



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERIA AMBIENTAL – AGUA

SEPARACIÓN DE MICROALGAS PRESENTES
EN AGUA RESIDUAL TRATADA DEL LAGO NABOR CARRILLO
MEDIANTE OZOFLOTACIÓN

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA:
I.Q. REYNA GARCÍA ESTRADA

TUTORES PRINCIPALES:
DRA. MA. TERESA ORTA LEDESMA, INSTITUTO DE INGENIERÍA
DR. IGNACIO MONJE RAMÍREZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA

COMITÉ TUTOR
DR. PEDRO MARÍNEZ PEREDA, FACULTAD DE INGENIERÍA
DR. ENRIQUE ARTURO CANTORAL URIZA, FACULTAD DE CIENCIAS
DRA. MARISELA BERNAL GONZÁLEZ, FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D. F. ENERO 2014

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Martínez Pereda Pedro

Secretario: Dra. Orta Ledesma María Teresa

1er. vocal: Dr. Cantoral Uriza Enrique Arturo

2do. vocal: Dra. Bernal González Marisela

3er. Vocal: Dr. Monje Ramírez Ignacio

Lugar o lugares donde se realizó la tesis: **Instituto de ingeniería-UNAM y Escuela de Ingeniería Química y Materiales Avanzados-Universidad de Newcastle.**

TUTORA DE TESIS:

Dra. Orta Ledesma María Teresa

RECONOCIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Ma. Teresa Orta Ledesma, Dr. Ignacio Monje Ramírez y Mtra Isaura Yañez Noguez por la oportunidad de realizar este trabajo, además de guiarme y compartir sus conocimientos.

Al Dr. Adam Harvey y a la Dra. Sharon Velásquez Orta por darme la oportunidad de realizar mi estancia en la Escuela de Ingeniería Química y Materiales Avanzados-Universidad de Newcastle.

AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia.

A mis amigos: Claudia, Raúl, Mayte, Iván, Nadia, Myrna, Estrella, Myriam, Osbaldo, Arturo, Sandra, Eliza y Leonardo.

A mis compañeros del Instituto de Ingeniería-UNAM y al equipo de microalgas.

A mis profesores del posgrado por sus consejos y enseñanzas.

ÍNDICE

ÍNDICE	ii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
OBJETIVOS	4
Objetivo general.....	4
Objetivos específicos.....	5
1. ÁREA DE ESTUDIO.....	5
1.1. Ex lago de Texcoco	5
1.2. Lagunas facultativas	6
1.3. Lago Nabor Carrillo.....	7
2. MARCO TEÓRICO	9
2.1. Microalgas como fuente de biodiesel	9
2.2. Microalgas	12
2.2.1. Clasificación.....	15
2.2.2. Movilidad.....	15
2.2.3. Reproducción	16
2.2.4. Condiciones de crecimiento	18
2.3. Sistemas de cultivo de microalgas	19
2.3.1. Cultivos abiertos.....	20
2.3.2. Cultivos cerrados.....	21
2.4. Cosecha de microalgas.....	22
2.4.1. Filtración.....	22
2.4.2. Centrifugación	23
2.4.3. Floculación.....	23
2.4.4. Flotación con aire disuelto	23
2.4.5. Ozoflotación	24
3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	28
3.1. Muestreo y caracterización del agua residual tratada.....	29

