

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS**



**ESCALAMIENTO DE UN FOTOBIOREACTOR A NIVEL DE  
PLANTA PILOTO PARA LA REMOCIÓN DE NUTRIENTES  
MEDIANTE MICROALGAS INMOVILIZADAS.**

**TESIS**

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS  
PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFIA COSTERA**

**PRESENTA**

**CUAUHTÉMOC ULISES MORENO MEDINA**

**ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MEXICO. NOVIEMBRE, 2007.**

## ESCALAMIENTO DE UN FOTOBIOREACTOR A NIVEL DE PLANTA PILOTO PARA LA REMOCIÓN DE NUTRIENTES MEDIANTE MICROALGAS INMOVILIZADAS.

### Resumen.

Las aguas residuales de origen agrícola y domésticas contienen, entre otros componentes, altas concentraciones de fósforo inorgánico y de nitrógeno, por lo que pueden originar eutrofización en los cuerpos de agua donde se descargan. Una opción para remover el fósforo inorgánico y el nitrógeno es el empleo de microalgas. En el presente trabajo se removió nitrógeno amoniacal y fósforo total disuelto del agua residual tratada de un efluente de un tratamiento secundario (lodos activados) mediante la utilización de microalgas *Scenedesmus obliquus* inmovilizadas en alginato de sodio; se contrastó la eficiencia de remoción de nitrógeno amoniacal y fósforo total disuelto de un sistema de flujo continuo ( $1.19 \text{ ml min}^{-1}$ ) y un sistema por lote, ambos con un fotoperíodo de 12 horas de exposición a la luz por 12 horas en oscuridad y durante 140 horas aproximadamente. La condición de cultivo más eficiente se escaló a nivel de planta piloto (50 litros) para comparar su eficiencia con los sistemas de tratamiento convencionales y evaluar la calidad de la microalga cosechada. Tanto en los bioreactores a nivel laboratorio como en el bioreactor a nivel piloto se presentaron las mayores remociones de  $\text{PO}_4$  total y de  $\text{N-NH}_4$  a las 35 hrs de tratamiento, con los siguientes porcentajes. En el fotobioreactor con flujo continuo (BFC) a nivel laboratorio las remociones de  $\text{PO}_4$  total y de  $\text{N-NH}_4$  fueron 19-68% y 35- 55%, respectivamente. Para los fotobioreactores por lote nivel laboratorio (BL) los porcentajes de remoción de  $\text{PO}_4$  total y de  $\text{N-NH}_4$  fueron 57-78% y 45.2-52.9%, respectivamente. Además, en los BL la remoción de SST y  $\text{DBO}_5$  fue mayor que en BFC, por lo que se eligió el BL para su escalamiento a nivel piloto al aire libre. El fotobioreactor por lote a nivel piloto (BLP) presentó porcentajes de remoción de  $\text{PO}_4$  y de  $\text{N-NH}_4$  de 31.8%-76.4% y 25%-40%, respectivamente; con las mayores remociones de  $\text{N-NH}_4$  por gramo de peso orgánico por hora de 23.6 mg a las primeras 35 horas de tratamiento y 1.5 mg de  $\text{PO}_4$  por gramo de peso orgánico por hora en el mismo lapso de tiempo. La calidad del agua del efluente del fotobioreactor a nivel piloto comparada con los sistemas convencionales de tratamiento fue menor en términos de SST y  $\text{DBO}_5$  y solo fue similar en términos de nutrientes con las cuatro combinaciones de siguientes procesos: lodos activados con filtración granular, lodos activados con filtración granular y adsorción de carbón, lodos activados con nitrificación y lodos activados con nitrificación-desnitrificación, por lo que sólo se recomienda el uso del efluente para riego agrícola. *Scenedesmus obliquus* presentó un incremento progresivo en la clorofila a, biomasa, proteínas y lípidos.

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS  
POSGRADO EN OCEANOGRÁFIA COSTERA

ESCALAMIENTO DE UN FOTOBIOREACTOR A NIVEL DE  
PLANTA PILOTO PARA LA REMOCIÓN DE NUTRIENTES  
MEDIANTE MICROALGAS INMOVILIZADAS.

TESIS

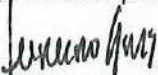
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS  
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFIA COSTERA

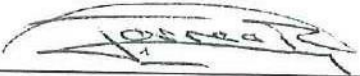
PRESENTA

CUAUHTÉMOC ULISES MORENO MEDINA


Aprobada por:



Dr. Leopoldo G. Mendoza Espinosa  
Director de tesis



Dr. Juan Gabriel Correa Reyes  
Sinodal



Dra. Maria Del Pilar Sánchez Saavedra  
Sinodal

## Índice.

	Página.
1. Introducción.	1
2. Objetivo.	6
2.1. Objetivos particulares.	6
3. Materiales y métodos.	7
3.1. Cepa de microalgas.	7
3.2. Inmovilización de microalgas.	7
3.3. Evaluación del fotobioreactor.	9
3.4. Fotobioreactor a nivel laboratorio.	10
3.5. Escalamiento del fotobioreactor.	12
3.6. Evaluación de la calidad del agua.	13
3.7. Crecimiento de las microalgas en el fotobioreactor.	19
3.8. Análisis estadístico.	23
4. Resultados.	25
4.1. Fotobioreactor con flujo continuo nivel laboratorio.	25
4.2. Fotobioreactor por lote nivel laboratorio.	32
4.3. Fotobioreactor por lote piloto.	39
4.3.1 Crecimiento de las microalgas en el fotobioreactor por lote piloto.	46
4.4. Fotobioreactor por lote piloto en relación a los sistemas convencionales de tratamiento	52
5. Discusión.	54
5.1 Remoción de fósforo total y nitrógeno amoniacal en el fotobioreactor por lote y continuo a nivel laboratorio.	54

5.2.	Comparación entre el fotobioreactor por lote piloto y los sistemas convencionales de tratamiento.	57
5.3.	Remoción de fósforo total y nitrógeno amoniacal en el fotobioreactor piloto al aire libre.	57
5.4.	Sólidos suspendidos totales y DBO <sub>5</sub> .	58
5.5.	Cambios del pH.	59
5.6.	Remoción de coliformes fecales.	60
5.7.	Crecimiento microalgal.	61
5.8.	Composición proximal de las microalgas inmovilizadas.	62
5.9.	Viabilidad de la matriz de alginato.	64
5.10.	Comparación de los sistemas convencionales de tratamiento en relación del fotobioreactor piloto.	65
6.	Conclusiones.	68
7.	Referencias.	70

## Índice de Figuras

	Página
<b>Figura 1</b> Esquema del funcionamiento del fotobioreactor flujo continuo.	11
<b>Figura 2</b> Fotobioreactores piloto de 50 litros con microalgas inmovilizadas al aire libre.	13
<b>Figura 3</b> Porcentajes de remoción promedio y desviación estándar (líneas horizontales) de $\text{PO}_4$ total y $\text{N-NH}_4$ en el fotobioreactor con flujo continuo (BFC) a nivel laboratorio y bioreactor control (BC).	25
<b>Figura 4</b> Valor promedio y desviación estándar (líneas horizontales) de los sólidos suspendidos totales (SST) en el tiempo de operación del fotobioreactor en condiciones continuas (BFC) y fotobioreactor control (BC).	28
<b>Figura 5</b> Valor promedio y desviación estándar (líneas horizontales) del $\text{DBO}_5$ registrado en el fotobioreactor continuo con microalgas inmovilizadas (BFC) y fotobioreactor control (BC).	29
<b>Figura 6</b> Valor promedio y desviación estándar (líneas horizontales) de las grasas y aceites registradas en el fotobioreactor continuo con microalgas inmovilizadas (BFC) e Inóculo.	30
<b>Figura 7</b> Valor promedio y desviación estándar (líneas horizontales) del pH observado en el fotobioreactor con flujo continuo (BFC) y el fotobioreactor control.	31
<b>Figura 8</b> Porcentajes de remoción promedios y desviación estándar (líneas horizontales) de $\text{N-NH}_4$ y $\text{PO}_4$ total registrados en el fotobioreactor por lote (BL) y el fotobioreactor control (BC).	32

<b>Figura 9</b>	Valor promedio y desviación estándar (en líneas horizontales) de los SST en el fotobioreactor por lote (BL) y fotobioreactor control (BC).	35
<b>Figura 10</b>	Valor promedio y desviación estándar (en líneas horizontales) del DBO <sub>5</sub> en el fotobioreactor por lote (BL) y fotobioreactor control (BC).	36
<b>Figura 11</b>	Valor promedio y desviación estándar (líneas horizontales) de las grasas y aceites registradas en el fotobioreactor por lote con microalgas inmovilizadas (BL) e Inóculo.	37
<b>Figura 12</b>	Valor promedio y desviación estándar (líneas horizontales) del pH observado en el fotobioreactor por lote (BL) y fotobioreactor control (BC).	38
<b>Figura 13</b>	Valores promedios y desviación estándar (líneas horizontales) de los porcentajes de remoción de PO <sub>4</sub> total y N-NH <sub>4</sub> presentados en el fotobioreactor por lote a nivel piloto (BLP) y fotobioreactor control (BC).	40
<b>Figura 14</b>	Valor promedio y desviación estándar (líneas horizontales) de los SST presentados en el fotobioreactor por lote a nivel piloto (BLP) y fotobioreactor control (BC).	43
<b>Figura 15</b>	Valor promedio y desviación estándar (líneas horizontales) del DBO <sub>5</sub> presentado en el fotobioreactor por lote a nivel piloto (BLP) y fotobioreactor control (BC).	44
<b>Figura 16</b>	Valor promedio y desviación estándar (líneas horizontales) de las grasas y aceites registradas en el fotobioreactor por lote nivel piloto con microalgas inmovilizadas (BL) e Inóculo.	45

<b>Figura 17</b>	Valor promedio y desviación estándar (líneas horizontales) del pH observado en el fotobioreactor por lote a nivel piloto (BLP) y fotobioreactor control (BC).	46
<b>Figura 18</b>	Valor promedio y desviación estándar (líneas horizontales) del peso orgánico registrado en las microalgas inmovilizadas en el fotobioreactor por lote a nivel piloto (BLP).	47
<b>Figura 19</b>	Valor promedio y desviación estándar (líneas horizontales) del número de células en las esferas del fotobioreactor por lote a nivel piloto (BLP).	48
<b>Figura 20</b>	Valor promedio y desviación estándar (líneas horizontales) de la Clorofila a registrada en el fotobioreactor a nivel piloto (BLP).	49
<b>Figura 21</b>	Valor medio y desviación estándar (líneas horizontales) de los análisis bioquímicos proximales realizados en las microalgas inmovilizadas en el fotobioreactor por lote piloto (BLP).	50

## Índice de tablas

		Página
<b>Tabla I</b>	Limites máximos permisibles para contaminantes básicos (tomada de la NORMA Oficial Mexicana NOM-003-SEMARNAT-1997).	15
<b>Tabla II</b>	Limites máximos permisibles de indicadores de contaminación fecal.	14
<b>Tabla III</b>	Diluciones y denominación de cada una de estas.	16
<b>Tabla IV</b>	Valores estadísticos calculados para los contrastes de PO <sub>4</sub> total entre los fotobioreactores con flujo continuo (BFC) en relación a los fotobioreactores control (BC).	26
<b>Tabla V</b>	Valores estadísticos calculados para los contrastes de N-NH <sub>4</sub> entre los fotobioreactores con flujo continuo (BFC) en relación a los fotobioreactores control (BC).	27
<b>Tabla VI</b>	Valores promedio y desviación estándar ( $\pm$ D.S.) de la concentración de coliformes fecales en el inóculo y después del tratamiento en el fotobioreactor con flujo continuo (BFC).	27
<b>Tabla VII</b>	Estadísticos calculados para los contrastes de SST entre los fotobioreactores con flujo continuo (BFC) en relación a los fotobioreactores control (BC).	29
<b>Tabla VIII</b>	Valores estadísticos calculados para los contrastes de DBO <sub>5</sub> entre los fotobioreactores con flujo continuo (BFC) en relación a los fotobioreactores control (BC).	30

<b>Tabla IX</b>	Valores estadísticos calculados para los contrastes de pH entre los fotobioreactores con flujo continuo (BFC) en relación a los fotobioreactores control (BC).	31
<b>Tabla X</b>	Valores calculados para los contrastes estadísticos de PO <sub>4</sub> total entre los fotobioreactores por lote (BL) en relación a los fotobioreactores control (BC).	33
<b>Tabla XI</b>	Valores de los contrastes estadísticos de N-NH <sub>4</sub> entre los fotobioreactores por lote (BL) en relación a los fotobioreactores control (BC).	33
<b>Tabla XII</b>	Concentración de coliformes fecales en el inóculo y valores promedio y desviaciones estándar ( $\pm$ D.S.) de la remoción de coliformes fecales después del tratamiento en el fotobioreactor por lote piloto (BLP) a cada 35 hrs.	34
<b>Tabla XIII</b>	Contrastes estadísticos de los valores de SST entre los fotobioreactores por lote (BL) en relación a los fotobioreactores control (BC).	34
<b>Tabla XIV</b>	Contrastes estadísticos de los valores de DBO <sub>5</sub> entre los fotobioreactores por lote (BL) en relación a los fotobioreactores control (BC).	35
<b>Tabla XV</b>	Contrastes estadísticos de los valores de pH entre los fotobioreactores por lote (BL) en relación a los fotobioreactores control (BC).	38
<b>Tabla XVI</b>	Valores estadísticos resultado del contraste de PO <sub>4</sub> total en el fotobioreactor por lote piloto (BLP) en relación a las concentraciones observadas en el fotobioreactor control (BC) a cada 35 hrs de muestreo.	40

<b>Tabla XVII</b>	Valores estadísticos del contraste de las concentraciones de N-NH <sub>4</sub> en el fotobioreactor por lote piloto (BLP) a cada 35 hrs del inóculo en relación a las concentraciones observadas en el fotobioreactor control (BC).	41
<b>Tabla XVIII</b>	Valor medio y desviación estándar de las tasas de remoción normalizadas de N-NH <sub>4</sub> y PO <sub>4</sub> total para los fotobioreactores por lote piloto.	42
<b>Tabla XIX</b>	Concentración de coliformes fecales en el inóculo y valor medio y desviación estándar ( $\pm$ D.S.) de la remoción de coliformes fecales después del tratamiento en el fotobioreactor por lote piloto (BLP).	42
<b>Tabla XX</b>	Contrastes estadísticos de los valores de SST entre los fotobioreactores por lote piloto (BLP) en relación a los fotobioreactores control (BC).	43
<b>Tabla XXI</b>	Estadísticos calculados de los contrastes de DBO <sub>5</sub> entre los fotobioreactores por lote piloto (BLP) en relación a los fotobioreactores control (BC).	44
<b>Tabla XXII</b>	Valores estadísticos de pH entre los fotobioreactores por lote piloto (BLP) en relación a los fotobioreactores control (BC).	45
<b>Tabla XXIII</b>	Valores estadísticos de peso orgánico entre las muestras tomadas cada 35 hrs en el fotobioreactor por lote piloto (BLP).	47
<b>Tabla XXIV</b>	Valor medio y desviación estándar ( $\pm$ D.S.) del tamaño de las microalgas en promedio en el fotobioreactor por lote piloto (BLP) registrado cada 35 hrs de uso de las microalgas inmovilizadas.	49

<b>Tabla XXV</b>	Valores estadísticos de lípidos entre las muestras a diferentes horas en el fotobioreactor por lote piloto (BLP).	51
<b>Tabla XXVI</b>	Valores estadísticos de proteínas entre las muestras a diferentes horas en el fotobioreactor por lote piloto (BLP).	51
<b>Tabla XXVII</b>	Niveles de tratamiento alcanzados con diferentes combinaciones sistemas para el tratamiento de aguas residuales (modificada a partir de Metcalf & Eddy Inc, (2003)).	53

## 1. Introducción.

El aumento en la población humana ha tenido como consecuencia un incremento en el consumo de agua para fines urbanos, industriales y agrícolas, lo que implica un mayor flujo de contaminantes a los cuerpos de agua, por descargas de aguas residuales de estas actividades (Kuo-Tung *et al.*, 2005). Actualmente, a escala global se usa cerca del 65% del agua dulce disponible para irrigación, el 20% se usa en las industrias y cerca del 15% es destinado para uso doméstico (Levine y Asano, 2004). Estas tendencias mundiales son reflejadas claramente en el uso del agua a nivel nacional, ya que el 76% del agua concesionada en el país es destinada para uso agropecuario (Comisión Nacional del Agua, 2005).

Las aguas residuales de origen agrícola y de actividades domésticas contienen, entre otros contaminantes, altas concentraciones de fósforo inorgánico y de nitrógeno, por lo que pueden originar una eutrofización en los cuerpos de agua donde se descargan (Chevalier *et al.*, 2000).

Esta reducción en la calidad del agua asociada con las actividades humanas ha originado problemas de salud pública y ambiental (Hoffmann, 1998). Tal es el caso del dinoflagelado estuarino *Pfiesteria piscicida*, el cual sintetiza una exotoxina, que provoca hemorragias y muerte en moluscos y peces, e incluso la exposición del ser humano al aerosol de dicha exotoxina a una concentración mayor o igual a 2000 células  $\text{ml}^{-1}$ , puede provocar narcosis, vómito y dolor estomacal severo en el caso de una exposición de unas horas y

hasta pérdida breve de la memoria, si se prolonga la exposición a semanas (Glasgow *et al.*, 1995).

Existen tratamientos químicos para remover nutrientes de las aguas residuales, sin embargo estos procesos suelen requerir altos consumos de energía y reactivos químicos por lo que resultan costosos; además dichos tratamientos suelen producir remanentes de productos que afectan la eficacia de los lodos que se emplean en las plantas de tratamiento (Hoffmann, 1998).

Una alternativa para reducir la alta descarga de nutrientes, es implementar el uso de microalgas para el tratamiento de aguas residuales que desde hace más de 50 años se ha sugerido, ya que se reconoce que son muy efectivas en reducir la demanda bioquímica de oxígeno, así como también el nitrógeno y fósforo disuelto de descargas de aguas residuales domésticas (Nuñez *et al.*, 2001).

La ventaja del uso de microalgas en relación a los sistemas heterotróficos, como las plantas de lodos activados, es que se requiere de baja infraestructura y reduce el uso de energía, ya que la producción de oxígeno fotosintético puede remplazar a la aireación mecánica. Además, la producción simultánea de biomasa microalgal tiene el potencial de ser utilizada como complemento proteico o aditivo para alimento en la acuicultura, como aporte de energía, ya sea en forma de bio-gas o combustible y como fertilizantes o acondicionadoras de suelos en la agricultura (Mallick, 2002).

En las pasadas décadas, se han llevado a cabo diversos estudios para determinar la eficiencia de los cultivos intensivos de microalgas para el

tratamiento terciario de aguas residuales (Paniagua-Michel *et al.*, 1987; Gantar *et al.*, 1991; Cheung *et al.*, 1995; Gonzalez *et al.*, 1997; Chevalier *et al.*, 2000; Abe *et al.*, 2002; Chuntapa *et al.*, 2003; Lodi *et al.*, 2003).

