documentos/monitoreo-de-la-calidad-del-agua-en-mexico>
- [178] “Google Maps.” [Online]. Available: <https://www.google.com/maps/@22.4292153,-97.8802311,3450m/data=!3m1!1e3?hl=es-ES>
- [179] F. Aziz, N. Ouazzani, L. Mandi, A. Assaad, S. Pontvianne, H. Poirot, and M. N. Pons, “Characterization by fluorescence of dissolved organic matter in rural drinking water storage tanks in Morocco,” *J. Water Health*, vol. 16, no. 2, pp. 321–328, 2018.
- [180] Q. Gu, J. Deng, K. Wang, Y. Lin, J. Li, M. Gan, L. Ma, and Y. Hong, “Identification and assessment of potential water quality impact factors for drinking-water reservoirs,” *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 11, no. 6, pp. 6069–6084, 2014.
- [181] CONANP, “Ficha de identificación. *Eichhornia crassipes*,” p. 7, 2014.
- [182] CONABIO, “Método de Evaluación Rápida de Invasividad (MERI) para especies exóticas en México *Eichhornia crassipes* (Mart.),” pp. 1–15, 2015.
- [183] —, “Método de Evaluación Rápida de Invasividad (MERI) para especies exóticas en México *Pistia stratiotes* L.” pp. 1–10, 2014. [Online]. Available: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/222546/Pistia_stratiotes.pdf
- [184] Conagua, “Monitoreo de la calidad del agua en México. De los sitios muestreados por la Red Nacional de Monitoreo del 2012.” 2016. [Online]. Available: http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/145524/Monitoreo_de_calidad_del_agua_en_M_xico_2012-2015.pdf
- [185] NASA, “Power Data Access Viewer.” [Online]. Available: <https://power.larc.nasa.gov/data-access-viewer/>
- [186] Secretaría de Economía, “NMX-AA-030/1-SCFE-2012. Análisis de agua-Medición de la demanda química de oxígeno en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Método de prueba-parte 1-Método de refluo abierto.” *Diario Oficial de la Federación.*, 2012.

- [187] S. de Economía, “NMX-AA-028-SCFI-2001. Análisis de agua - Determinación de la demanda bioquímica de oxígeno en aguas naturales residuales (DBO_5) y residuales tratadas - Método de prueba. Water Analysis - Determination of the biochemical oxygen demand in natural, wastewaters ,” *Diario Oficial de la Federación*, 2001.
- [188] HACH, “BODTrak™ II. Manual de usuario,” p. 46, 2010.
- [189] J. S. Deschênes, A. Boudreau, and R. Tremblay, “Mixotrophic production of microalgae in pilot-scale photobioreactors: Practicability and process considerations,” *Algal Res.*, vol. 10, pp. 80–86, 2015. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.015>
- [190] R. D. Gonzalez Grijalva, “Análisis económico de la producción de biomasa a partir de microalgas para biocombustibles en fotobiorreactores a escala piloto,” Ph.D. dissertation, Universidad Internacional SEK, 2018.
- [191] Á. Cárdenas-Bahena, S. Sánchez-García, C. Tinajero-Morales, V. M. González-Rodríguez, and L. Baires-Vázquez, “Hipoclorito de sodio en irrigación de conductos radiculares : Sondeo de opinión y concentración en productos comerciales Use of sodium hypochlorite in root canal irrigation . Opinion survey and concentration in commercial products,” *Rev. odontológica Mexicana*, vol. 16, no. 4, pp. 252–258, 2012.
- [192] D. T. Tran, C. L. Chen, and J. S. Chang, “Effect of solvents and oil content on direct transesterification of wet oil-bearing microalgal biomass of *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biodiesel synthesis using immobilized lipase as the biocatalyst,” *Bioresour. Technol.*, vol. 135, pp. 213–221, 2013. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.101>
- [193] A. R. Fiorucci and E. B. Filho, “Oxigênio dissolvido: propriedades e solubilidade,” *Química e Soc.*, vol. 22, no. 4, pp. 10–16, 2005.