3.1.1.	Recolección de agua residual	29
3.1.2.	Parámetros fisicoquímicos	29
3.2.	Identificación de microalgas	30
3.3.	Ozoflotación de microalgas.....	30
3.3.1.	Diseño experimental	31
3.3.2.	Arreglo experimental del sistema de ozoflotación	32
3.3.3.	Cosecha de microalgas por ozoflotación.....	34
3.4.	Secado de biomasa.....	37
3.5.	Extracción de lípidos	37
3.6.	Transesterificación in situ	38
3.7.	Clases de lípidos	38
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
4.1.	Caracterización del agua residual tratada.....	41
4.2.	Identificación de microalgas	42
4.3.	Pruebas de ozoflotación de microalgas	46
4.4.	Recuperación de biomasa por ozoflotación.....	52
4.5.	Lípidos	53
5.	CONCLUSIONES.....	61
6.	RECOMENDACIONES.....	63
7.	FUENTES CONSULTADAS.....	64
	Anexo A. Cuantificación de ozono en fase gas (Método Yodométrico).....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. a) Lagunas facultativas y b) lago Nabor Carrillo (imagen de Google Earth)	8
Figura 2. Reacción de transesterificación de triglicéridos para la producción de biodiesel (R es el grupo o cadena de ácidos grasos)	11
Figura 3. Diagrama de producción de biodiesel a partir de microalgas	12
Figura 4. Localización de los lípidos en la célula algal	14
Figura 5. División de celular de Euglena sp (Barsanti y Barsanti, 2006)	16
Figura 6. Zoospora de Chlamydomonas sp. dentro de la pared celular	17
Figura 7. Reproducción sexual y asexual, característica principal de las Chlamydomonas sp	17
Figura 8. Cultivo abierto de microalgas en Dortmund, Alemania	20
Figura 9. Diseños de fotobioreactores cerrados: tubular horizontal (Abdel-Raouf et al., 2012) (imagen izquierda) y placa plana (Muñoz, 2013) (imagen derecha)	21
Figura 10. Unidad para el proceso de ozoflotación (Langlais et al., 1991)	26
Figura 11. Reacción del ozono con alga (Langlais et al., 1991)	28
Figura 12. Diagrama del sistema experimental para ozoflotación de microalgas	34
Figura 13. Formación de espuma	35
Figura 14. Desarrollo de una prueba de ozoflotación de microalgas	36
Figura 15. Representación esquemática del proceso para aislar clases de lípidos	40
Figura 16. Fotografías de microalgas en las lagunas facultativas y lago Nabor Carrillo. Donde a) Anabaena sp., b) Desmodesmus sp., c) Actinastrum sp., d) Nitzschia sp., e) Scenedesmus sp., f) Microcystis sp., g) Cychlotella sp., h) Arthospira sp., i) Merismopedia sp., j) Coelastrum sp., k) Scenedesmus sp., l) Spirulina sp., m) Desmodesmus sp., n) Anabaena sp., o) Chlamydomonas sp., p) Euglena sp., q) Chlorella sp., r) Oscillatoria sp., s) Phacus, t) Diatomea, u) Phacus, v) Pseudopediastrium boryanum y w) Desmodesmus sp.	43
Figura 17. Microalgas en lagunas facultativas	44
Figura 18. Microalgas en el lago Nabor Carrillo	45
Figura 19. Grafica de Pareto respecto al número microalgas	47
Figura 20. Grafica de Pareto respecto a los sólidos suspendidos totales	48
Figura 21. Grafica de Pareto respecto a la turbiedad	49
Figura 22. Efecto del tiempo de reacción, el flujo y la concentración de ozono en:	51
Figura 23. Efecto del ozono en el consorcio recuperado por ozoflotación con diferentes DOA: a) 22.1 mgO ₃ /L agua, b) 51.6 mgO ₃ /L agua, c) 63.2 mgO ₃ /L agua, d) 94.7 mgO ₃ /L agua y e) 142.1 mgO ₃ /L agua.	54
Figura 24. Efecto de la dosis de ozono aplicada en la recuperación de lípidos del consorcio de microalgas	55
Figura 25. Perfil de ésteres metílicos de ácidos grasos para el consorcio de microalgas.	58
Figura 26. Aislación de clases de lípidos del consorcio de microalgas	59