Una especie de microalga que se utiliza frecuentemente para la remoción de nutrientes es *Scenedesmus obliquus* ya que se encuentra comúnmente en los efluentes de las plantas de tratamiento (Sebastian y Nair, 1984; Lavoie y de la Noüe, 1985; De La Noüe y Basseres, 1989; Tam y Wong, 1989; Voltolina *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2000; Nuñez *et al.*, 2001; Voltolina *et al.*, 2005; Gómez-Villa *et al.*, 2005). Sin embargo, una limitación práctica en sistemas de tratamiento con microalgas es la cosecha de la biomasa al final del proceso de tratamiento (Lau *et al.*, 1998).

Una alternativa para solucionar este problema es atrapar a las células de las microalgas en una matriz (Chevalier y De La Noüe, 1985a). Una célula inmovilizada es definida como una célula a la que, por medios ya sean naturales o artificiales, se le impide moverse independientemente de sus "vecinas" dentro de la fase acuosa del sistema de estudio (Mallick, 2002). Uno de los métodos más utilizados en laboratorio es confinar las células de las microalgas en una esfera de gel, siendo los más empleados el alginato y el carragenano.

En la literatura existen trabajos sobre la eficiencia de la remoción de nutrientes por microalgas inmovilizadas. Dentro de los cuales, Chevalier y De La Noüe (1985a) reportan que cultivos de microalgas *Scenedesmus quadricauda* hiperconcentrados (arriba de  $3.2 \text{ g L}^{-1}$  de peso seco) inmovilizados

con carragenano son viables para remover eficientemente nitrógeno y fósforo de agua residual tratada de un efluente secundario, funcionando como un tratamiento terciario. Por otro lado, Chevalier y De La Noüe (1985b), documentan el uso de *Scenedesmus obliquus* en cultivos libres e inmovilizados con carragenano, concluyendo que los niveles de remoción de nitrógeno y fósforo son similares en los tratamientos inmovilizados y en los libres. Travieso *et al.*, (1996) al realizar tratamientos con cultivos de *Chlorella vulgaris*, *Chlorella kessleri* y *Scenedesmus quadricauda*, inmovilizados internamente con alginato de sodio y carragenano, y externamente con poliestireno y poliuretano, obtuvieron los resultados mas eficientes con *Chlorella vulgaris* inmovilizada con alginato de sodio y en columnas con luz natural.

Lau *et al.*, (1998) estudiaron el efecto de la matriz de carragenano en la actividad de la nitrato reductasa, evidenciando que no existen efectos adversos tanto en el crecimiento como en la fisiología de la microalga *Chlorella vulgaris* ya que se conserva la actividad de la enzima estudiada. ; Mallick, 2002 hace una compilación de los estudios en los cuales se utilizaron microalgas inmovilizadas para remover nitrógeno, fósforo y metales pesados en aguas residuales.

De Bashan *et al.*, (2002a) en un estudio realizado con cultivos de *Chlorella vulgaris* y de *Chlorella sorokiniana* coinmovilizadas en alginato de sodio con la bacteria *Azospirillum brasilense* Cd, registraron cambios significativos en el tamaño de la población microalgal, tamaño de célula, pigmentos, contenido de lípidos y en los ácidos grasos; en relación a la misma

microalga inmovilizada sin bacteria. De Bashan *et al.*, (2002b) al utilizar cepas de *Chlorella vulgaris* coinmovilizadas en alginato de sodio con la bacteria *Azospirillum brasilense* y someterlas a agua residual sintética reportaron un incremento significativamente mayor en la remoción de nitrógeno amoniacal y fósforo en relación a las mismas cepas de microalgas inmovilizadas sin bacterias.

Sin embargo, en los trabajos anteriores se han utilizado fotobioreactores de volúmenes menores a un litro y tratando, en la mayoría de los casos, sólo agua residual artificial. Teniendo como antecedente las aportaciones de los trabajos mostrados anteriormente, surge el presente proyecto; en el que se realizó la implementación de las microalgas *Scenedesmus obliquus* inmovilizadas para remover nitrógeno amoniacal y fósforo total disuelto de agua residual tratada de un efluente secundario con un sistema de flujo continuo y un sistema por lote, ambos con un fotoperíodo de 12 horas de exposición a la luz por 12 horas a la oscuridad. La condición de cultivo más eficiente se escaló a nivel de planta piloto, 50 litros, con el fin de comparar su eficiencia con los sistemas de tratamiento convencionales y evaluar la calidad del microalga cosechada, para proponer un posible uso de la biomasa microalgal.

## 2. Objetivo.

Implementar un fotobioreactor a escala piloto para el tratamiento terciario de aguas residuales urbanas empleando *Scenedesmus obliquus* inmovilizada en alginato de sodio.

### 2.1. Objetivos particulares.

- Evaluar la eficiencia de tratamiento de aguas residuales verdaderas, a nivel laboratorio, en un cultivo continuo y uno por lote con ciclos de 12 horas luz por 12 horas oscuridad.
- Implementar la operación del fotobioreactor a escala piloto, con el sistema que resulte más eficiente (lote o continuo).
- Evaluar la calidad del agua del efluente del fotobioreactor, a escala piloto, con el sistema más eficiente
- Comparar la calidad del agua del efluente del fotobioreactor a nivel piloto con los sistemas convencionales de tratamiento.
- Determinar la composición proximal bioquímica de la biomasa cosechada de *Scenedesmus obliquus* al final del proceso de tratamiento en el fotobioreactor a nivel piloto.

### **3. Materiales y métodos.**

#### **3.1. Cepa de microalgas.**

La cepa de *Scenedesmus obliquus* se obtuvo de la colección del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). La cepa se inoculó en monocultivo con altas concentraciones de nutrientes para que la microalga no sufriera de un desequilibrio importante al momento de cultivarse en el agua residual. El medio de cultivo se elaboró con las siguientes concentraciones (en mg l<sup>-1</sup>): 7 de NaCl, 4 de CaCl<sub>2</sub>, 2 de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 15 de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 115 de NH<sub>4</sub>Cl, siendo una modificación al descrito por De-Bashan *et al.*, (2002b). Se mantuvo una relación de N:P de 19.6:1, similar a la relación observada en la planta de tratamiento de aguas residuales de la Universidad Autónoma de Baja California, unidad de Ciencia y Tecnología en Ensenada, de 10:1 en promedio. Los metales traza y vitaminas se agregaron en referencia al medio F/2 (Guillard y Ryther, 1962). El cultivo se colocó en matraces Pyrex de 250 ml, a temperatura ambiente (28±2 °C) y con iluminación continua de 135 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, suministrada por cuatro lámparas de luz blanca fluorescente (General Electric de 40 watts).

#### **3.2. Inmovilización de microalgas.**

Las microalgas se inmovilizaron según la técnica descrita por Tam y Wong, (2000) y De-Bashan *et al.*, (2002a). Se tomó un volumen de cultivo con una densidad aproximada de 2 x 10<sup>6</sup> células ml<sup>-1</sup> y se centrifugaron a 2000 rpm

durante 15 minutos. Después de ese tiempo las microalgas se resuspendieron en 50 ml de agua destilada. Posteriormente se mezclaron las microalgas concentradas con 50 ml de solución de alginato de sodio al 4%, para obtener una concentración de alginato de sodio final al 2%. La mezcla se colocó en una bureta de 50 ml con una punta de micropipeta de 200  $\mu$ l y mediante goteo se incorporó en una disolución de  $\text{CaCl}_2$  al 2% agitándose suavemente por aproximadamente 15 min. Las esferas se mantuvieron en reposo por una hora a 22°C para posteriormente ser lavadas con agua corriente aproximadamente 5 min. Con 100 ml de mezcla microalga-alginato se formaron alrededor de 6500 esferas.

Para el caso de la inmovilización de las microalgas para los biorreactores al aire libre, se tomó un volumen de 1,750 ml de un cultivo con  $7 \times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$  y se mezclaron con 1,750 ml de alginato de sodio al 4%, teniendo un volumen residual de 3,500 ml.

Para facilitar el proceso de elaboración de las esferas, la mezcla se colocó de forma continua en 20 puntas de pipetas automáticas de 10 ml, que a su vez tenían puntillas de pipetas automáticas de 200  $\mu$ l. Después se continuó con el procedimiento antes descrito de Tam y Wong, (2000) y De-Bashan *et al.*, (2002a). Mediante este método se realizaron alrededor de 227,500 esferas, resultando en una densidad de 4.55 esferas  $\text{ml}^{-1}$  en los bioreactores de 50,000 ml.

### 3.3. Evaluación del fotobioreactor.

Se evaluó la eficiencia del fotobioreactor por lote y en flujo continuo de agua residual a nivel laboratorio. Al fotobioreactor en operación por lote se le renovó el agua residual aproximadamente cada 35 horas, hasta completar un uso de las esferas de 140 horas aproximadamente. El fotobioreactor con operación continua tuvo un flujo constante de agua residual, con un tiempo de residencia de aproximadamente 35 horas, siendo un flujo de  $1.19 \text{ ml min}^{-1}$ , durante 140 horas aproximadamente, con una renovación de agua residual cada 24 horas. El flujo se ajustó mediante el uso de llaves plásticas; por gravedad se hizo correr el agua residual, colocando en la parte superior el depósito de agua residual, y mediante flujo residual se colectó el agua tratada de los fotobioreactores (Fig. 1). En las dos condiciones antes descritas, a las esferas se les sometió a una recalcificación cada 35 horas, para mantener la matriz de alginato de sodio el mayor tiempo posible y así evitar la degradación y liberación al medio de cultivo tanto la misma matriz como las microalgas, la cual se llevó a cabo sumergiendo las esferas en una disolución de  $\text{CaCl}_2$  al 2%, agitándose suavemente por 15 min, para después ser lavadas las esferas con agua corriente y ser reintroducidas en el fotobioreactor.

Ambos sistemas fueron mantenidos con un ciclo de 12 horas luz por 12 horas de oscuridad mediante el uso de un dispositivo de encendido automático de las lámparas (Timer).

Con el fin de poder evaluar la operatividad de los fotobioreactores se realizaron dos ensayos experimentales: El primero se realizó con

fotobioreactores de flujo constante de agua residual y microalgas inmobilizadas vs bioreactores con flujo constante de agua residual pero sin microalgas (blanco). El segundo se efectuó con fotobioreactores en condiciones estáticas con microalgas inmobilizadas vs birreactores en condiciones estáticas pero sin microalgas. Todas las condiciones experimentales fueron realizadas por triplicado y a un volumen de operación de 2,500 ml.

La condición experimental más eficiente de la sección anterior en términos de calidad del agua por sus porcentajes de remoción de  $PO_4$  total,  $N-NH_4$ , coliformes fecales, sólidos suspendidos totales, demanda biológica de oxígeno y grasas y aceites.

Tomando en consideración el diseño y eficiencia de remoción de nutrientes, se construyó un sistema de fotobioreactor piloto de aproximadamente 50 litros para evaluar su eficiencia, en términos de la calidad del agua, y además, evaluar el crecimiento y la composición proximal de proteínas y lípidos de *Scenedesmus obliquus*.

#### **3.4. Fotobioreactor a nivel laboratorio.**

Para contrastar el sistema en condiciones estáticas contra el de flujo continuo, se instalaron reactores en laboratorio que consistieron en recipientes de 3,000 ml aproximadamente, operados a 2,500 ml y hechos de Polietileno Tereftalato (PET) (Figura 1). Para el caso de flujo continuo, se les instaló un garrafón con agua residual, el cual contaba con llaves y mangueras plásticas para controlar el flujo de salida y para transportar el agua residual a los reactores. A los reactores se les se le hizo un orificio en la parte superior, el

cual permitió un flujo de salida por volumen excedente. En dicho orificio se les colocó una manguera plástica de 1 cm de diámetro. El agua de salida de los reactores fue colectada para su análisis posterior, siguiendo los métodos de almacenamiento de muestras correspondiente en cada análisis.

Para el caso de los sistemas en condiciones estáticas (lote), estos se mantuvieron en envases de PET de 3,000 ml, operados a un volumen de 2,500 ml y con recambios de agua residual cada 35 horas. A ambas condiciones experimentales se les instaló un suministro de entrada de aire y CO<sub>2</sub>, con el cual se mantenían a las esferas en agitación, a través de un compresor adaptado a un filtro con carbón activado y membrana de fibra de vidrio (0.2  $\mu$ m Whatman). El dispositivo difusor de aire se colocó a 0.6 cm aproximadamente de la base del contenedor.

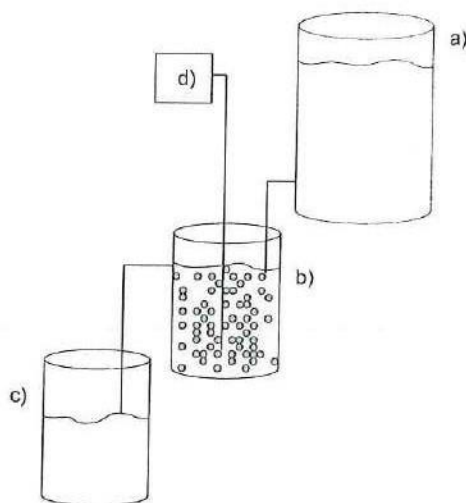


Figura 1. Esquema del funcionamiento del fotobioreactor flujo continuo; a) depósito de agua residual urbana, b) fotobioreactor, c) depósito del efluente tratado por el fotobioreactor y d) compresor de aire.

### 3.5. Escalamiento del fotobioreactor.

Se instalaron seis fotobioreactores a escala piloto, tres fotobioreactores sin esferas, solo conteniendo agua residual tratada (controles) y tres fotobioreactores con microalgas inmovilizadas con el sistema de operación más eficiente. Los fotobioreactores se mantuvieron al exterior y fueron hechos con malla galvanizada, montada en forma cilíndrica, la cual en el interior contenía bolsas de poliuretano, que a su vez se encontraban protegidas por un recipiente plástico en el fondo para evitar rasgaduras. Se instaló un distribuidor de tubería de PVC de una pulgada de diámetro, para suministrar a cada unidad experimental agua residual mediante una bomba sumergible. También se colocó otra red de tubería de PVC de una pulgada de diámetro para airear los fotobioreactores a través de un compresor (Figura 2). Se colocó un contenedor anexo al sistema de aproximadamente 100 litros, con el propósito de mantener momentáneamente (alrededor de 10 minutos) agua residual tratada, con la finalidad de no derramar agua en el área en donde se colocaron los fotobioreactores. Los fotobioreactores se llenaron con 50 litros de agua residual del efluente secundario que se obtuvo de la planta de tratamiento de la Universidad Autónoma de Baja California, plantel Ensenada, y fue renovada cada 35 hrs.

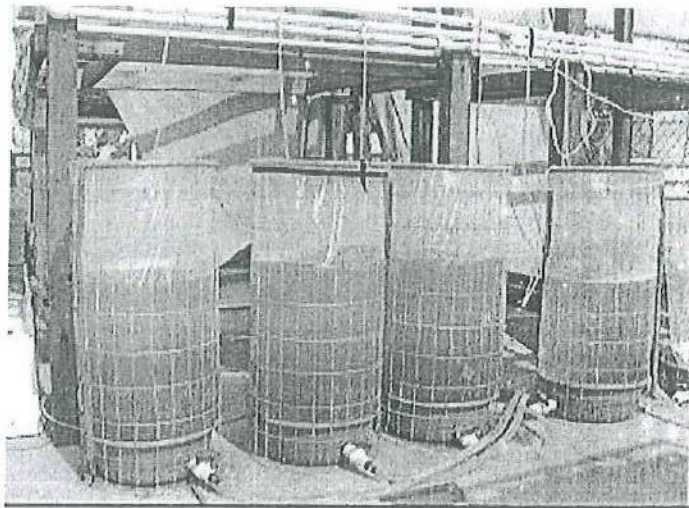


Figura 2. Fotobioreactores piloto de 50 litros con microalgas inmovilizadas al aire libre.

### 3.6. Evaluación de la calidad del agua.

Para determinar la calidad del agua, se tomaron en cuenta los promedios (diarios y mensuales) de los límites máximos permisibles de contaminantes básicos según la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996 (Tabla I). Todos los tratamientos y los análisis del agua fueron realizados por triplicado.

Se analizó la presencia de indicadores de contaminación fecal, mediante la detección de bacterias coliformes fecales, siguiendo la técnica descrita en la Norma Mexicana NMX-AA-042-1987. Se compararon los resultados, obtenidos en este estudio, con los límites máximos permisibles de este contaminante según la Norma Oficial Mexicana NOM-003-SEMARNAT-1997 (Tabla II). El método se basa en la toma de alícuotas de la muestra, en una serie de tubos de medio de cultivo líquido lactosado. En el presente trabajo se utilizaron las diluciones presentadas en la Tabla III. Esta primera parte se define como

prueba presuntiva, en la cual sólo se va a registrar si existe la presencia suficiente de coliformes. Los tubos fueron examinados a las 24 y 48 horas de incubación a 35°C. A los tubos que presentaron turbidez y producción de gas fueron resembrados en un medio confirmativo más selectivo en donde sólo crece la especie *Escherichia coli* (E.C.). Se inoculó con ayuda de un asa bacteriológica a tubos de ensaye que contenían medio E. C. estéril y se incubó por 24 horas a baño maría a 35°C. Mediante tablas estadísticas se llevó acabo el cálculo del número más probable (NMP) de bacterias coliformes fecales.

Tabla II. Limites máximos permisibles de indicadores de contaminación fecal.

Tipo de reuso	Coliformes fecales NMP/100 ml <sup>-1</sup> (Promedio Mensual)
Servicios al publico con contacto directo	240
Servicios al publico con contacto indirecto u ocasional	1,000

Promedio mensual: Es el valor que resulta del promedio geométrico de los análisis practicados a por lo menos a dos muestras simples de un mes.

Tabla I. Límites máximos permisibles para contaminantes básicos (tomada de la NORMA Oficial Mexicana NOM-003-SEMARNAT-1997).

Parámetros (miligramos por litro, excepto cuando se especifique)	Ríos						Embalses naturales y artificiales				Aguas Costeras						Suelo				
	Uso en riego agrícola		Uso público urbano		Protección de vida acuática		Uso en riego agrícola		Uso público urbano		Explotación pesquera, navegación y otros usos		Recreación		Estuarios		Uso en riego agrícola		Humedales naturales		
	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	
Temperatura (°C)	N.A.	N.A.	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	N.A.	N.A.	40	40
Grasas y Aceites	15	25	15	25	15	25	15	25	15	25	15	25	15	25	15	25	15	25	15	25	
Materia Flotante	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
Sólidos Sedimentables	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	N.A.	N.A.	1	2	
Sólidos Suspendidos Totales	150	200	75	125	40	60	75	125	40	60	100	175	75	125	75	125	N.A.	N.A.	75	125	
Demanda Bioquímica de Oxígeno	150	200	75	150	30	60	75	150	30	60	100	200	75	150	75	150	N.A.	N.A.	75	150	
Nitrógeno Total	40	60	40	60	15	25	40	60	15	25	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	15	25	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
Fósforo Total	20	30	20	30	5	10	20	30	5	10	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	5	10	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	

P.D.= Promedio Diario. P.M.= Promedio Mensual. N.A.= No es aplicable.