- [194] M. F. Triola, *Estadística*, 9th ed. Pearson Addison Wesley, 2004, vol. 66.
- [195] S. M. Jonathan, “Determinación del nivel de contaminación por metales pesados en sedimentos de la laguna el conejo del municipio de Altamira,” Ph.D. dissertation, Instituto Tecnológico de Ciudad Madero, 2017. [Online]. Available: http://repositorio.tecnm.mx:8080/jspui/bitstream/123456789/51/1/Simulaci%03n_de_una_L%03nea_de_Transmisi%03n_con_Compensaci%03n_Serie_Ante_Diferentes_Tipos_de_Fallas.pdf
- [196] D. Rubio Fernández, C. Chica, and M. Parra, “Obtención de ácidos grasos a partir de biomasa microalgal cultivada bajo diferentes condiciones de iluminación,” *Revista Elementos.*, no. 3, pp. 111–119, 2013.
- [197] Y. Feng, C. Li, and D. Zhang, “Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium,” *Bioresource Technology*, vol. 102, no. 6, pp. 101–105, 2011. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.016>
- [198] V. Ashok, A. Shriwastav, P. Bose, and S. K. Gupta, “Phycoremediation of wastewater using algal-bacterial photobioreactor: Effect of nutrient load and light intensity,” *Bioresour. Technol. Reports*, vol. 7, p. 100205, 2019. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100205>

- [199] N. Rashid, M. S. U. Rehman, and J. I. Han, *Use of chitosan acid solutions to improve separation efficiency for harvesting of the microalga Chlorella vulgaris*. Elsevier B.V., 2013, vol. 226. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2013.04.062>
- [200] B. H. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, 2004, vol. 8.
- [201] Y. Meng, C. Yao, S. Xue, and H. Yang, “Application of fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in determination of microalgal compositions,” *Bioresour. Technol.*, vol. 151, pp. 347–354, 2014. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.064>
- [202] Dilek (Yalcin) Duygu, “Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for identification of *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890 and *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing 1833,” *African J. Biotechnol.*, vol. 11, no. 16, pp. 3817–3824, 2012.
- [203] B. Smith, *Infrared spectral interpretation*. CRC Press LLC, 1999.
- [204] J. N. Murdock and D. L. Wetzel, “FT-IR microspectroscopy enhances biological and ecological analysis of algae,” *Appl. Spectrosc. Rev.*, vol. 44, no. 4, pp. 335–361, 2009.
- [205] W. Heinz, Fabian; Mäntele, “Infrared spectroscopy of proteins,” in *Handb. Vib. Spectrosc.*, L.& Sons@, Ed., 2006, pp. 3399–3425.
- [206] Y. Zhang, X. Kong, Z. Wang, Y. Sun, S. Zhu, L. Li, and P. Lv, “Optimization of enzymatic hydrolysis for effective lipid extraction from microalgae *Scenedesmus sp.*” *Renew. Energy*, vol. 125, pp. 1049–1057, 2018.
- [207] C. Esther Elizabeth Grace, P. Kiruthika Lakshmi, S. Meenakshi, S. Vaidyanathan, S. Srisudha, and M. Briget Mary, “Biomolecular transitions and lipid accumulation in green microalgae monitored by FTIR and Raman analysis,” *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 224, p. 117382, 2020. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117382>
- [208] X. Liu, H. He, Y. Wang, S. Zhu, and X. Piao, “Transesterification of soybean oil to biodiesel using CaO as a solid base catalyst,” *Fuel*, vol. 87, no. 2, pp. 216–221, 2008.
- [209] E. Indhumathi, P.; Soundararajan, M.; Syed Shabudeen, P.S.; Soba, U.S; Suresh, “Utilization, isolation and characterization of *Chlorella vulgaris* for carbon and waste water sequestration treatment,” *Asian J. Microbiol. Biotechnol. Environ.*, no. 4, pp. 661–666, 2013.