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Contenido de lípidos de algunas microalgas</i>	10
<i>Tabla 2. Composición química de las microalgas base seca (%)</i>	12
<i>Tabla 3. Aplicaciones industriales de los componentes de los lípidos</i>	14
<i>Tabla 4. Estudios de separación de microalgas por ozoflotación</i>	25
<i>Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos determinados en muestras de agua</i>	30
<i>Tabla 6. Matriz del diseño experimental con las condiciones codificadas y reales</i>	31
<i>Tabla 7. Solventes para la extracción de clases de lípidos</i>	38
<i>Tabla 8. Caracterización del agua del ex lago de Texcoco</i>	41
<i>Tabla 9. Resultados promedio de los experimentos para la optimización del proceso</i>	46
<i>Tabla 10. Análisis de varianza de recuperación de SST</i>	49
<i>Tabla 11. R cuadrada y R cuadrada corregida de las variables de respuesta</i>	50
<i>Tabla 12. Lípidos totales del consorcio de microalgas</i>	55
<i>Tabla 13. Perfil de FAME para el consorcio de microalgas</i>	56
<i>Tabla 14. Perfil de ácidos grasos del consorcio de microalgas recuperadas por centrifugación y ozoflotación</i>	57

RESUMEN

En la actualidad diversos grupos de investigadores enfocan su atención a la recuperación de microalgas debido a sus múltiples aplicaciones. Dicha recuperación depende del procedimiento utilizado así como de las características de las microalgas.

El objetivo de este trabajo fue recuperar mediante ozoflotación un consorcio de microalgas presentes en agua del Lago Nabor Carrillo, integrado entre otros géneros por *Scenedesmus* sp, *Chlorella* sp. y *Chlamidomonas* sp. Estas últimas excelentes productoras de lípidos que pueden ser utilizados para la producción de biodiesel.

Los experimentos de ozoflotación se llevaron a cabo en una columna de burbujeo escala laboratorio operada por lote, la cual fue adaptada para la flotación y recuperación de biomasa de microalgas. Durante la fase experimental fue posible observar que el ozono produce una efectiva separación sólido - líquido a través de la flotación y concentración de la biomasa microalgas en la espuma formada.

Las condiciones de operación del proceso de ozoflotación: concentración de ozono, flujo de gas ozono y tiempo de ozonación, fueron evaluados con un diseño factorial 3³, obteniendo como respuesta la separación de microalgas presentes en agua del lago Nabor Carrillo, medida como la cantidad de microalgas recuperadas, la remoción de turbiedad y sólidos suspendidos totales, respectivamente.

El análisis de varianza realizado a los resultados de los parámetros de respuesta obtenidos a partir del diseño experimental, indica que las variables de mayor significancia para la remoción de SST en orden de importancia fueron principalmente: la concentración de ozono en fase gas (valor p: 0.000), tiempo de ozoflotación (valor p: 0.000), el flujo de gas ozono (valor p: 0.003).

Los resultados muestran una rápida y alta concentración de microalgas en el concentrado microalgal (98.32% del número de microalgas del agua residual; 79.82%

SST y 94.37% de turbiedad), aplicando una concentración de ozono en fase gas de 45 mgO₃/L, flujo de gas ozono 0.6 L/min y 5 minutos de ozoflotación, equivalente a una dosis de ozono de 0.38 mgO₃/mg de biomasa seca.

Adicionalmente, en este trabajo se determinó que bajo ciertas condiciones de dosis de ozono aplicada durante la ozoflotación (DOA: 51.6-63.2 mgO₃/L), la posterior extracción de lípidos de la biomasa recuperada, se incrementa hasta en un 50% (12%p), comparada con la extracción de lípidos obtenida a partir de biomasa cosechada por simple centrifugación (5.85%p). A altas DOA (142.1 mgO₃/L) el efecto sobre la extracción de lípidos se ve disminuido.

Mediante la cuantificación por cromatografía de gases (GG) de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs, por sus siglas en Ingles), obtenidos por la reacción de transesterificación in situ de lípidos, se estima una conversión de lípidos a biodiesel de 1.23%p hasta 3.23%p. El perfil de lípidos del consorcio de microalgas está integrado principalmente por ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C18:0), ácido linolénico (C18:3n3) y ácido linoleico (C18:2n6c). Un efecto adicional del ozono fue el incremento de la fracción saturada de FAMEs, lo que contribuye en la estabilidad del producto final del biodiesel obtenido.