Tabla III. Diluciones y denominación de cada una de estas.

Alícuota de la muestra (ml)	Denominación	Concentración del medio de cultivo
10	10	Doble
1	1	sencilla
0.1	-1	sencilla
0.01	-2	sencilla
0.001	-3	sencilla

Se determino el nitrógeno amoniacal y el fósforo total disuelto en el fotobioreactor cada 12 horas por un periodo de 107 horas. Cada muestra se analizó por triplicado. Para el nitrógeno total se utilizó la técnica descrita en la norma mexicana (NMX-AA-026-SCFI-2001), la cual consistió en tomar una muestra de 25 ml, a la cual se le ajustó el pH a 7.0, después se le adicionó 25 ml de solución amortiguadora de boratos y se llevo el pH a 9.5 con una solución de NaOH 6N. La muestra se destiló y se colectó en 50 ml de ácido bórico con 3 gotas de indicador Shiro-Toshiro. Para determinar el nitrógeno amoniacal, al destilado se le tituló con ácido sulfúrico 0.02N, hasta que la solución viró de verde esmeralda a morado. Se determinó la concentración de  $N - NH_4$  ( $mg l^{-1}$ ) mediante la siguiente ecuación:

$$N - NH_4 (mg l^{-1}) = \frac{Volumen\ de\ ácido\ gastado \times 0.02N \times 14 \times 1000}{Volumen\ de\ muestra}$$

En el caso del fósforo total se evaluó mediante el método definido en la norma mexicana NMX-AA-029-SCFI-2001, el cual consistió en agregar 1 ml de ácido sulfúrico concentrado y 0.4 gr de persulfato de amonio a una muestra de 50 ml; la muestra se digirió hasta alcanzar un volumen de 10 ml aproximadamente (30 min). Se tomó una alícuota considerando que tuviera una concentración de 0.05 mg a 1 mg de fósforo en un matraz volumétrico de 50 ml, se le añadieron 10 ml del reactivo vanado-molibdato y se aforó a 50 ml. Después de un periodo de 10 min, se le midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Hach DR, 2800) a una longitud de onda de 470 nm, contra un blanco. Previamente se elaboró una curva de calibración a la cual se le realizó una regresión lineal para obtener la ecuación y poder determinar la concentración de fósforo en relación a la absorbancia.

Se analizaron las grasas y aceites conforme la técnica descrita en la norma mexicana NMX-AA-005-SCFI-2000. Se filtró un litro de muestra en un papel filtro (poros de 8  $\mu\text{m}$ ) colocado en un embudo Büchner. Se agregó 100 ml de la suspensión de tierra de diatomeas-sílice sobre el filtro, se aplicó vacío y se lavó con 100 ml de agua destilada. Con ayuda de unas pinzas, se transfirió el material filtrante a un cartucho de extracción. Se limpiaron las paredes internas del embudo y el frasco contenedor de la muestra, así como la parte interna de la tapa del frasco con trozos de papel filtro previamente impregnados de disolvente hexano, teniendo cuidado en remover la película de grasa y los sólidos impregnados sobre las paredes; se colocaron los trozos de papel en el mismo cartucho. Se secó el cartucho en una estufa (Fisher Scientific Isotemp) a

103°C - 105°C por un período de 30 min. Transcurrido este período se colocó el cartucho en el equipo Soxhlet. Se adicionaron 140 ml de hexano al matraz de extracción previamente puesto a peso constante y se ajustó al equipo Soxhlet. Posteriormente se colocó el equipo de extracción sobre la parrilla de calentamiento, se controló la temperatura del reflujo y se extrajo a una velocidad de 20 ciclos/hora durante un período de 4 h. Una vez terminada la extracción se retiró el matraz del equipo Soxhlet, y se dejó evaporar el disolvente. El matraz de extracción libre de disolvente se colocó en el desecador hasta que alcanzó temperatura ambiente. Se pesó el matraz de extracción y se determinó la concentración de grasas y aceites recuperables ( $\text{mg l}^{-1}$ ) mediante la diferencia de pesos entre el primer peso constante sin muestra y el peso constante después de extracción con disolvente y dividiendo entre el volumen de la muestra filtrada.

Los sólidos suspendidos totales (SST) se analizaron en base a lo establecido en la norma mexicana NMX-AA-034-SCFI-2001, la cual consistió en filtrar, en un filtro de fibra de vidrio tipo GF/C en un crisol Gooch puesto a peso constante, un volumen conocido de muestra previamente homogeneizada la cual depende de la concentración esperada de sólidos suspendidos. Se secó el crisol en la estufa a una temperatura de 103°C a 105°C durante 1 hora aproximadamente. Después se enfrió en un desecador a temperatura ambiente por 1 hora y se determinó su peso constante, con la diferencia de pesos se obtuvo la cantidad de SST en  $\text{mg l}^{-1}$

La demanda bioquímica de oxígeno ( $DBO_5$ ) se determinó conforme la norma mexicana NMX-AA-028-SCFI-2001 que consistió en preparar agua para dilución de la muestra añadiendo por cada litro de agua destilada 1 ml de cada una de las siguientes disoluciones: disolución de sulfato de magnesio, disolución de cloruro de calcio, disolución de cloruro férrico y disolución amortiguadora de fosfatos. Dicha solución se oxigenó mediante aireación con difusor por lo menos 1 hora. Se inoculó con una alícuota de 50 ml el frasco tipo Winkler y se llenó con el agua para dilución. Se midió la concentración de oxígeno disuelto al momento de iniciar la incubación y después de 5 días se midió la concentración final de oxígeno. Obteniendo el resultado mediante la siguiente ecuación:

$$DBO_5 = \frac{\text{Oxígeno disuelto inicial (mg l}^{-1}\text{)} - \text{Oxígeno disuelto despues de 5 días (mg l}^{-1}\text{)}}{\% \text{ de dilucion exp resado en decimales}}$$

### 3.7. Crecimiento de las microalgas en el fotobioreactor.

El cálculo del peso de la biomasa orgánica, número de células, concentración de clorofila a, porcentaje de lípidos y proteínas sólo se registraron en los fotobioreactores piloto de 50 litros. Para el análisis de las variables antes mencionadas primero se disolvieron 30 esferas en 5 ml de  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$  (0.25M) pH 7.0±2. La densidad celular se determinó cada 35 horas mediante biomasa en peso seco ( $g l^{-1}$ ), se filtró el volumen resultante después de disolver las esferas a través de un filtro de fibra de vidrio (Osmonics GF/C) de 47 mm de diámetro. Previamente el filtro se incineró a 450°C en una

mufla durante 3 horas, después se colocó en una estufa por 20 min a 103°C y posteriormente se puso en un desecador por 2 horas para obtener su peso constante. Una vez filtrada la muestra nuevamente se colocó en la estufa a 120°C durante 2 horas. Posteriormente se situaron en un desecador por 2 horas, para de nuevo ponerlo a peso constante. La diferencia de peso determinó la biomasa peso seco ( $\text{g l}^{-1}$ ).

El conteo celular se realizó en un contador de partículas Beckman Coulter Multisizer 3, después de obtener las microalgas libres, mediante el procedimiento descrito al inicio del presente apartado se tomó una alícuota de 0.5 ml y se diluyó en 20 ml de ISOTON II.

La determinación de clorofila se realizó cada 35 horas, de acuerdo a Parsons *et al.*, (1984). Después de tener las microalgas libres mediante el procedimiento descrito al inicio del presente apartado, se filtró el volumen a través de filtros de fibra de vidrio (Osmonics GF/C) de 2.4 cm de diámetro. Enseguida se colocó el filtro en tubos de ensaye conteniendo 5 ml de acetona al 90% a 4°C en oscuridad durante 24 h para la extracción de pigmentos. La concentración de clorofila se determinó usando un espectrofotómetro (Hach DR, 2800). La concentración de clorofila a se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Clorofila a (Ca)} = 11.85E_{664} - 1.54E_{647} - 0.08E_{630}$$

Donde E son los valores de absorbancia a las diferentes longitudes de onda (una vez corregidas, sustrayendo la lectura a 750 nm a cada una de las

absorbancias anteriores) y  $C_a$  es la concentración de clorofilas. La cantidad de clorofila en la muestra original se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{mg clorofila/m}^3 = \frac{C \times v}{V \times I}$$

Donde  $v$  (en ml) es el volumen de acetona al 90% empleado (5 ml),  $V$  es el volumen de agua filtrada y  $C$  es la cantidad de clorofila calculada con la ecuación anterior.

Cada 35 horas se determinó la composición proximal bioquímica de *Scenedesmus obliquus*. Se analizaron los lípidos mediante el método de Bligh y Dyer (1959) que consistió en disolver 30 esferas del cultivo, se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio (Osmonics GF/C) de 2.4 cm de diámetro; se colocaron los filtros en tubos de ensayo y se agregaron 0.5 ml de agua destilada, 3 ml de metanol y 2 ml de cloroformo para posteriormente triturarlos con una varilla de vidrio y en baño de hielo. Los tubos se centrifugaron a 4,000 rpm por 15 min y el sobrenadante se colocó en otro tubo de ensayo haciendo una segunda extracción con el tubo anterior con 1 ml de metanol y 2 ml de cloroformo y posteriormente se centrifugó; el sobrenadante se mezcló con el anterior.

Los tubos de ensayo se colocaron a baño maría a 45 - 50°C por 36 horas hasta la evaporación del cloroformo. A cada tubo se le agregó 3 ml de solución de Dicromato de Potasio ácido al 2%, se calentó a 100°C por 15 min. Una vez

enfriado a temperatura ambiente se procedió a leer las muestras a 590 nm en un espectrofotómetro (Hach DR, 2800).

La determinación proximal de las proteínas se realizó mediante la técnica descrita por Lowry *et al.*, (1951) la cual se llevó a cabo filtrando 30 esferas de cultivo disueltas, se colocaron en tubos de ensaye para la extracción con NaOH 0.2N a 100°C por 30 minutos. A temperatura ambiente se centrifugó y se separó el sobrenadante, al cual se le adicionó Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2% en NaOH al 0.1N, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O al 0.5% y tártaro de sodio y potasio al 1%, a una relación de mezcla de 100:1:2 (Correa-Reyes, 1996), respectivamente. Se adicionó 0.5 ml de Folin Ciocalteu. Después de 1.5 h se realizaron lecturas de absorbancia a 700 nm en un espectrofotómetro (Hach DR, 2800).

Las curvas de calibración fueron obtenidas siguiendo las indicaciones descritas por las técnicas colorimétricas, usando un espectrofotómetro. La albúmina bovina (98%) se empleó como estándar de proteína y los cálculos se realizaron en base a la ecuación lineal:

$$\mu\text{g ml}^{-1} \text{ proteina} = A (\text{Abs}) + B$$

Donde *A* es la pendiente de la recta y *B* la ordenada. El porcentaje de proteína fue obtenido mediante las ecuaciones siguientes.

$$\mu\text{g proteina / ml de cultivo} = \frac{(\mu\text{g ml}^{-1} \text{ proteina}) (\text{Volumen de NaOH } 0.2N)}{\text{Volumen de cultivo filtrado}}$$

$$\text{proteina (\%)} = \frac{\mu\text{g proteina / ml de cultivo}}{\text{Biomasa (mg l}^{-1}\text{)}} \times 100$$

### 3.8. Análisis estadístico.

Para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos de calidad del agua, en relación con los límites máximos permisibles de las normas mexicanas y en relación a los diferentes tratamientos para optimizar el fotobioreactor y con la eficiencia de los sistemas de tratamiento convencionales reportados por la literatura se realizaron contrastes múltiples en base al algoritmo estadístico de "Bondad de ajuste" en el que se contrastaron los datos en base a un modelo de homogeneidad, con un  $\alpha=0.5$ . El grado de significancia se eligió de ésta magnitud para tener un equilibrio entre la exactitud y la precisión; en cuanto a la elección de la prueba estadística, se basó en que se asumió no gausseanidad ni homocedasticidad, ya que al asumirla le daría incertidumbre a los contrastes.

La prueba estadística de bondad de ajuste según Daniel, (2000) se basa en la distancia aritmética que existe entre un valor predicho o esperado y un valor observado, como se muestra en seguida:

$$X^2 = \sum \left[ \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i} \right]$$

Donde  $O_i$  es la frecuencia observada para la  $i$ -ésima categoría de la variable de interés, y  $E_i$  es la frecuencia esperada (dado que  $H_0$  es verdadera) para la  $i$ -ésima categoría. La cantidad de  $X^2$  es una medida del grado con el que los pares de frecuencias observadas y esperadas concuerdan en una situación dada; la naturaleza de  $X^2$  es tal que, cuando hay una congruencia muy estrecha entre la frecuencia observada y la esperada, el valor de  $X^2$  es muy pequeño y cuando la congruencia es pobre, dicho valor es muy grande. Por consiguiente, sólo un valor suficientemente grande de  $X^2$  causa el rechazo de la hipótesis nula.

## 4. Resultados.

### 4.1. Fotobioreactor con flujo continuo a nivel laboratorio.

La remoción de  $\text{PO}_4$  total en el fotobioreactor con flujo continuo (BFC) a nivel laboratorio, osciló del 2 al 68%, teniendo los picos más altos de remoción a las 35 horas (hrs), 70 hrs, 105 hrs y 140 hrs de uso de las esferas con porcentajes del 19% (3.1 a 2.5  $\text{mg l}^{-1}$ ) al 68% (4.4 a 1.3  $\text{mg l}^{-1}$ ). En el caso del fotobioreactor control (BC) los porcentajes de remoción de  $\text{PO}_4$  total se mantuvieron dentro del intervalo del 1.7 al 12% de remoción (Fig. 3).

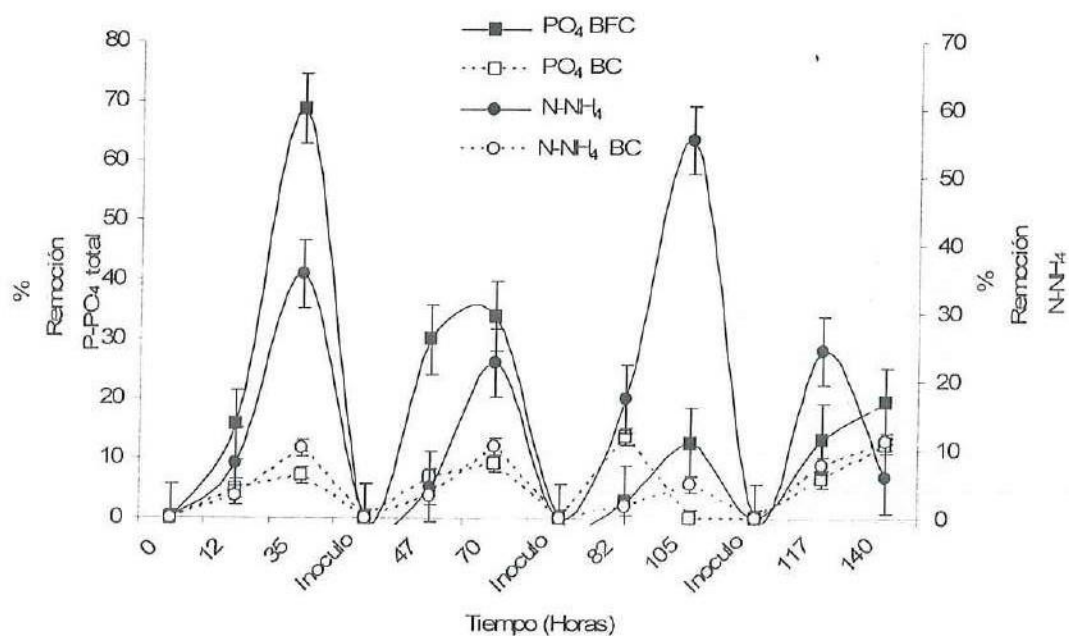


Figura 3. Porcentajes de remoción promedio y desviación estándar (líneas horizontales) de  $\text{PO}_4$  total y  $\text{N-NH}_4$  en el fotobioreactor con flujo continuo (BFC) a nivel laboratorio y bioreactor control (BC).

El análisis estadístico mostró que los porcentajes de remoción de  $\text{PO}_4$  total encontrados en las muestras tomadas a las 35 hrs, 70 hrs y 105 hrs fueron significativamente diferentes en relación a los valores del BC registrados a las mismas horas, exceptuando a la muestra tomada a las 140 hrs (Tabla IV).

Tabla IV. Valores estadísticos calculados para los contrastes de  $\text{PO}_4$  total entre los fotobioreactores con flujo continuo (BFC) en relación a los fotobioreactores control (BC).

	$X^2$ Crítica = 5.99			
Hora de muestreo	35	70	105	140
$X^2$ Calculada (BFC vs BC)	702	110	14:9	2.2

La tabla anterior muestra la  $X^2$  crítica para todos los contrastes y la  $X^2$  calculada para cada grupo de datos de cada hora de muestreo. Los valores de  $X^2$  calculada mayores a la  $X^2$  crítica nos revelan la existencia de una diferencia entre los datos a contrastar, o sea que al presentar un grupo de datos de una hora en particular un valor de  $X^2$  calculada más grande que el de la  $X^2$  crítica nos indica una diferencia estadística significativa entre el grupo de datos en una hora particular de un tratamiento específico (bioreactor flujo continuo) en relación al tratamiento control (fotobioreactor control).

Los porcentajes de remoción de  $\text{N-NH}_4$  en el BFC fueron del 4 al 55%, teniendo los valores más altos a las 35 hrs, 70 hrs, 105 hrs y 140 hrs de uso de las microalgas inmovilizadas, con porcentajes del 35% (41.4 a 26.6  $\text{mg l}^{-1}$ ) al

55% (4.7 a 2.0 mg l<sup>-1</sup>). En el caso del BC, los valores de remoción fueron del 1.7 al 12% de remoción (Fig. 3).

Las pruebas estadísticas realizadas para contrastar las concentraciones de N-NH<sub>4</sub> a las 35 hrs, 70 hrs y 105 hrs de uso de las microalgas inmovilizadas de los fotobioreactores con flujo continuo en relación al fotobioreactor control si fueron significantes en cada muestreo evaluado, exceptuando al tomado a las 140 hrs (Tabla V).

Tabla V. Valores estadísticos calculados para los contrastes de N-NH<sub>4</sub> entre los fotobioreactores con flujo continuo (BFC) en relación a los fotobioreactores control (BC).

Hora de muestreo	X <sup>2</sup> Crítica = 5.99			
	35	70	105	140
X <sup>2</sup> Calculada (BFC vs BC)	92.9	39.5	195	5.3

En el caso de las coliformes fecales, los valores de remoción oscilaron de 78 a 96% (Tabla VI).

Tabla VI. Valores promedio y desviación estándar (± D.S.) de la concentración de coliformes fecales en el inóculo y después del tratamiento en el fotobioreactor con flujo continuo (BFC).