Los resultados de esta tesis indican que la flotación con ozono (ozoflotación) puede ser considerada como una metodología prometedora para la separación y recuperación de biomasa de microalgas a partir de aguas residuales, con ventajas importantes en la etapa de extracción de lípidos y calidad del biodiesel.

INTRODUCCIÓN

El biodiesel, es uno de los biocombustibles que ha recibido mayor atención en los últimos años, el cual es producido tradicionalmente mediante transesterificación de triglicéridos de origen natural, principalmente de aceites vegetales. Como materia prima generalmente se utilizan cultivos como maíz, soya y aceite de palma, que requieren el uso de suelo fértil, provocando una reducción de los terrenos disponibles para cultivos con fines alimentarios. Para solucionar este problema, se han buscado materias primas que no compitan con la producción de alimentos, surgiendo como una alternativa, la utilización de microalgas.

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos, capaces de multiplicar su biomasa en 24hrs y crecer en diferentes condiciones ambientales, incluyendo agua salada y aguas residuales. El biodiesel a partir de microalgas es biodegradable, no contiene azufre y no es tóxico (Mata et al., 2010).

Sin embargo, la producción de biodiesel a partir de microalgas presenta algunos problemas para su escalamiento. Dentro de estas limitaciones destaca la falta de un método de recolección o cosecha algal económico y eficiente, en el cual influye el tamaño de las células algales (3-30 μm de diámetro), así como su densidad celular y los grandes volúmenes de agua que se manejan dificultan la recuperación de biomasa (Molina et al., 2003).

La cosecha de microalgas es una etapa que consume cerca del 20 al 30% de los costos de producción de biomasa (Pragya et al., 2013), generalmente los procesos utilizados son la filtración, centrifugación, floculación y flotación, ninguno de estos procesos es completamente satisfactorio. La filtración es un proceso de bajo costo y no requiere de ningún agente químico, sin embargo depende del tamaño y morfología de las microalgas. La centrifugación es un proceso eficiente utilizado generalmente para obtener productos de alto valor agregado. La floculación con sales metálicas (por ejemplo sulfato de aluminio) no es recomendada por la contaminación de la biomasa, de tal manera que ésta no puede ser utilizada posteriormente. El proceso de flotación

con aire disuelto es económico sin embargo va acompañado de la adición de un agente químico para realizar la floculación (Dismukes et al., 2008; Lee et al., 2009).

En este trabajo de tesis se planteó estudiar el proceso de ozoflotación, en la cual el ozono induce a la flotación de las microalgas a través de la liberación de polímeros naturales que agrupan a las microalgas y a su vez, estas son concentradas en la espuma formada en la superficie, lo que posibilita su fácil recolección. Posteriormente se cuantifica la extracción de lípidos del consorcio de microalgas recuperado por ozoflotación así como la identificación del perfil de ésteres metílicos de ácidos grasos.

OBJETIVOS

Objetivo general

Separar mediante ozoflotación las microalgas presentes en el agua del lago Nabor Carrillo, para un potencial aprovechamiento energético de estas en la zona del ex lago de Texcoco.

Objetivos específicos

1. Caracterizar el agua de las lagunas facultativas y del lago Nabor Carrillo en época fría y cálida respecto a parámetros de calidad de agua y contenido de microalgas.
2. Implementar un reactor a escala laboratorio para la separación de microalgas por ozoflotación conforme a la literatura publicada.
3. Realizar experimentalmente la separación de microalgas por ozoflotación, determinando el efecto de la concentración, el flujo de gas ozonado, el tiempo de ozonación, con respecto en la recuperación de biomasa.
4. Establecer las condiciones de operación del proceso de ozoflotación para la separación de un consorcio de microalgas con potencial aprovechamiento energético.
5. Determinar la relación de dosis de ozono-contenido de lípidos y el perfil de ácidos grasos recuperado.

1. ÁREA DE ESTUDIO

1.1. Ex lago de Texcoco

La Cuenca del ex lago de Texcoco abarca dos de las zonas hidrológicas del Valle de México, la zona llamada “Teotihuacán”, cuya área es de 930 km² y la denominada “Texcoco” con una extensión de 1146 km², ocupando una superficie total de 2076 km² incluyendo los municipios de Texcoco y Netzahualcóyotl del estado de México y las delegaciones Venustiano Carranza y Gustavo A. Madero del Distrito Federal.

El lago de Texcoco formaba parte fundamental del sistema y funcionamiento hidrológico del Valle de México, su sistema lacustre estaba integrado por cinco lagos someros: Texcoco, Xochimilco, Xaltocan, Zumpango y Chalco, de los cuales el 50% del área total pertenecía al lago de Texcoco, ubicado en la parte más baja de la Cuenca, esta posición originaba que sus aguas fueran de gran salinidad por acumulación, aunado a la alta evaporación.

En el lago descargaban los ríos de la Piedad y San Francisco que llegan del Distrito Federal; los ríos San Juan Teoyihuacan, Papalotla, Xalapango, Coxcacoco, Texcoco, Chapingo, San Bernardino, Santa Monica y Coatepec por la parte oriental. Gran parte de estos afluentes han sido entubadas y en su mayoría sirven hoy como vehículo para las aguas negras o residuales de la zona metropolitana. Además, llegan a la zona del ex lago de Texcoco, los siguientes ríos artificiales de aguas negras: el río Churubusco, el río de la Compañía y el río de los Remedios.

El clima de la zona es semiseco templado, con una precipitación pluvial media anual de 600 a 1200 mm y una evaporación anual de 900 a 2300 mm al año, notablemente superior a la precipitación (García, 1988). La temperatura media mensual oscila entre los 12°C y los 18°C; la temperatura máxima varía entre los 25°C y los 32°C y la mínima entre -5°C y los 8°C (García, 1998). El suelo es alcalino sódico, constituido por arcillas con una gran concentración de sales (Cruickshank, 1984).

1.2. Lagunas facultativas

En la planta de tratamiento de lagunas facultativas con recirculación opera agua residual domestica de forma natural proveniente del Rio Churubusco, que funciona bajo los mismos principios biológicos por los que tienen lugar la auto-depuración de ríos y lagos.

Está constituida por dos módulos independientes, cada uno con dos lagunas primarias que reciben un gasto promedio de 250 L/s. El tiempo de retención en cada laguna es: 9 días (laguna primaria), 7 días (laguna secundaria) y 7 días (laguna terciaria), dando un tiempo de retención total de 23 días (Muciño, 2001).

En estas lagunas se pueden encontrar diversos microorganismos como bacterias, protozoarios y algas. Entre las bacterias y las algas existe una relación mutualista, donde las algas producen el oxígeno necesario para que las bacterias puedan degradar la materia orgánica, y las bacterias liberan dióxido de carbono que es utilizado por las algas como nutriente. El efluente se reúsa para conservar el lago Nabor Carrillo y en el riego de áreas vedes.

1.3. Lago Nabor Carrillo

El lago Nabor Carrillo fue construido en los años 70's como parte de un proyecto del Gobierno Federal para restaurar la zona degradada y aprovechar racionalmente los recursos de la zona del ex lago de Texcoco, y proveer de un hábitat a aves acuáticas migratorias y nativas.

Tiene una extensión casi rectangular de 9.5 km², cuyos lados son de aproximadamente 4.1 y 2.3 km medidos al eje de la corona del bordo perimetral, con un perímetro de 11, 780 m, una profundidad media de 2.3 m, su capacidad de diseño es de 36 millones de metros cúbicos (Cruickshank et al., 1984).