Coliformes fecales en NMP ml <sup>-1</sup>			
Hora de Muestreo (Horas)	Inóculo de agua residual	BFC	Remoción (%)
35	9.10 x 10 <sup>4</sup>	2.00 x 10 <sup>4</sup>	78.0 (± 10.05)
70	9.20 x 10 <sup>4</sup>	3.30 x 10 <sup>3</sup>	96.4 (± 12.2)
105	2.40 x 10 <sup>3</sup>	1.50 x 10 <sup>3</sup>	37.4 (± 10.2)
140	9.20 x 10 <sup>4</sup>	5.40 x 10 <sup>3</sup>	94.1 (± 11.3)

Los SST en el BFC se registraron entre un intervalo de 16.5 a 87.1  $\text{mg l}^{-1}$ , con valores máximos en los muestreos de las 105 hrs y 140 hrs (Fig. 4).

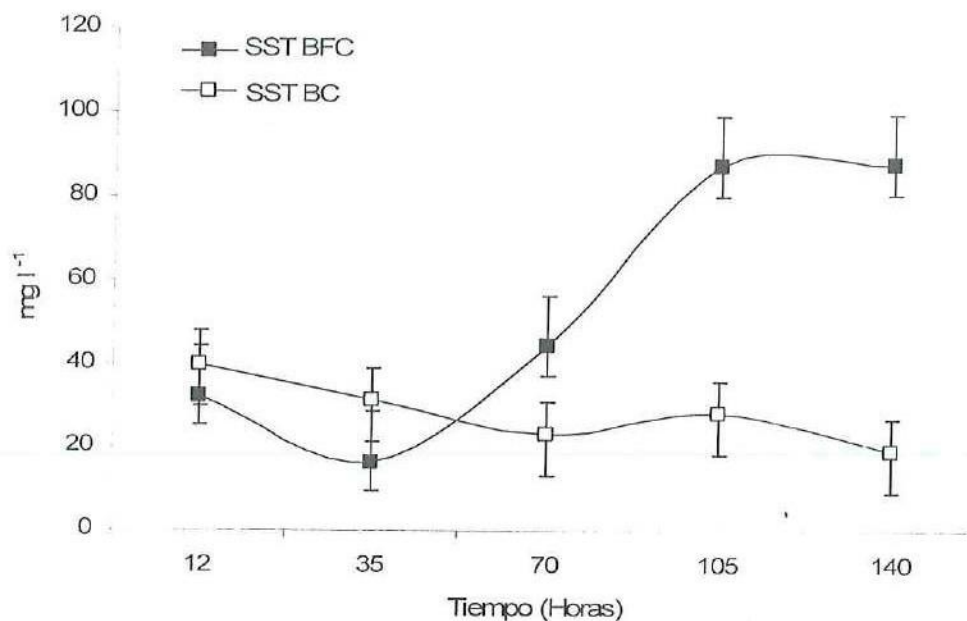


Figura 4. Valor promedio y desviación estándar (líneas horizontales) de los sólidos suspendidos totales (SST) en el tiempo de operación del fotobioreactor en condiciones continuas (BFC) y fotobioreactor control (BC).

El análisis estadístico demostró la existencia de diferencias significativas entre los SST en los BFC en contraste del BC a partir de las muestras tomadas a las 70 hrs (Tabla VII).

Tabla VII. Estadísticos calculados para los contrastes de SST entre los fotobioreactores con flujo continuo (BFC) en relación a los fotobioreactores control (BC).

	$X^2$ Crítica = 5.99				
Hora de muestreo	12	35	70	105	140
$X^2$ Calculada (BFC vs BC)	1.4	5.4	19.9	124.1	246.9

La  $DBO_5$  en el agua tratada en el BFC osciló de 25.77 a 24.51  $mg\ l^{-1}$ . En el efluente de BC el  $DBO_5$  osciló de un 16.5 a 1  $mg\ l^{-1}$  (Fig. 5).

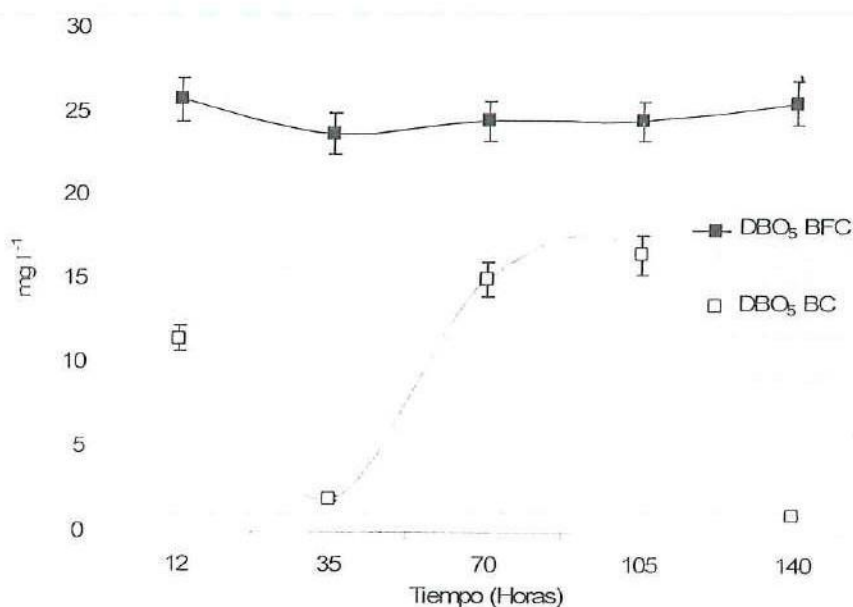


Figura 5. Valor promedio y desviación estándar (líneas horizontales) del  $DBO_5$  registrado en el fotobioreactor continuo con microalgas inmobilizadas (BFC) y fotobioreactor control (BC).

Siempre se evidenciaron diferencias significativas estadísticamente en los valores de  $DBO_5$  registrados en el BFC en comparación al BC (Tabla VIII).

Tabla VIII. Valores estadísticos calculados para los contrastes de  $\text{DBO}_5$  entre los fotobioreactores con flujo continuo (BFC) en relación a los fotobioreactores control (BC).

	$\chi^2$ Crítica = 5.99				
Hora de muestreo	12	35	70	105	140
$\chi^2$ Calculada (BFC vs BC)	17.9	236.1	16.0	13.8	297

En las grasas y aceites (G y A), no se observó ningún efecto de remoción por el BFC en contraste al inóculo de agua residual, registrando valores entre 11 a 24.5  $\text{mg l}^{-1}$  (Fig. 6).

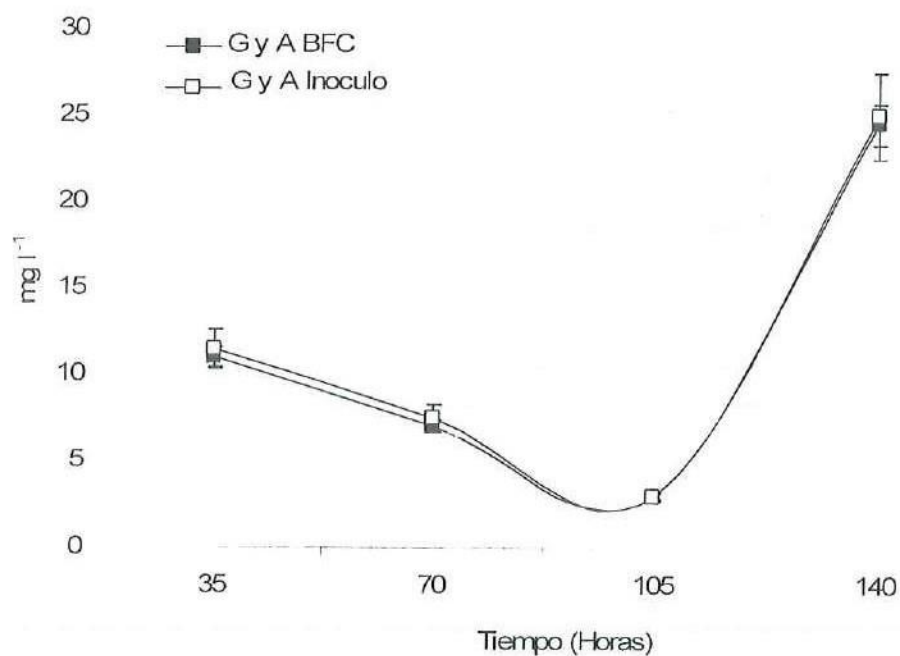


Figura 6. Valor promedio y desviación estándar (líneas horizontales) de las grasas y aceites registradas en el fotobioreactor continuo con microalgas inmobilizadas (BFC) e Inóculo.

El pH tanto en el BFC como en el BC, estadísticamente fueron similares (Fig. 7 y Tabla IX).

Tabla IX. Valores estadísticos calculados para los contrastes de pH entre los fotobioreactores con flujo continuo (BFC) en relación a los fotobioreactores control (BC).

	$X^2$ Crítica = 5.99			
Hora de muestreo	35	70	105	140
$X^2$ Calculada (BFC vs BC)	0.03	0.21	0.133	0.10

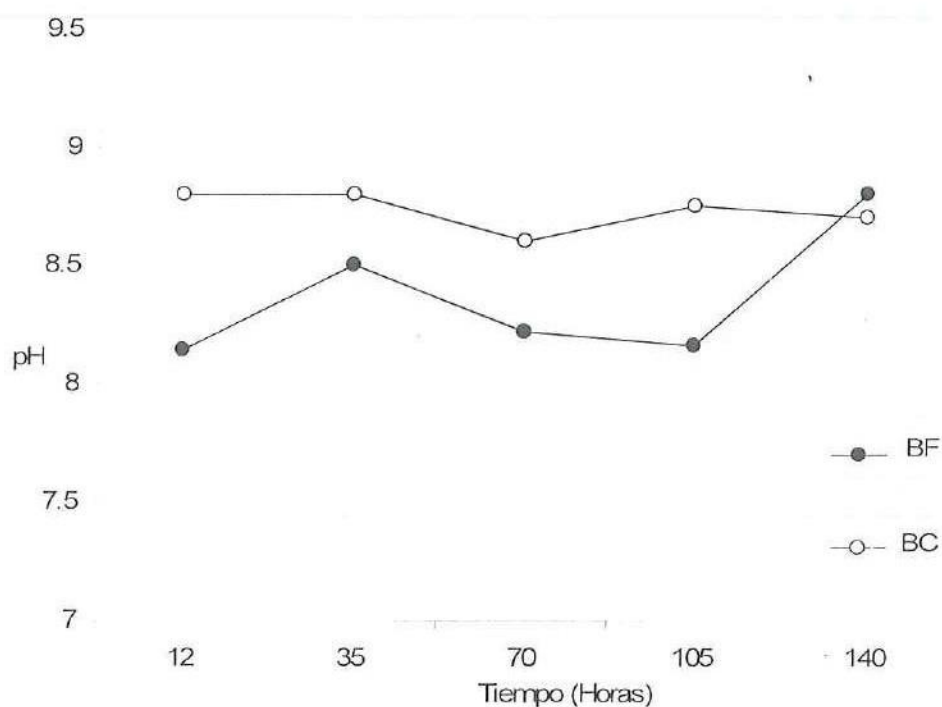


Figura 7. Valor promedio y desviación estándar (líneas horizontales) del pH observado en el fotobioreactor con flujo continuo (BFC) y el fotobioreactor control.

#### 4.2. Fotobioreactor por lote nivel laboratorio.

En cuanto a los fotobioreactores por lote nivel laboratorio (BL), el porcentaje de remoción de  $\text{PO}_4$  total osciló de un 21.2 a 78.59%, con los valores más altos de remoción a cada 35 hrs de tratamiento, oscilando del 57% ( $1.0$  a  $0.4 \text{ mg l}^{-1}$ ) al 78% ( $1.0$  a  $0.22 \text{ mg l}^{-1}$ ) (Fig. 8).

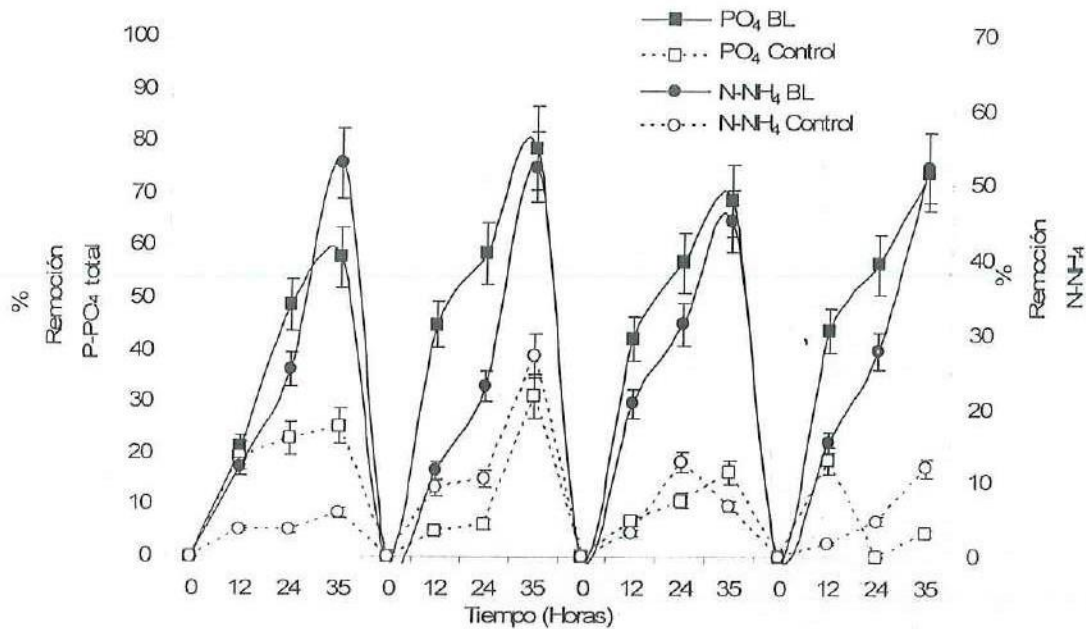


Figura 8. Porcentajes de remoción promedio y desviación estándar (líneas horizontales) de  $\text{N-NH}_4$  y  $\text{PO}_4$  total registrados en el fotobioreactor por lote (BL) y el fotobioreactor control (BC).

El análisis estadístico evidenció que los valores de  $\text{PO}_4$  total observados después de cada 35 hrs del inoculo en el BL, son diferentes en contraste a los valores de los BC (Tabla X).

Tabla X. Valores calculados para los contrastes estadísticos de  $\text{PO}_4$  total entre los fotobioreactores por lote (BL) en relación a los fotobioreactores control (BC).

	$X^2$ Crítica = 5.99			
Hora de muestreo	35	70	105	140
$X^2$ Calculada (BL vs BC)	125.4	79.7	507.0	798.0

Por otro lado, el  $\text{N-NH}_4$  fue removido de un 52.97 a 11.6%. Teniendo los porcentajes más altos cada 35 hrs después del inóculo con agua residual, con remociones que van del 45.2% (29.1 a 15.9  $\text{mg l}^{-1}$ ) al 52.9% (31.4 a 14.7  $\text{mg l}^{-1}$ ) (Fig. 8). La prueba estadística demostró que las concentraciones a cada 35 hrs después del inóculo son significativamente diferentes en relación a los datos observados en el BC (Tabla XI).

Tabla XI. Valores de los contrastes estadísticos de  $\text{N-NH}_4$  entre los fotobioreactores por lote (BL) en relación a los fotobioreactores control (BC).

	$X^2$ Crítica = 5.99			
Hora de muestreo	35	70	105	140
$X^2$ Calculada (BL vs BC)	1103.9	66.0	653.3	409

En lo referente a los niveles de coliformes fecales los BL mostraron remoción en relación a la concentración del inóculo de agua residual (Tabla XII).

Tabla XII. Concentración de coliformes fecales en el inóculo y valores promedio y desviaciones estándar ( $\pm$  D.S.) de la remoción de coliformes fecales después del tratamiento en el fotobioreactor por lote piloto (BLP) a cada 35 hrs.

Coliformes fecales en NMP ml <sup>-1</sup>			
Hora de Muestreo (Horas)	Inóculo de agua residual	BLP	Remoción (%)
35	$9.20 \times 10^4$	$2.20 \times 10^4$	76.0 ( $\pm$ 10.2)
70	$9.20 \times 10^4$	$3.50 \times 10^3$	96.2 ( $\pm$ 12.2)
105	$3.50 \times 10^3$	$2.40 \times 10^3$	31.4 ( $\pm$ 11.4)
140	$9.20 \times 10^4$	$5.40 \times 10^3$	94.1 ( $\pm$ 13.5)

Los SST en el BL se mantuvieron entre los intervalos de 105 y 445 mg l<sup>-1</sup>, mientras que en el BC oscilaron de 44.3 a 104.3 mg l<sup>-1</sup> (Fig. 9). Los análisis estadísticos mostraron que existieron diferencias significativas entre los SST del BL y los SST del BC (Tabla XIII).

Tabla XIII. Contrastes estadísticos de los valores de SST entre los fotobioreactores por lote (BL) en relación a los fotobioreactores control (BC).

Hora de muestreo	X <sup>2</sup> Crítica = 5.99			
	35	70	105	140
X <sup>2</sup> Calculada (BL vs BC)	83.1	9.0	972.3	890.3

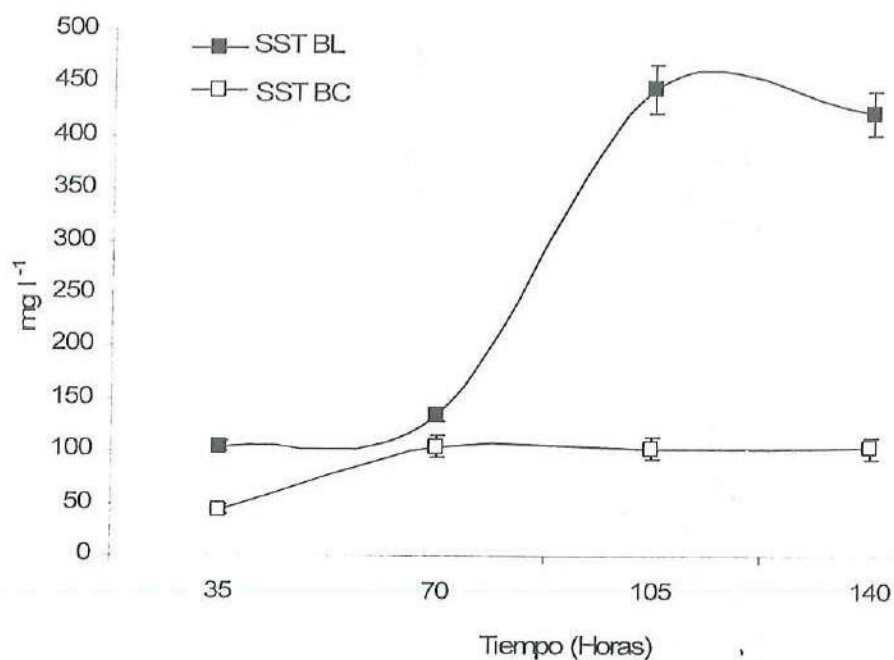


Figura 9. Valor promedio y desviación estándar (en líneas horizontales) de los SST en el fotobioreactor por lote (BL) y fotobioreactor control (BC).

La DBO<sub>5</sub> en el BL presentó valores entre 17.7 y 23.4 mg l<sup>-1</sup>, en cuanto al BC los datos se mantuvieron entre 5 y 9.5 mg l<sup>-1</sup> (Fig.10). Los contrastes estadísticos demostraron la diferencia significativa entre los valores del DBO<sub>5</sub> en el BL en relación al DBO<sub>5</sub> del BC a cada 35 hrs de muestreo (Tabla XIV).

Tabla XIV. Contrastes estadísticos de los valores de DBO<sub>5</sub> entre los fotobioreactores por lote (BL) en relación a los fotobioreactores control (BC).

<b>X<sup>2</sup> Crítica = 5.99</b>				
<b>Hora de muestreo</b>	<b>35</b>	<b>70</b>	<b>105</b>	<b>140</b>
<b>X<sup>2</sup> Calculada (BL vs BC)</b>	7.07	46.5	26.8	46.4

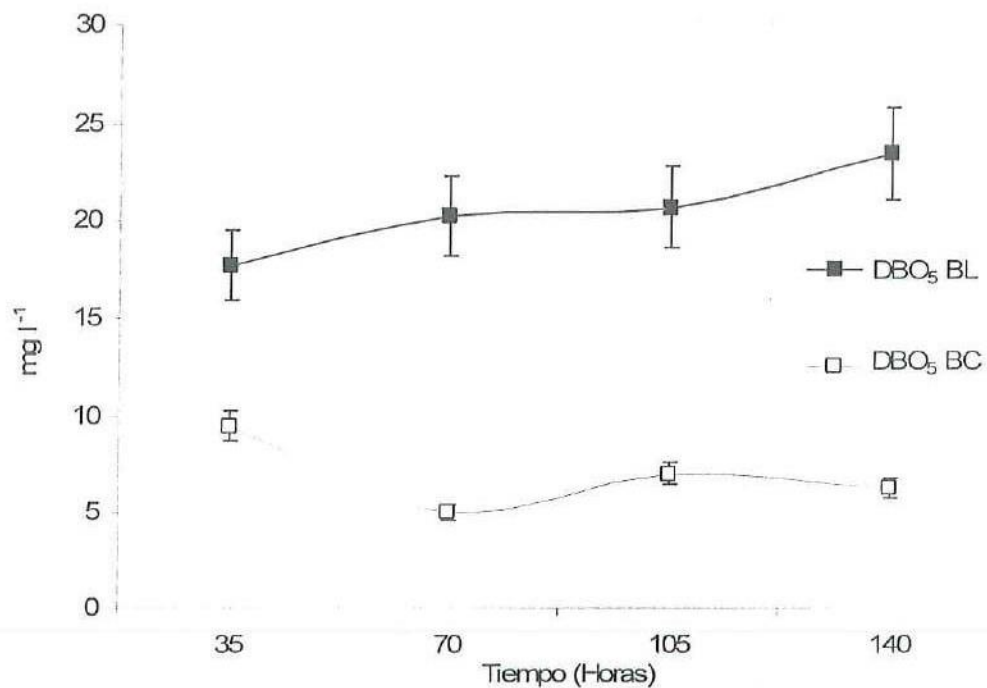


Figura 10. Valor promedio y desviación estándar (en líneas horizontales) del DBO<sub>5</sub> en el fotobioreactor por lote (BL) y fotobioreactor control (BC).

Los valores de grasas y aceites no mostraron remoción en el BL en comparación al inóculo de agua residual, los valores que se encontraron fueron de 20 a 3 mg l<sup>-1</sup> (Fig. 11).

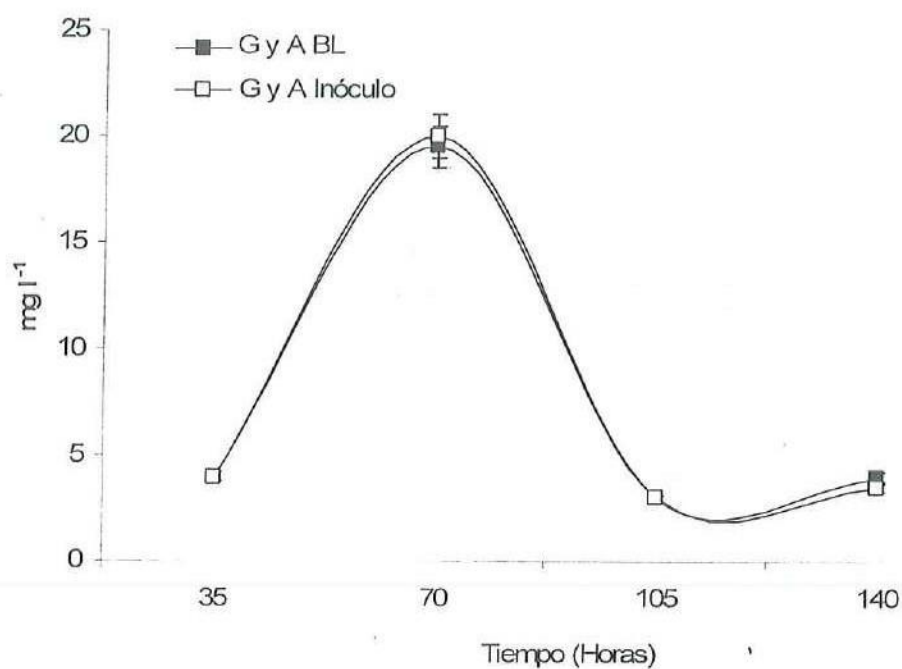


Figura 11. Valor promedio y desviación estándar (líneas horizontales) de las grasas y aceites registradas en el fotobioreactor por lote con microalgas inmobilizadas (BL) e Inóculo.

El pH se mantuvo entre los valores de 7 a 9 tanto en los fotobiorreactores por lote como en el fotobioreactor control (Fig.12).

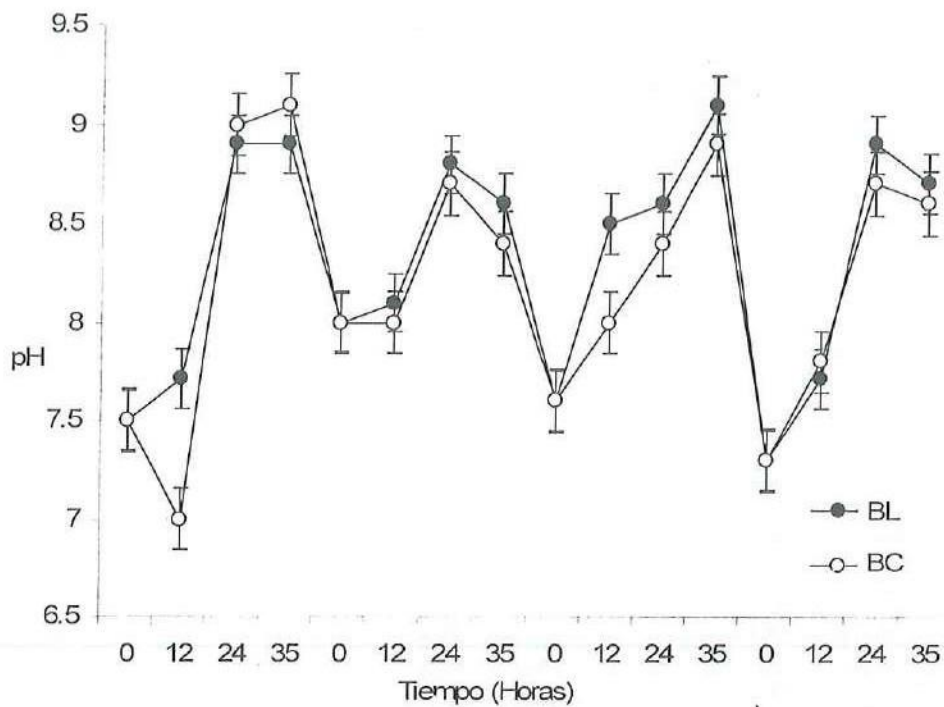


Figura 12. Valor promedio y desviación estándar (líneas horizontales) del pH observado en el fotobioreactor por lote (BL) y fotobioreactor control (BC).

Para los datos de pH contrastados de ambos fotobioreactores (BL vs BC) no se observaron diferencias significativas entre ellas (Tabla XV).

Tabla XV. Contrastes estadísticos de los valores de pH entre los fotobioreactores por lote (BL) en relación a los fotobioreactores control (BC).

$X^2$ Crítica = 5.99				
Hora de muestreo	35	70	105	140
$X^2$ Calculada (BL vs BC)	0.26	0.0	0.29	0.26

Como se observa en las tablas anteriores, el fotobioreactor por lote presentó una remoción mayor en términos de  $\text{PO}_4$  total y  $\text{N-NH}_4$  a cada 35 hrs posteriores al inóculo, en relación al fotobioreactor continuo.

En cuanto a los valores de SST y  $\text{DBO}_5$  el fotobioreactor por lote tuvo concentraciones menores en relación al bioreactor con flujo continuo. Dado lo anterior se eligió el fotobioreactor en lote para su escalamiento a nivel piloto al aire libre, ya que por un lado fue el que presentó una mayor capacidad de remoción de nutrientes y por otra parte el fotobioreactor por lote al tener valores menores de SST y de  $\text{DBO}_5$  a los encontrados en el fotobioreactor con flujo continuo demuestra un menor impacto negativo en el agua tratada.

#### **4.3. Fotobioreactor por lote a nivel piloto.**

Los porcentajes de remoción de  $\text{PO}_4$  total registrados en el fotobioreactor por lote a nivel piloto (BLP) oscilaron entre el 31 y el 76%, presentándose los porcentajes más altos a cada 35 hrs del inóculo de agua residual, con valores de remoción que van del 31.8% (8.1 a 5.5  $\text{mg l}^{-1}$ ) al 76.4% (2.4 a 0.5  $\text{mg l}^{-1}$ ) (Fig. 13).

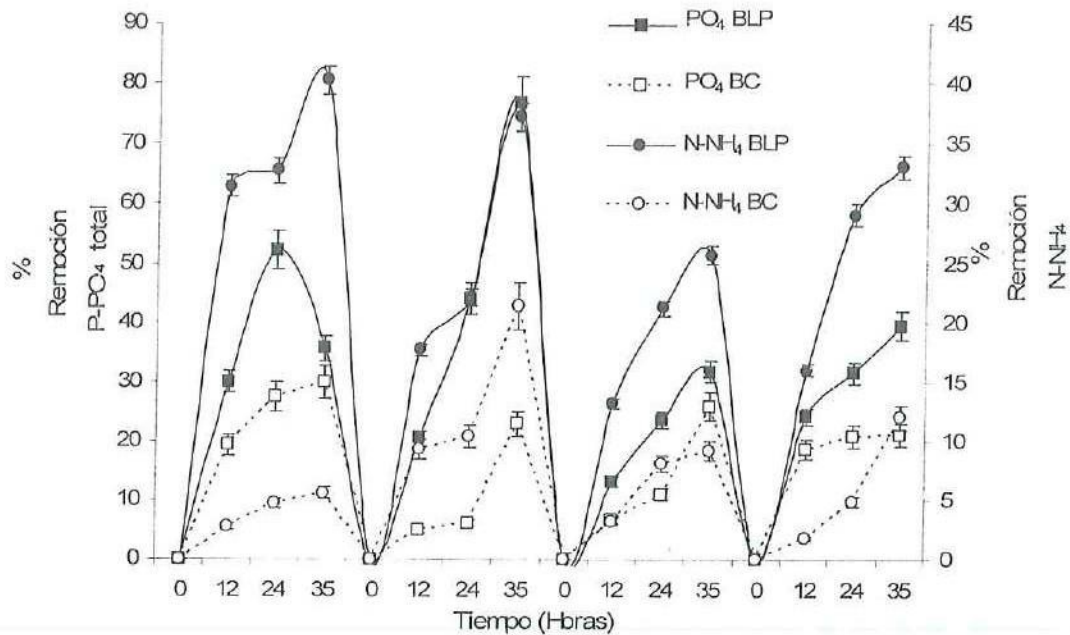


Figura 13. Valores promedios y desviación estándar (líneas horizontales) de los porcentajes de remoción de  $\text{PO}_4$  total y  $\text{N-NH}_4$  presentados en el fotobioreactor por lote a nivel piloto (BLP) y fotobioreactor control (BC).

Al contrastar las concentraciones de  $\text{PO}_4$  total encontradas en el BLP en relación al BC sólo se evidenció la diferencia entre estos tratamientos a las 70 y 140 hrs de uso de las esferas (Tabla XVI).

Tabla XVI. Valores estadísticos resultado del contraste de  $\text{PO}_4$  total en el fotobioreactor por lote piloto (BLP) en relación a las concentraciones observadas en el fotobioreactor control (BC) a cada 35 hrs de muestreo.

$X^2$ Crítica = 5.99				
Hora de muestreo	35	70	105	140
$X^2$ Calculada (BLP vs BC)	3.3	376	4.9	48.2

El  $\text{N-NH}_4$  se removió de un 13.2 a 40.2% en el BLP, presentando máximos niveles de remoción después de cada 35 hrs de tratamiento, con porcentajes que van del 25% (37.1 a 27.6  $\text{mg l}^{-1}$ ) al 40% (47.4 a 28.3  $\text{mg l}^{-1}$ ). Para el BC los porcentajes de remoción fueron de un 1.7 a 27.2% (Fig. 13).

Los valores de  $\text{N-NH}_4$  encontrados después de cada 35 hrs de inóculo en los BLP fueron estadísticamente diferentes en contraste a los obtenidos en el BC a las mismas horas de muestreo (Tabla XVII).

Tabla XVII. Valores estadísticos del contraste de las concentraciones de  $\text{N-NH}_4$  en el fotobioreactor por lote piloto (BLP) a cada 35 hrs del inóculo en relación a las concentraciones observadas en el fotobioreactor control (BC).

	$\chi^2$ Crítica = 5.99			
Hora de muestreo	35	70	105	140
$\chi^2$ Calculada (BLP vs BC)	649.9	34.3	89.5	110.9

Los valores normalizados por hora, por gramo de peso orgánico y por número de células se presentan en la Tabla XVIII.

Tabla XVIII. Valor medio y desviación estándar de las tasas de remoción normalizadas de N-NH<sub>4</sub> y PO<sub>4</sub> total para los fotobioreactores por lote piloto.

Hora de muestreo	mg l <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>		mg g peso orgánico <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>		µg cel x 10 <sup>-6</sup> h <sup>-1</sup>	
	N-NH <sub>4</sub>	PO <sub>4</sub>	N-NH <sub>4</sub>	PO <sub>4</sub>	N-NH <sub>4</sub>	PO <sub>4</sub>
35	13.09	0.8	23.6	1.5	0.10	0.60
70	9.6	1.3	11.5	1.5	0.80	0.10
105	6.5	1.7	3.3	0.9	0.69	0.20
140	7.5	1.3	5.0	0.8	0.79	0.10

Los valores de coliformes fecales se muestran en la Tabla XIX, así como los valores de remoción de cada ciclo.

Tabla XIX. Concentración de coliformes fecales en el inóculo y valor medio y desviación estándar ( $\pm$  D.S.) de la remoción de coliformes fecales después del tratamiento en el fotobioreactor por lote piloto (BLP).

Coliformes fecales en NMP ml <sup>-1</sup>			
Hora de Muestreo (Horas)	Inóculo de agua residual	BLP	Remoción (%)
35	1.70 x 10 <sup>4</sup>	7.00 x 10 <sup>3</sup>	58.8 ( $\pm$ 12.2)
70	1.30 x 10 <sup>3</sup>	4.90 x 10 <sup>2</sup>	62.3 ( $\pm$ 11.2)
105	2.40 x 10 <sup>3</sup>	5.60 x 10 <sup>2</sup>	76.6 ( $\pm$ 10.1)
140	2.40 x 10 <sup>3</sup>	2.30 x 10 <sup>2</sup>	90.4 ( $\pm$ 13.3)

Los SST se presentaron con valores que van de 0 a 785.7 (Fig. 14), teniendo la mayor cifra registrada a las 140 hrs en el BLP. Los datos observados en el BLP resultaron estadísticamente diferentes comparados con los del BC (Tabla XX).

Tabla XX. Contrastes estadísticos de los valores de SST entre los fotobioreactores por lote piloto (BLP) en relación a los fotobioreactores control (BC).

	$X^2$ Crítica = 5.99			
Hora de muestreo	35	70	105	140
$X^2$ Calculada (BLP vs BC)	10.7	140	17.8	3733

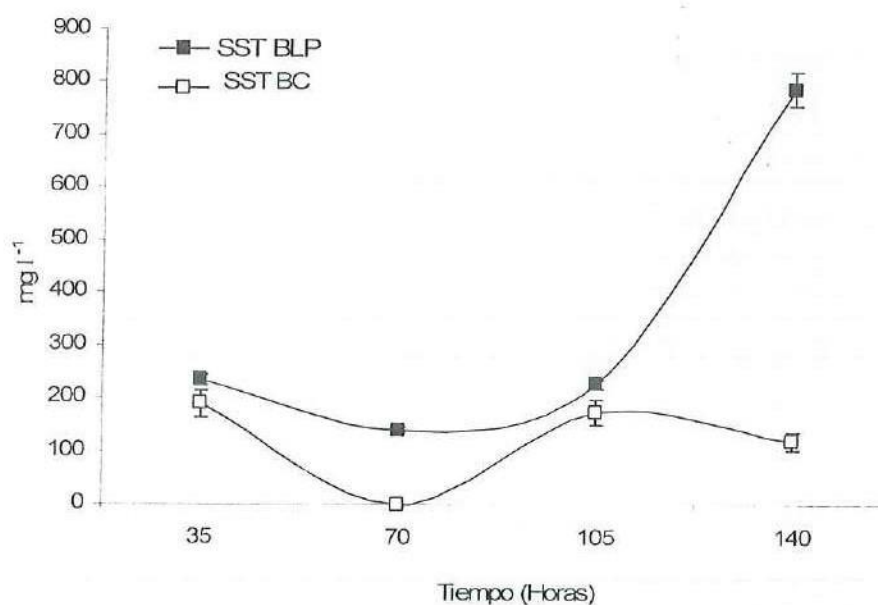


Figura 14. Valor promedio y desviación estándar (líneas horizontales) de los SST presentados en el fotobioreactor por lote a nivel piloto (BLP) y fotobioreactor control (BC).

La  $\text{DBO}_5$  en el BLP tuvo concentraciones de 11.49 a 25.38  $\text{mg l}^{-1}$  (Fig. 15). El análisis estadístico mostró que sólo los datos tomados a las 35 hrs no son diferentes a los valores del BC (Tabla XVI).

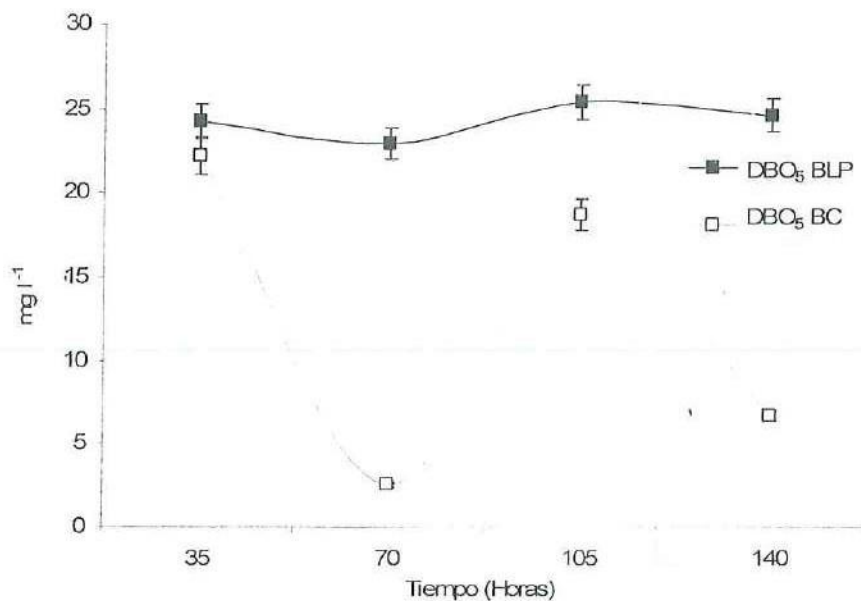


Figura 15. Valor promedio y desviación estándar (líneas horizontales) del  $\text{DBO}_5$  presentado en el fotobiorreactor por lote a nivel piloto (BLP) y fotobiorreactor control (BC).

Tabla XXI. Estadísticos calculados de los contrastes de  $\text{DBO}_5$  entre los fotobiorreactores por lote piloto (BLP) en relación a los fotobiorreactores control (BC).

	$\chi^2$ Crítica = 5.99			
Hora de muestreo	35	70	105	140
$\chi^2$ Calculada (BLP vs BC)	0.2	164.8	12.1	48.0

En los BLP no se presentó remoción de las grasas y aceites. Los datos de grasas y aceites oscilaron entre los intervalos de 18 a 0  $\text{mg l}^{-1}$  en el inóculo de agua residual (Fig. 16)

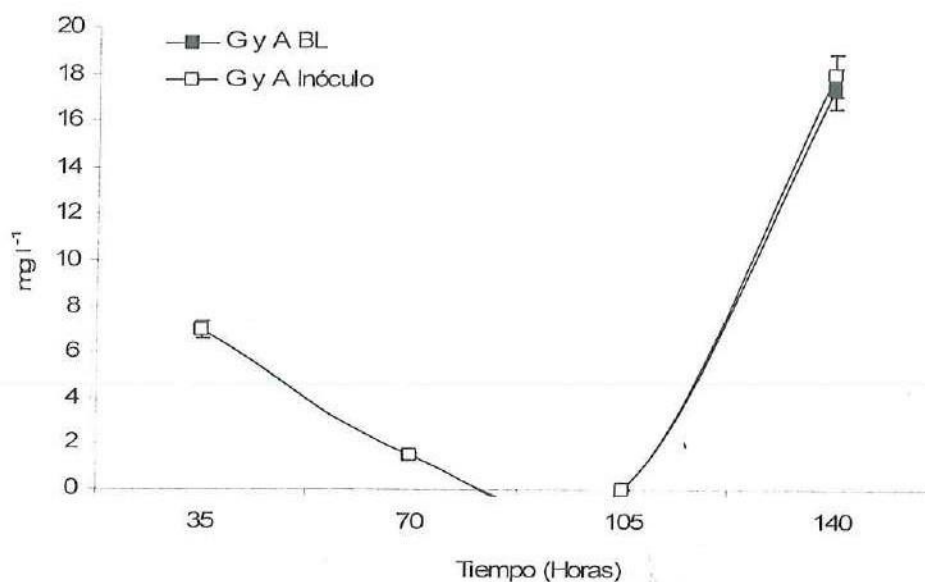


Figura 16. Valor promedio y desviación estándar (líneas horizontales) de las grasas y aceites registradas en el fotobioreactor por lote nivel piloto con microalgas inmovilizadas (BL) e Inóculo.

El pH que se observó en el BLP osciló entre 7.3 y 9 (Fig. 17). Los valores de pH encontrados en el BLP y BC no fueron estadísticamente diferentes como se muestra en la Tabla XVII.

Tabla XXII. Valores estadísticos de pH entre los fotobioreactores por lote piloto (BLP) en relación a los fotobioreactores control (BC).

	$X^2$ Crítica = 5.99			
Hora de muestreo	35	70	105	140
$X^2$ Calculada (BLP vs BC)	0.3	0.0	0.2	0.2

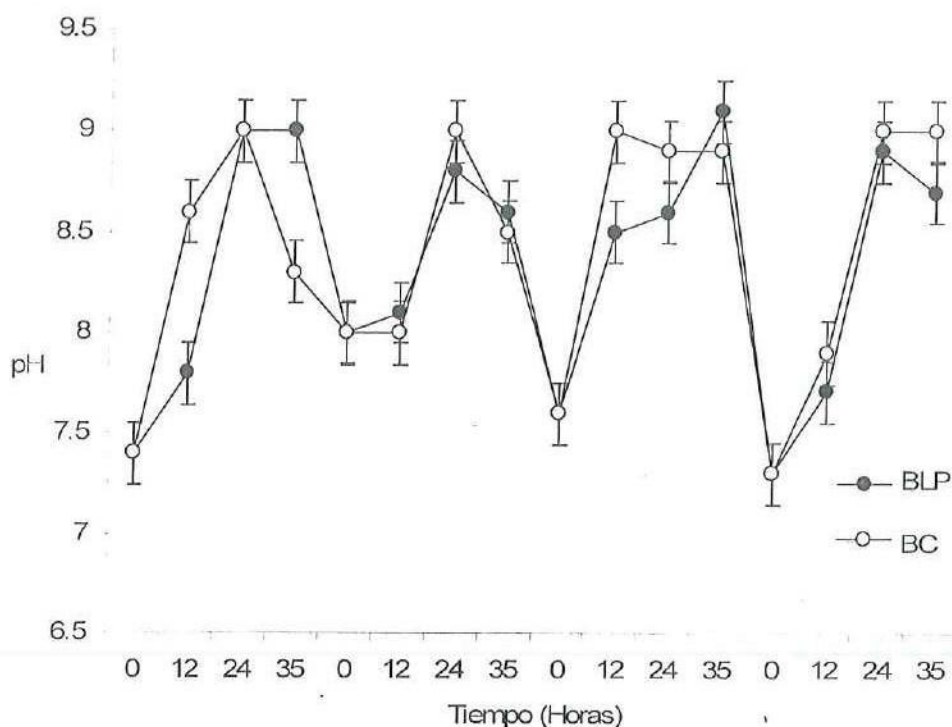


Figura 17. Valor promedio y desviación estándar (líneas horizontales) del pH observado en el fotobioreactor por lote a nivel piloto (BLP) y fotobioreactor control (BC).

#### 4.3.1. Crecimiento y análisis proximal de microalgas en los fotobioreactores por lote a nivel piloto.

El peso seco orgánico de las microalgas en los fotobioreactores por lote a nivel piloto se mantuvieron entre el intervalo  $7.5-92.7 \text{ mg ml}^{-1}$  (Fig. 18), presentándose los valores más altos en las muestras tomadas a las 105 hrs ( $70.1-92.7 \text{ mg ml}^{-1}$ ).

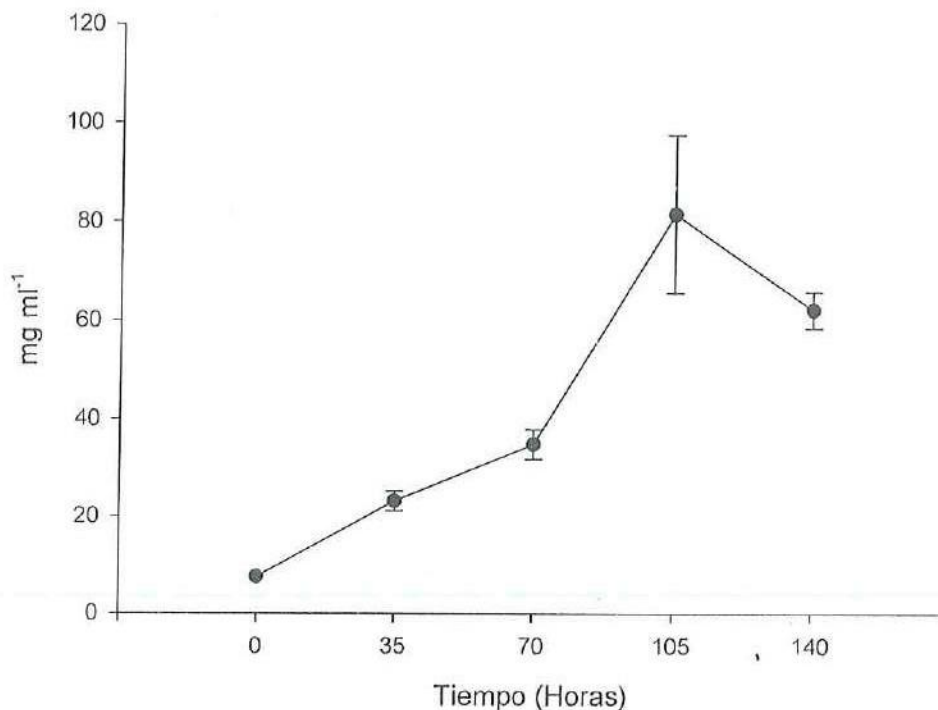


Figura 18. Valor promedio y desviación estándar (líneas horizontales) del peso orgánico registrado en las microalgas inmovilizadas en el fotobioreactor por lote a nivel piloto (BLP).

La prueba estadística para contrastar las muestras de cada 35 hrs con las tomadas 35 hrs antes señaló que todas las muestras de peso orgánico fueron diferentes (Tabla XXIII).

Tabla XXIII. Valores estadísticos de peso orgánico entre las muestras tomadas cada 35 hrs en el fotobioreactor por lote piloto (BLP).

	$X^2$ Crítica = 5.99			
Hora de muestreo	35	70	105	140
$X^2$ Calculada (BLP)	98.5	300.0	1724.8	1193.8

El crecimiento celular en las esferas mantenidas en el bioreactor por lote piloto se mantuvo entre los valores de 3.93 a 5.77 células  $\times 10^6$  esfera $^{-1}$ , presentando las densidades más altas en la muestra tomada a las primeras 35 hrs y las más bajas a las 140 hrs de uso de las microalgas inmovilizadas (Fig. 19).

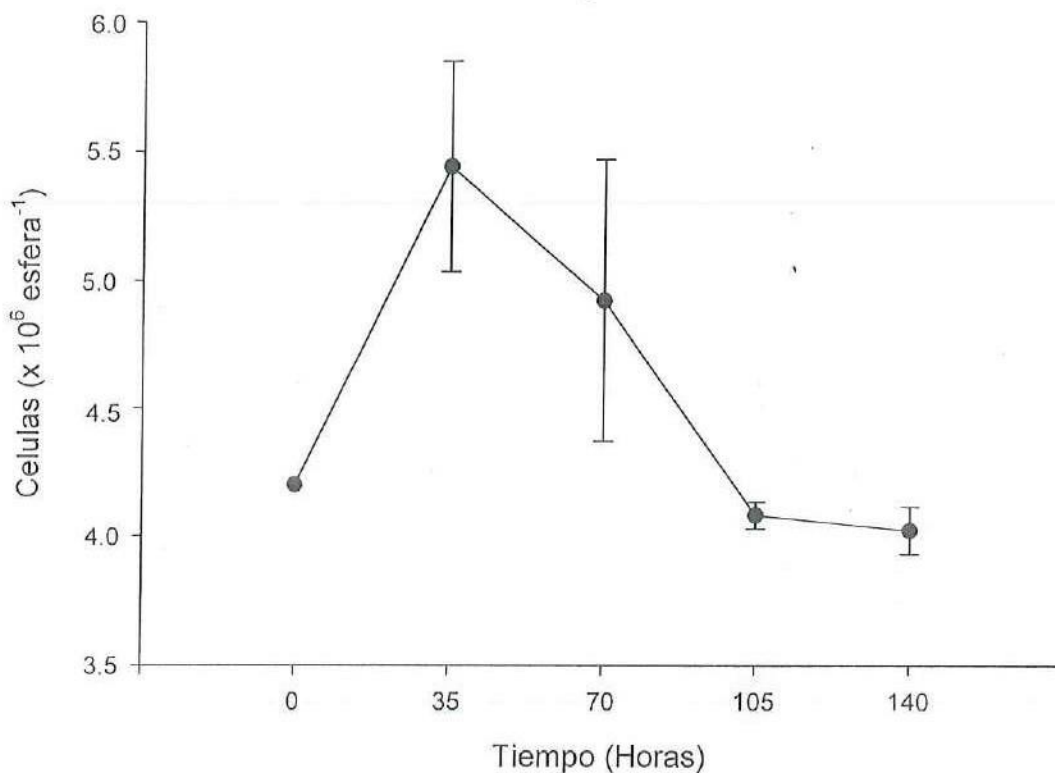


Figura 19. Valor promedio y desviación estándar (líneas horizontales) del número de células en las esferas del fotobioreactor por lote a nivel piloto (BLP).

Al registrar el tamaño celular en las esferas inmovilizadas en el BLP, se observó que no fueron diferentes al contrastar las muestras entre sí, con una  $X^2$  Crítica = 5.99 (Tabla XXIV).

Tabla XXIV. Valor medio y desviación estándar ( $\pm$  D.S.) del tamaño de las microalgas en promedio en el fotobioreactor por lote piloto (BLP) registrado cada 35 hrs de uso de las microalgas inmovilizadas.

Hora de muestreo (Horas)	0	35	70	105	140
Tamaño célula en promedio ( $\mu\text{m}$ )	$4.5 \pm 1.2$	$4.5 \pm 1.3$	$4.7 \pm 1.5$	$5.1 \pm 1.5$	$5.4 \pm 1.6$
$\chi^2$ Calculada (BLP)	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1

El contenido de clorofila a se observó de  $0.5 \text{ pg cel}^{-1}$  en el inóculo, hasta  $2.2 \text{ pg cel}^{-1}$  a las 105 hrs de tratamiento (Fig. 20).

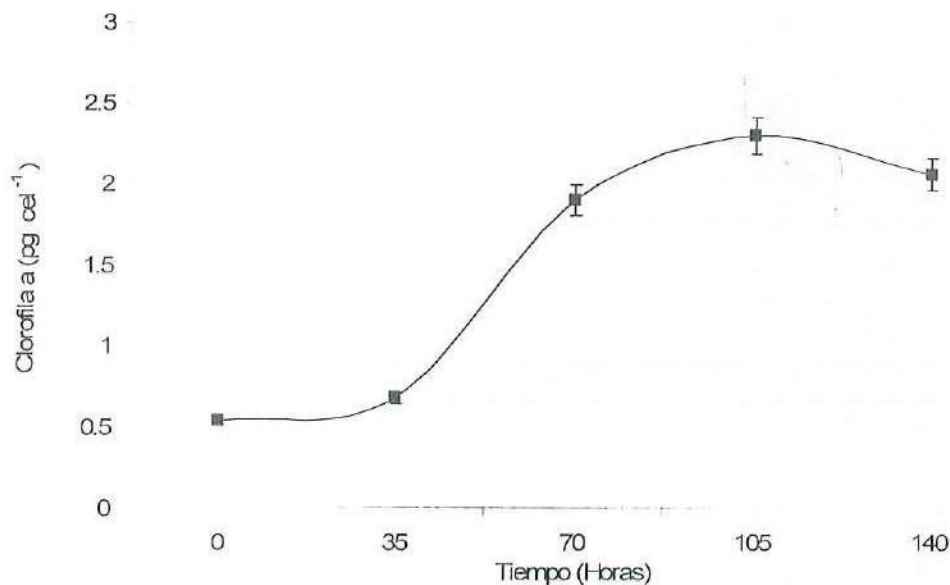


Figura 20. Valor promedio y desviación estándar (líneas horizontales) de la Clorofila a registrada en el fotobioreactor a nivel piloto (BLP).

En lo que se refiere a los análisis proximales, los porcentajes de lípidos en las microalgas oscilaron entre 5 y 21%, registrando los valores más altos a las 140 hrs y observándose el menor al inicio de los ciclos de remoción (Fig. 21).

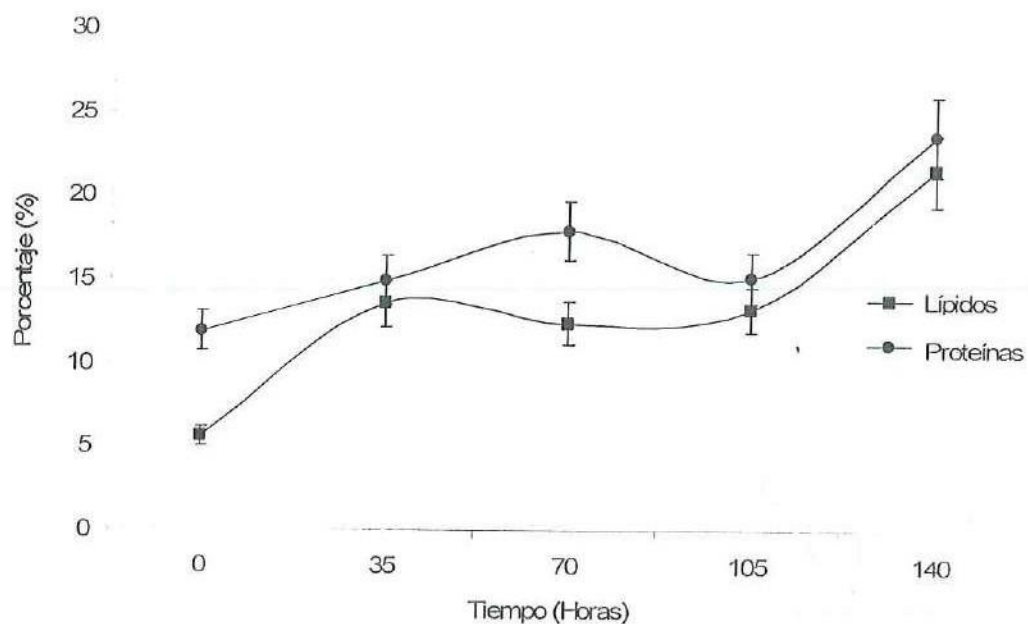


Figura 21. Valor medio y desviación estándar (líneas horizontales) de los análisis bioquímicos proximales realizados en las microalgas inmovilizadas en el fotobioreactor por lote piloto (BLP).

Los análisis estadísticos sólo mostraron diferencias entre los lípidos encontrados a las 35 hrs en comparación a la cantidad de lípidos al iniciar el proceso de remoción, y en los datos presentes al final del proceso en comparación a los iniciales. Al contrastar los datos de cada 35 hrs con los tomados a las 35 hrs previas no se observaron diferencias (Tabla XXV)

Tabla XXV. Valores estadísticos de lípidos entre las muestras a diferentes horas en el fotobioreactor por lote piloto (BLP).

	$X^2$ Crítica = 5.99				
Hora de muestreo	35	70	105	140	35 vs. 140
$X^2$ Calculada (BLP)	11.3	0.0	0.0	5.1	45.5

Los porcentajes de proteínas oscilaron entre 11 y 23%, obteniéndose los valores más altos a las 140 hrs del inicio del tratamiento; por su parte, el valor más bajo se obtuvo al inicio del tratamiento (Fig. 21). Como se muestra en la Tabla XXVI, sólo a las primeras 35 hrs se evidenció una diferencia en los porcentajes de proteínas en relación al dato anterior (0 h). Otro valor diferente se presentó al contrastar los datos registrados a las 35 hrs con los observados a las 40 hrs.

Tabla XXVI. Valores estadísticos de proteínas entre las muestras a diferentes horas en el fotobioreactor por lote piloto (BLP).

	$X^2$ Crítica = 5.99				
Hora de muestreo	35	70	105	140	35 vs. 140
$X^2$ Calculada (BLP)	7.07	0.59	0.44	4.7	11.3

#### **4.4 Fotobioreactor por lote a nivel piloto en relación a los sistemas convencionales de tratamiento.**

Los parámetros de los efluentes de los sistemas convencionales de tratamiento terciario de aguas residuales y la calidad del efluente del BLP se presentan en la Tabla XXVII.

Los sistemas de tratamiento presentes en la siguiente tabla, se enfocan en la remoción de algún contaminante en particular y, al implementar la adición de un proceso, la calidad del efluente es mejor.

Tabla XXVII. Niveles de tratamiento alcanzados con diferentes combinaciones sistemas para el tratamiento de aguas residuales (modificada a partir de Metcalf & Eddy Inc, (2003)).

Proceso de Tratamiento	Calidad típica del efluente (mg l <sup>-1</sup> )			
	SST	BOD <sub>5</sub>	NH <sub>4</sub> -N	PO <sub>4</sub>
Lodos activados + filtración granular	4-6	<5-10	15-25	4-10
Lodos activados + filtración granular + adsorción de carbón	<5	<5	15-25	4-10
Lodos activados/nitrificación	10-25	5-15	1-5	6-10
Lodos activados/nitrificación-desnitrificación	10-25	5-15	1-2	6-10
Adición de sales a los lodos activados + nitrificación/desnitrificación + filtración	≤5-10	≤5-10	1-2	≤1
Remoción biológica de fósforo	10-20	5-15	5-10	≤2
Remoción biológica de nitrógeno y fósforo + filtración	≤10	<5	≤2	≤2
Lodos activados + filtración granular + adsorción de carbón + osmosis reversa	≤1	≤1	<2	≤1
Lodos activados/nitrificación-desnitrificación y remoción de fósforo + filtración granular + adsorción de carbón + osmosis reversa	≤1	≤1	≤0.1	≤0.5
Lodos activados/nitrificación-desnitrificación y remoción de fósforo + microfiltración + osmosis reversa	≤1	≤1	≤0.1	≤0.5
*Fotobioreactor por lote piloto	233-785	22.2-25.3	22.4-28.8	0.5-5.5

\* Proceso de tratamiento del presente estudio.

## 5. Discusión.

### 5.1. Remoción de fósforo total y nitrógeno amoniacal en los fotobioreactores por lote y continuo a nivel laboratorio.

El contenido de  $N-NH_4$  en los sistemas de tratamiento con microalgas está determinado por la incorporación y asimilación de las microalgas, la pérdida en forma de nitrógeno amoniacal no ionizado a la atmósfera y por la descomposición de la urea a  $N-NH_4$  por las bacterias ureasa positivas existentes en el agua (Lau *et al.*, 1995). La principal causa de remoción de P-total en los sistemas de tratamiento con microalgas es el pH alto, que propicia su precipitación (Voltolina *et al.*, 1999). En el caso de los fotobioreactores a nivel laboratorio el pH no fue mayor a 9, por lo que el proceso descrito anteriormente tal vez no es tan relevante, pero si tomamos en cuenta la presencia de los iones de calcio en la matriz de alginato de sodio, una parte importante de la eliminación de P se pudo deber a la precipitación de este nutriente en fosfato de calcio, como lo sugiere Tam y Wong, (2000), así como a la adsorción del P en la superficie de la matriz (Martínez *et al.*, 2000).

Las remociones de nutrientes reportadas en los sistemas por lote y continuos contrastados a nivel laboratorio, tanto en el porcentaje mínimo como en el porcentaje máximo, fueron más altos en el fotobioreactor por lote que en el fotobioreactor continuo. Un factor que puede explicar la mayor remoción del fotobioreactor por lote, son las posibles diferencias en el crecimiento de microalgas en las esferas, ya que según De Bashan *et al.*, (2002b) en condiciones de cultivo por lote y semicontinuos se evidencia un mayor número de

células por esfera en relación al número de células por esfera en condiciones con flujo continuo, debido a que el reemplazo del agua en los tratamientos continuos fue aparentemente muy rápido para que las microalgas inmovilizadas asimilaran nutrientes con mayor eficiencia.

Este aumento en la biomasa microalgal tiene un efecto directo sobre la remoción de nutrientes. Como reporta Lodi *et al.*, (2003) la asimilación biológica tiene lugar preferentemente durante el crecimiento de biomasa. Otra razón que justifica estas diferencias es la carga de nutrientes, ya que debido a la variabilidad del agua residual, no fue posible mantener concentraciones homogéneas de nutrientes en cada ciclo. Esto afectó la capacidad de remoción de las microalgas ya que, al no tener condiciones constantes de nutrientes, estas se encontraron con cambios, presentándose regímenes de escasez o sobrecarga de nutrientes, provocando en el primer caso un rápido consumo de nutrientes del agua y en el segundo caso una saturación, principalmente de fósforo, limitando su asimilación (Hernández *et al.*, 2006)

Sin embargo, para ambos nutrientes los niveles de remoción fueron mayores a los obtenidos por Travieso *et al.*, (1996), que reporta del 60 y 69% de remoción de ortofosfato y nitrógeno amoniacal respectivamente y en el caso de *Chlorella vulgaris*, mientras que *Chlorella kessleri* registró remociones del 56 y 34% de ortofosfato y nitrógeno amoniacal respectivamente.

Voltolina *et al.*, (2005) encontraron una remoción de nutrientes entre el 60 y 63%. Los porcentajes de remoción reportados en este documento también fueron mayores, esto posiblemente a que se utilizó agua residual real, con lo que

se incluyó a la biota microbiana nativa que tiene un efecto en la reducción de nutrientes (Lau *et al.*, 1995; Jiménez-Pérez *et al.*, 2004), como se evidencia en los fotobioreactores control.

Tam y Wong, (2000) reportaron en un estudio con la microalga *Chlorella vulgaris* inmovilizada en alginato con una densidad de esferas de 3.9 esferas  $\text{ml}^{-1}$  de agua, la eliminación de alrededor 76.2% de  $\text{N-NH}_4$  y 86.7% de  $\text{PO}_4$  en 24 hrs. Martínez *et al.*, (2000) documentaron remociones de alrededor de 40% en  $\text{N-NH}_4$  y P de aproximadamente 50%. Voltolina *et al.*, (1999) encontraron porcentajes de eliminación de  $\text{N-NH}_4$  de 73.5 a 79% y de  $\text{PO}_4$  de 59 a 56.1%. Siendo similar a lo presentado en este trabajo.

Cabe recordar que las remociones específicas de los estudios dependen de las características del agua residual usada, la especie de microalga, las condiciones de cultivo y, la más importante, la relación entre la cantidad de la biomasa y la carga hidráulica y de contaminantes del agua residual (Shi *et al.*, 2007).

Con los resultados obtenidos se puede evidenciar que el uso microalgas inmovilizadas con alginato de sodio, por una parte ayuda a la mayor remoción de P-total debido a la asimilación por parte de las microalgas además por adsorción como ya se describió anteriormente. También se demostró que es viable su implementación en sistemas por lote a nivel piloto de 50 litros en el exterior, presentando remociones de P-total del 76% y de  $\text{N-NH}_4$  del 52%.

## **5.2. Comparación entre el fotobioreactor por lote a nivel piloto en relación a los sistemas convencionales de tratamiento.**

Como se observa, al comparar los valores del fotobioreactor por lote presentado en este estudio con los datos de los demás sistemas de tratamiento, el fotobioreactor tiene valores más altos de los parámetros de calidad de agua analizados en este trabajo. Sin embargo, los valores de nitrógeno amoniacal y fosfato del fotobioreactor por lote a nivel piloto sólo son comparables con los primeros cuatro procesos enlistados en la Tabla XXVII, que son:

- Lodos activados con filtración granular.
- Lodos activados con filtración granular y adsorción de carbón.
- Lodos activados con nitrificación.
- Lodos activados con nitrificación-desnitrificación.

## **5.3. Remoción de fósforo total y nitrógeno amoniacal en el fotobioreactor piloto al aire libre.**

Los porcentajes de remoción en los fotobioreactores a nivel piloto se comportaron de manera similar a los de nivel laboratorio, ya que durante el experimento el periodo de luz:oscuridad fue muy similar, de entre 12.5 hrs a 13 hrs de luz por 11.5 a 11 hrs de oscuridad. Las incidencias máximas de irradiancia que se registraron oscilaron de entre 415 a 417  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  en las horas de exposición directa a la luz. La exposición a la alta irradiancia en el exterior,

podieron haber provocado una fotoinhibición, ya que las microalgas antes de inmovilizarse se cultivaron con un flujo de fotones menor ( $135 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).

Sin embargo, las remociones similares presentadas en los fotobioreactores a nivel laboratorio y piloto, dan evidencias para suponer que la especie *Scenedesmus obliquus* fue tolerante a las condiciones ambientales a las que se expuso. El mantener a las microalgas en una matriz les puede conferir cierta estabilidad y constancia en las condiciones microambientales dentro de la esfera.

Los procesos antes descritos de remoción de fósforo total y de nitrógeno amoniacal para los fotobioreactores a nivel laboratorio, son fenómenos que se presentan también en los fotobioreactores a nivel piloto, dadas las características idénticas en la preparación de la inmovilización de las microalgas en la matriz de alginato, así como en el uso del agua residual del mismo efluente.

#### **5.4. Sólidos suspendidos totales y DBO<sub>5</sub>.**

Los resultados de SST y DBO<sub>5</sub> mostraron un aumento progresivo en los fotobioreactores a nivel laboratorio y piloto. Este incremento paralelo y gradual de los SST y de Demanda Bioquímica de Oxígeno lo reportó Travieso *et al.*, (1996), y lo atribuye a la desestabilización de la matriz de alginato; por las razones que van a ser expuestas mas adelante, lo que a su vez permite la liberación progresiva de microalgas (Lau *et al.*, 1998).

Lo antes descrito se ve incrementado a través de tiempo, ya que se sobrepasa la máxima capacidad de retención de las esferas, por el incremento de densidad celular en la matriz. Tal evento provoca un aumento en los valores de

DBO<sub>5</sub>, ya que al irse degradando la matriz, se presenta la liberación de microalgas al medio, con lo que se va liberando materia orgánica al medio.

### 5.5. Cambios del pH.

Una de las principales características de los cultivos de microalgas es el incremento de pH inducido por la actividad fotosintética (Becker, 1994; Voltolina *et al.*, 1999; Nuñez *et al.*, 2001).

El pH se mantuvo dentro de un rango estrecho (7.0 a 9.5), siendo similar a lo reportado por Travieso *et al.*, (1992). El pH se mantuvo preferentemente en condiciones alcalinas debido a la presencia de Ca<sup>+</sup> en la matriz de alginato, así como la precipitación del fosfato en fosfato de calcio (Tam y Wong, 2000). Sin embargo, la principal variable que controló las condiciones de pH fue el régimen de luz:oscuridad. Al parecer la frecuencia con la que las microalgas fueron expuestas a la luz no fue suficiente para poder alcanzar una tasa fotosintética más alta, por lo que no se presentó un aumento en el pH porque en el proceso fotosintético se utilizan los iones bicarbonato, el cual provee de CO<sub>2</sub> a las microalgas, lo que ocasiona un aumento del pH pues predominaría el OH<sup>-</sup> en el agua (Martínez *et al.*, 2000). Varios autores han mencionado que el aumento en el pH es causado por la actividad fotosintética, originada por la disponibilidad e intensidad de luz (Chevalier y De La Noüe, 1985a; Chevalier *et al.*, 2000; Nuñez *et al.*, 2001; Voltolina *et al.*, 2005).

### 5.6. Remoción de coliformes fecales.

La remoción observada tanto en los fotobioreactores en el laboratorio, como al aire libre, no fue como se esperaba; ya que en un estudio efectuado por Sebastian y Nair, (1984) reportaron la total eliminación de *E. coli* en cultivos masivos de *Scenedesmus obliquus*, debido al alto pH encontrado en los estanques; pero en nuestro caso la remoción de coliformes fecales en los fotobioreactores a nivel laboratorio y piloto al aire libre fue baja, debido a que los valores de pH en nuestros fotobioreactores oscilaron de un 7 a 9, no siendo lo suficientemente alto para provocar una disrupción en la membrana del citoplasma. De acuerdo con Mendoca *et al.*, (1994) este fenómeno tiene su máxima presencia a un pH 12.

La remoción de coliformes fecales que se observó no logra ser del 100%, pero al disminuir la concentración de estos microorganismos se tiene la ventaja que se utilizaría menos desinfectante para poder alcanzar altos niveles de desinfección.

Por otro lado en parte se le puede atribuir la remoción de *E. coli* a las propiedades del agua tratada, pues aunque existan los nutrientes potencialmente necesarios para el crecimiento de *E.coli*, la temperatura, la irradiancia, los protozoarios y bacteriófagos presentes pueden inhibir el crecimiento de estos microorganismos (Durán *et al.*, 2002; Ravva y Korn, 2007).

### 5.7. Crecimiento microalgal.

El crecimiento en las células inmobilizadas depende generalmente de varios factores, como la permeabilidad de la matriz, el contenido nutricional del medio, la posibilidad de encontrar los requerimientos de luz y el espesor de la matriz (Kaya y Picard, 1996).

Al contrastar las figuras de biomasa orgánica y de número células por esfera, se observa que se va incrementando a través del tiempo el peso de la biomasa microalgal, con un punto máximo a las 105 hrs; pero el número de células por esfera es máximo a las 35 hrs del inóculo, para después presentar una disminución gradual. El aumento en peso de la biomasa microalgal se puede explicar con el crecimiento en tamaño celular y de la degradación de la matriz.

Al inicio, cuando las microalgas se encuentran inmobilizadas en una matriz donde presumiblemente se encuentran bien distribuidas (Lau *et al.*, 1997), las células crecen sin limitaciones ya sea de luz o de nutrientes, presentando valores de 0.6 pg de Chl a por célula a las primeras 35 hrs; similar a lo encontrado por Kaya *et al.*, (1995). De manera similar, en el presente trabajo a las 35 hrs las células alcanzan una densidad de alrededor de  $5.5 \times 10^6$  células esfera<sup>-1</sup>, el máximo observado en este estudio aunque, debido a su tamaño (4.5  $\mu\text{m}$ ), no registran alto peso orgánico (23.1 mg ml<sup>-1</sup>).

El aumento en biomasa alcanza un valor máximo de 92.7 mg ml<sup>-1</sup> a las 105 hrs, lo que no se refleja en el número de células por esfera, que a partir de las 35 hrs va decreciendo hasta  $4 \times 10^6$  células esfera<sup>-1</sup>, sugiriendo que se ve sobrepasada la capacidad de retención máxima de las esferas y las microalgas

van siendo liberadas al medio. El progresivo decaimiento en la biomasa orgánica se ve acelerado por la degradación de la matriz, por los factores antes expuestos, no permitiendo mantener un sustrato estable para el crecimiento celular, propiciando la expulsión de microalgas al agua; lo que finalmente aumenta los valores de SST y de DBO<sub>5</sub> de manera progresiva y paralela. El incremento en el peso orgánico es atribuible a la agrupación característica que presenta la especie (Richmond, 1986; Soeder y Hegewald, 1988; Becker, 1994) y al incremento en el tamaño de la célula.

#### **5.8. Composición proximal de las microalgas inmovilizadas.**

Además de los cambios en el pH que promueven las microalgas a través de la actividad fotosintética, el atractivo de utilizar estos organismos es la absorción de los nutrientes disueltos en el agua en compuestos orgánicos (Chevalier y de la Noüe, 1985b; Voltolina *et al.*, 2005). Al parecer no existe una relación directa entre el consumo de nutrientes y el contenido de constituyentes bioquímicos de las microalgas, ya que la velocidad de asimilación de nutrientes es mayor a la velocidad de síntesis de los componentes bioquímicos, por lo que el consumo de nitrógeno y fósforo no denota necesariamente necesidades metabólicas de las microalgas, sino que se guardan en las reservas internas para ser utilizados de acuerdo con sus necesidades fisiológicas (Valenzuela *et al.*, 2005).

Los contenidos y porcentajes de los compuestos bioquímicos, dependen de las propiedades químicas y físicas del medio de cultivo, por lo que la

composición de *Scenedesmus* es muy variable, oscilando entre 8.5% a 56% de proteína y de 7% a 14% de lípidos (Soeder y Hegewald, 1988).

Voltolina *et al.*, (1999) reportaron un promedio de 30% de proteína y 31.4% de lípidos en un medio sintético. Similarmente, Martínez *et al.*, (2000), presentan valores entre 33%-34% y Núñez *et al.*, (2001), documentaron valores de 33.5%. Tales valores son mayores a los máximos que se encontraron en el presente trabajo, de 23% para proteínas y de 21% de lípidos.

Soeder y Hegewald, (1988) mencionan que la microalga *Scenedesmus obliquus* dado su patrón de aminoácidos es factible para la nutrición de animales monogástricos. Becker, (1994) describe que se han encontrado estudios donde el uso de esta especie de microalga promueve un descenso en los niveles de colesterol en ratas, presumiblemente por la alta cantidad de celulosa y carbohidratos. También este autor menciona que a *Scenedesmus obliquus* se le puede dar un uso terapéutico en enfermedades de la piel favoreciendo una rápida cicatrización.

Teniendo en consideración el posible uso como complemento alimenticio de la microalga cultivada, es necesario puntualizar que para poder hacer factible un uso comercial de la biomasa cosechada es necesario un monitoreo constante de los componentes bioquímicos presentes en la microalga, ya que para poder comercializar esta biomasa es importante ofertar un alimento con una composición bioquímica. Además, es importante determinar el contenido de microorganismos patógenos y metales pesados, ya que tanto en las esferas

como en las microalgas se puede encontrar estos contaminantes provenientes del agua tratada.

### **5.9. Viabilidad de la matriz de alginato.**

Las esferas se degradaron progresivamente a lo largo de las corridas en los fotobiorreactores en el laboratorio y a nivel piloto al aire libre, lo que repercutió en un aumento en los parámetros de SST y DBO<sub>5</sub>, como se observó en los resultados.

La disolución de la matriz fue causada por varios factores, entre los que se pueden señalar el que en el experimento se sometieron las esferas a un régimen de luz:oscuridad 12:12 hrs, lo que aumentó la tasa de muerte en las microalgas. Al descomponerse la materia orgánica dentro de las esferas se produce gas que va destruyendo la esfera, como lo menciona Travieso *et al.*, (1992 y 1996) donde observaron una mayor estabilidad de las esferas en mayores irradiancias, por lo que un ciclo con más tiempo de luz, e incluso 24 horas luz hubiera tenido una mayor ventaja en lo que respecta a la estabilidad de la matriz y supervivencia de la microalga. Sin embargo, la principal razón que se eligió un periodo de tiempo de 12 hrs luz: 12 hrs oscuridad fue para registrar el funcionamiento de un fotobiorreactor a escala piloto que fuera energéticamente barato para así proponer su posible comercialización, ya que como menciona Voltolina *et al.*, (2005) que el uso a gran escala de fotobiorreactores con luz continua el balance costo-beneficio no es favorable por la alta demanda de energía y los precios bajos que tendría la biomasa producida.

Un factor más, es que debido a la naturaleza ionotrópica de la matriz, la estabilidad mecánica del gel del alginato depende generalmente de las condiciones iónicas ambientales, siendo muy vulnerable a la presencia de agentes quelantes, tales como el fosfato que comúnmente es el nutriente iónico mayormente presente en el agua residual. Estos agentes se unen con los cationes, como el  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que provoca que se pierda gel, dando como resultado final la disolución del alginato; afectando la estabilidad del gel en periodos largos y continuos (Chevalier y De La Noüe, 1985b; Mallick y Rai, 1994; Lau *et al.*, 1998) por ello, a pesar de haberse llevado a cabo la recalcificación de las esferas, el deterioro de la matriz fue evidente, demostrada por los parámetros de SST y por la observación directa de las esferas. Por lo que se propone darles un uso no mayor a 70 horas a las esferas y someterlas a una recalcificación con una concentración mayor a la utilizada en el presente proyecto.

#### **5.10. Comparación de los sistemas convencionales de tratamiento en relación del fotobioreactor piloto.**

Como se mencionó con anterioridad, el fotobioreactor piloto sólo es comparable con los primeros cuatro sistemas de tratamiento presentados en la Tabla XXVII en términos de  $\text{N-NH}_4$  y de P-total, los cuales incluyen al sistema de lodos activados. En principio como explica Grady *et al.*, (1999), todos los sistemas de lodos activados tienen en común: a) ser flóculos de microorganismos que son utilizados para remover la materia orgánica soluble y particulada del afluente, b) utilizar un tanque de sedimentación para remover los sólidos

suspendidos que se generaron con los lodos activados, c) los sólidos suspendidos retenidos en el tanque de sedimentación son reciclados a los lodos activados y d) el exceso de sólidos son desechados.

Una de las variables que aumentó más dramáticamente por efecto de la degradación de las esferas y por la liberación de microalgas al medio, fueron los SST. Por una parte podemos contemplar cierta ventaja de los sistemas de lodos activados al contar con sedimentador que evidentemente le confiere al efluente un agua con mejor calidad a los lodos activados en términos de SST.

Además los sistemas que más se acercan a los valores de nutrientes reportados en el efluente del fotobioreactor objeto de estudio, cuentan con filtración granular, por lo que disminuyen aun más los valores de SST, lo que a su vez reduce el  $DBC_5$ , ya que comúnmente en los efluentes urbanos los SST los conforman material orgánico particulado y/o soluble.

En cuanto al uso potencial del agua sólo se puede utilizar de momento en riego agrícola dados los valores altos de SST. Sin embargo, si este contaminante fuera removido el agua podría emplearse para un uso público urbano.

En lo que respecta al uso de las microalgas, además de ser un alimento potencial y tener propiedades terapéuticas en la piel como se ha mencionado con anterioridad, también puede utilizarse la biomasa combinada con papel para la producción de bio-gas (metano) como lo proponen Hong-Wei y Brune (2007). La adición de papel a la biomasa microalgal tiene como función balancear la relación C/N y las esferas podrían ser utilizadas directamente en un sistema de digestión. El inconveniente sería de contar con la infraestructura necesaria para realizar la

digestión, por lo que sería necesario realizar un estudio de costo-beneficio, analizar el potencial y la eficiencia del uso de esta biomasa con diferentes métodos de digestión.

Una propuesta más es el uso directo de las esferas para alimentar peces ornamentales.

Otro uso para la biomasa sería como acondicionador de suelos, el cual se aplicaría directamente al suelo para suministrar materia orgánica a suelos pobres de este constituyente. Es recomendable realizar un análisis de metales pesados a las esferas debido a su capacidad de adsorber estos contaminantes y a su posible afectación al suelo al que fueran aplicadas.

Las opciones antes mencionadas le darían un uso a la biomasa con altas cargas de nutrientes disponibles como producto del tratamiento de aguas residuales, tratamiento que de manera tradicional sólo causa gastos, y no material aprovechable.

## 6. Conclusiones.

Se implementaron fotobioreactores por lote, tanto a nivel laboratorio como piloto, mostrando remociones mayores de N-NH<sub>4</sub> y de P-total en comparación a los del sistema continuo; con un 52% de remoción de N-NH<sub>4</sub> y 78% de P-total para los fotobioreactores por lote a nivel laboratorio y con un 40% de remoción de N-NH<sub>4</sub> y un 76% de P-total para los fotobioreactores piloto por lote. En cuanto a la calidad del efluente del fotobioreactor a nivel piloto se encontró que, debido a los altos niveles de sólidos suspendidos totales (SST) y demanda bioquímica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>) sólo se puede usar para el riego agrícola.

La calidad del agua del efluente del fotobioreactor a nivel piloto comparada con los sistemas convencionales de tratamiento fue menor y solo fue similar en términos de nutrientes con las cuatro combinaciones de siguientes procesos:

- Lodos activados con filtración granular.
- Lodos activados con filtración granular y adsorción de carbón.
- Lodos activados con nitrificación.
- Lodos activados con nitrificación-desnitrificación.

Las microalgas *Scenedesmus obliquus* presentaron un incremento progresivo en la clorofila a, biomasa, proteínas y lípidos. Por lo que puede ser viable para alimento de peces ornamentales, acondicionador de suelos, producción de biogás y/o uso terapéutico en la piel, pero efectuando un análisis previo del contenido de metales pesados y patógenos. Por lo que sería necesario efectuar un estudio para poder establecer la viabilidad del uso de las microalgas,

ya sea inmovilizadas o libres, obtenidas de un sistema similar al presentado en el presente trabajo en el que se hagan ensayos sobre alimentación de peces de ornato, acondicionamientos de suelos o producción de bio-gas, además de estudiar su factibilidad económica para los diferentes usos.

Debido a los valores de pH evaluados en el presente trabajo, la desinfección del agua residual no fue la esperada. La remoción de coliformes fecales no fue lo suficiente ni constante como para poder cumplir con un uso de servicios al público de contacto directo o servicios al público con contacto indirecto u ocasional según Norma Oficial Mexicana NOM-003-SEMARNAT-1997, por lo que sólo se recomienda el uso del efluente para riego agrícola.

## Referencias

- ABE, K., A. Imamaki y M. Hirano, 2002. Removal of nitrate, nitrite, ammonium and phosphate ions from water by the aerial microalga *Trentepohlia aurea*. *Journal of Applied Phycology*. 14(2): 129-134.
- BECKER, E. W, 1994. *Microalgae Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press; 293.
- BLIGH, E. y W. Dyer, 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemical Physiology*. 37(52): 911-917.
- CHEUNG, Y. H., S. F. Leung, M. H. Wong y P. S. Wong, 1995. Reclamation of polluted riverwater for aquaculture: removal of nutrients by microalgae. *Water Science and Technology*. 32(3): 271-280.
- CHEVALIER, P. y J. De La Noüe, 1985a. Efficiency of immobilized hyperconcentrated algae for ammonium and orthophosphate removal from wastewaters. *Biotechnology Letters*. 7(6): 395-400.
- CHEVALIER, P. y J. De La Noüe, 1985b. Wastewater nutrient removal with microalgae immobilized in carrageenan. *Enzyme and Microbial Technology*. 7(12): 621-624.
- CHEVALIER, P., D. Proulx, P. Lessard, W. F. Vincent y J. De La Noüe, 2000. Nitrogen and phosphorus removal by high latitude mat-forming cyanobacteria for potential use in tertiary wastewater treatment. *Journal of Applied Phycology*. 12: 105-112.
- CHUNTAPA, B., S. Powtongsook y P. Menasveta, 2003. Water quality control using *Spirulina platensis* in shrimp culture tanks. *Aquaculture*. 220(1-4): 355-366.
- COMISIÓN NACIONAL DEL AGUA, 2005. Usos del Agua. IN: Comisión Nacional del Agua (ed) .*Síntesis de las Estadísticas del Agua en México, 2005*. 105 p.
- CORREA-REYES, J. G, 1996. Remoción de nutrientes con microalgas en agua residual sintética. CICESE. Ensenada, Baja California.
- DANIEL, W. W.2000, *Bioestadística*. Tercera edición; 643 pp.

- DE BASHAN, L. E., Y. Bashan, M. Moreno, V. K. Lebsky y J. J. Bustillos, 2002a. Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella* spp. when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Canadian Journal of Microbiology*. 48(6): 514-521.
- DE BASHAN, L. E., M. Moreno, J. P. Hernandez y Y. Bashan, 2002b. Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Research*. 36(12): 2941-2948.
- DE LA NOÛE, J. y A. Basseres, 1989. Biotreatment of anaerobically digested swine manure with microalgae. *Biological Wastes*. 29(1): 17-31.
- DURÁN, A. E., M. Miniesa, X. Méndez, F. Valero, F. Lucena y J. Cofre, 2002. Removal and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters. *Journal of Applied Microbiology*. 92: 338-347.
- GANTAR, M., Z. Obreht y B. Dalmacija, 1991. Nutrient removal and algal succession during the growth of *Spirulina platensis* and *Scenedesmus quadricauda* on swine wastewater. *Bioresource Technology*. 36(2): 167-171.
- GLASGOW, H. B., J. M. Burkholder y D. E. Schmechel, 1995. Insidious effects of a toxic estuarine dinoflagellate on fish survival and human health. *Journal of Toxicology Environmental Health*. 46(4): 501-522.
- GÓMEZ-VILLA, H., D. Voltolina, M. Nieves y P. Piña, 2005. Biomass production and nutrient budget in outdoor cultures of *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae) in artificial wastewater, under the winter and summer conditions of Mazatlan, Sinaloa, Mexico. *Vie et milieu*. 55(2): 121-126.
- GONZALEZ, L. E., R. O. Canizares y S. Baena, 1997. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresource Technology*. 60(3): 259-262.
- GRADY, L. JR., G. T. Daigger y H. C. Lim, 1999. *Biological Wastewater Treatment* Marcel Dekker, Inc; 1076 p.
- GUILLARD, R. R. y J. H. Ryther, 1962. Studies of marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* husde and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*. 8: 229-239.

- HERNÁNDEZ, J.-P., L. E. de-Bashan y Y. Bashan, 2006. Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella* spp. co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Enzyme and Microbial Technology*. 38: 190-198.
- HOFFMANN, J. P., 1998. Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae. *Journal of Phycology*. 34(5): 757-763.
- HONG-WEI, Y. y E. D. Brune, 2007. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. *Bioresource Technology*. 98: 130-134.
- JIMÉNEZ-PÉREZ, M., P. Sánchez-Castillo, O. Romera, D. Fernández-Moreno y C. Pérez-Martínez, 2004. Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure. *Enzyme and Microbial Technology*. 34(5): 392-398.
- KAYA, V. M., J. de la Noüe y G. Picard, 1995. A comparative study of four systems for tertiary wastewater treatment by *Scenedesmus bicellularis*: new technology for immobilization. *Journal of Applied Phycology*. 7: 85-95.
- KAYA, V. M. y G. Picard, 1996. Stability of chitosan gel as entrapment matrix of viable *Scenedesmus bicellularis* cells immobilized on screens for tertiary treatment of wastewater. *Bioresource Technology*. 56(2-3): 147-155.
- KUO-TUNG, J., W. Liang-Saw y P. H. Santschi, 2005. Trace metal (Cd, Cu, Ni and Pb) partitioning, affinities and removal in the Danshuei river estuary, a macro-tidal, temporally anoxic estuary in Taiwan. *Marine Chemistry*. 96: 293-313.
- LAU, P. S., N. F. Y. Tam y Y. S. Wong, 1995. Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater. *Environmental Pollution*. 89: 59-66.
- LAU, P. S., N. F. Y. Tam y Y. S. Wong, 1997. Wastewater nutrients (n and p) removal by carrageenan and alginate immobilized *Chlorella vulgaris*. *Environmental Technology*. 18(9): 945-951.
- LAU, P. S., N. F. Y. Tam y Y. S. Wong, 1998. Effect of carrageenan immobilization on the physiological activities of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*. 63: 115-121.

- LAVOIE, A. y J. de la Noüe, 1985. Hyperconcentrated cultures of *Scenedesmus obliquus*: A new approach for wastewater biological tertiary treatment? *Water Research*. 19(11): 1437-1442.
- LEVINE, A. D. y T. Asano, 2004. Recovering sustainable water from wastewater. *Environmental Science & Technology*. 201A-208A.
- LODI, A., L. Binaghi, C. Solisio, A. Converti y M. Del Borghi, 2003. Nitrate and phosphate removal by *Spirulina platensis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 30(11): 656-660.
- LOWRY, O. H., N. J. Rosebrough, F. A. Lewis y R. J. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275.
- MALLICK, N. y L. C. Rai, 1994. Removal of inorganic ions from wastewaters by immobilized microalgae. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 10(4): 439-443.
- MALLICK, N, 2002. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. *Biometals*. 15: 377-390.
- MARTÍNEZ, M. E., S. Sánchez, J. M. Jiménez, F. El Yousfi y L. Muñoz, 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*. 73(3): 263-272.
- MENDONCA, A. F., T. L. Amoroso y S. J. Knabel, 1994. Destruction of gram-negative food-borne pathogens by high pH involves disruption of the cytoplasmic membrane. *Applied and Environmental Microbiology*. 60(11): 4009-4014.
- METCALF & EDDY INC, 2003. *Wastewater Engineering Treatment and Reuse*. MacGraw-Hill. New York, 4th ed 1819 p.
- NORMA MEXICANA NMX-AA-005-SCFI-2000, Aguas-Determinación de grasas y aceites-Método de extracción Solhlet, Diario Oficial de la Federación el 8 de agosto de 1980.
- NORMA MEXICANA NMX-AA-026-SCFI-2001, Aguas - Determinación de nitrógeno total - Método Kjeldahl, Diario Oficial de la Federación el 27 de octubre de 1980.

- NORMA MEXICANA NMX-AA-028-SCFI-2001, Aguas-Determinación de demanda bioquímica de oxígeno.- Método de incubación por diluciones, Diario Oficial de la Federación el 6 de julio de 1981.
- NORMA MEXICANA NMX-AA-029-SCFI-2001, Aguas - Determinación de fósforo total - Métodos espectrofotométricos, Diario Oficial de la Federación el 21 de octubre de 1981.
- NORMA MEXICANA NMX-AA-034-SCFI-2001, Aguas-Determinación de sólidos en agua.- Método gravimétrico, Diario Oficial de la Federación el 3 de julio de 1981.
- NORMA MEXICANA NMX-AA-042-1987, Aguas-Determinación del número más probable de coliformes totales y fecales.- Método de tubos múltiples de fermentación, Diario Oficial de la Federación el 22 de junio de 1987.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-001-SEMARNAT-1996, "Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales". Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, Diario Oficial de la Federación el 24 de junio de 1996.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-003-SEMARNAT-1997, "Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reusen en servicios al público". Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, Diario Oficial de la Federación el 14 de enero de 1998.
- NUÑEZ, V. J., D. Voltolina, M. Nieves, P. Piña, A. Medina y M. Guerrero, 2001. Nitrogen budget in *Scenedesmus obliquus* cultures with artificial wastewater. *Bioresource Technology*. 78(2): 161-164.
- PANIAGUA-MICHEL, J., B. C. Farfan, F. Bueckle-Ramirez y F. Bueckle-Ramirez, 1987. Culture of marine microalgae with natural biodigested resources. *Aquaculture*. 64(3): 249-256.
- PARSONS, T. R., Y. C. Maita y C. M. Carol, 1984. A Manual of Chemical and Biological Method for Seawater Analysis Pergamon Press. Oxford, 173 pp.
- RAVVA, S. V. y A. Korn, 2007. Extractable organic components and nutrients in wastewater from dairy lagoons influence the growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(7): 2191-2198.

- RICHMOND, A, 1986. Handbook of microalgal mass culture. CRC Press; 528 pp.
- SEBASTIAN, S. y K. V. K. Nair, 1984. Total removal of coliforms and *E. coli* from domestic sewage by high-rate pond mass culture of *Scenedesmus obliquus*. Environmental Pollution. 34(3): 197-206.
- SHI, J., B. Podola y M. Melkonian, 2007. Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae immobilized on twin layers: an experimental study. Journal of Applied Phycology. 19(5): 417-423.
- SOEDER, C. J. & E. Hegewald, 1988. *Scenedesmus*. En: Borowitzka, M. A. y Borowitzka, L. J. (ed) .Micro-algal Biotechnology. Cambridge University Press; 60-84.
- TAM, N. F. Y. y Y. S. Wong, 1989. Wastewater nutrient removal by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus sp.* Environmental Pollution. 58(1): 19-34.
- TAM, N. F. Y. y Y. S. Wong, 2000. Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. Environmental Pollution. 107(1): 145-151.
- TRAVIESO, L., F. Benítez y R. Dupeiron, 1992. Sewage treatment using immobilized Microalgae. Bioresource Technology. 40: 183-187.
- TRAVIESO, L., F. Benítez, P. Weiland, E. Sánchez, R. Dupeyrón y A. R. Domínguez, 1996. Experiments on immobilization of microalgae for nutrient removal in wastewater treatments. Bioresource Technology. 55: 181-186.
- VALENZUELA, E. E., de la C. F. Lafarga, N. R. Millán y C. F. Nuñez, 2005. Crecimiento, consumo de nutrientes y composición proxima de *Rhodomonas sp.* cultivada en medio f/2 y fertilizantes agrícolas. Ciencias Marinas. 31(1A): 79-89.
- VOLTOLINA, D., B. Cordero, M. Nieves y L. P. Soto, 1999. Growth of *Scenedesmus sp.* in artificial wastewater. Bioresource Technology. 68(3): 265-268.
- VOLTOLINA, D., H. Gómez-Villa y G. Correa, 2005. Nitrogen removal and recycling by *Scenedesmus obliquus* in semicontinuous cultures using artificial wastewater and a simulated light and temperature cycle. Bioresource Technology. 96: 359-362.