El lago se alimenta con el agua proveniente de las lagunas facultativas ubicadas a un costado del mismo (Figura 1). Debido al tratamiento que recibe el agua residual, al

contenido de nitrógeno y fósforo se han desarrollado floraciones de microalgas. Mayén (1967) realizó un estudio del área donde observó la presencia de algas clorofíceas como las siguientes: *Pleurotaenium ehrebergii*; *P. trabécula*; *Coelastrum microporum*; *C. reticulatum*. Ballot et al., 2008 identificó *Anabaena* sp., Deniz et al., 2011 realizó un estudio con *Spirulina* sp del ex lago de Texcoco. En 2012, Orta de Velásquez et al, detectaron que en la planta de lagunas facultativas se tiene entre las especies de microalgas *Microcystis* sp., *Merismopedia* sp., *Euglena* sp., *Scenedesmus* sp., *Chorella*, *Anacystis* sp y *Diatomeas*. El efluente del lago Nabor Carrillo con este contenido de microalgas es reutilizado para riego de áreas verdes.



Figura 1. a) Lagunas facultativas y b) lago Nabor Carrillo (imagen de Google Earth)

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Microalgas como fuente de biodiesel

Las microalgas son una alternativa para la producción de biodiesel, generalmente denominado como combustible de algas o combustible de tercera generación. Las microalgas como materia prima ofrecen ventajas económicas y ambientales (Garibay et al., 2009; Hu et al., 2008):

- a) No compiten con aquellas fuentes de origen alimenticio (por ejemplo de aceite de soya, aceite de palma, aceite de canola y aceite de girasol).
- b) Las microalgas pueden ser cultivadas en agua dulce, de mar o en agua salobre, disminuyendo así la presión sobre el agua dulce requerida para la producción de alimento. Algunas especies aisladas de agua dulce, pueden crecer en aguas residuales.
- c) Rápido crecimiento, lo cual favorece la producción de biomasa en tiempos cortos, algunas microalgas duplican su biomasa en 24 horas (Brennan y Owende, 2010).
- d) Mayor rendimiento de aceite que cualquier otro cultivo convencional. Es de 10 a 20 veces mayor que el derivado del aceite de palma y de 200 a 400 veces mayor que el aceite de soya (Loera-Quezada y Olguín, 2010).
- e) Con relación a las emisiones de gases invernadero, es de los bioenergéticos que muestran un valor negativo, es decir, no hay producción de dióxido de carbono durante el ciclo de vida.

El contenido de aceite en las microalgas puede exceder el 80% en peso seco de biomasa algal. Generalmente los niveles de aceite están entre 20 y 50% (tabla 1), este nivel depende de la microalga (Chisti, 2008; Dermibas y Dermibas, 2010).

Tabla 1. Contenido de lípidos de algunas microalgas

Microalga	Contenido de lípidos (% peso seco)
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella</i> spp	28-32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca</i> spp	16-37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis</i> spp.	25-33
<i>Monallanthus salina</i>	20
<i>Nannochloris</i> spp.	20-35
<i>Nannochloropsis</i> spp.	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia</i> spp.	45-47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30
<i>Schizochytrium</i> spp.	50-77
<i>Tetraselmis suecica</i>	15-23

El biodiesel está compuesto por ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME, por sus siglas en inglés) que es obtenido a través de la reacción de transesterificación de triglicéridos de microalgas con alcohol (Figura 2), donde un exceso de alcohol es utilizado para forzar la reacción a favor del lado derecho de la reacción mejorando la producción del biodiesel, generalmente se utiliza metanol. La transesterificación puede ser catalizada por una base (NaOH), un ácido (H₂SO₄) o una enzima (lipasa). La base es usada como un catalizador para lípidos con alto contenido de triglicéridos, para lípidos con alto contenido de ácidos grasos libres que pueden ser convertidos a ésteres se utilizan los ácidos, mientras que la lipasa puede convertir ambos triglicéridos y ácidos grasos libres a biodiesel, pero esta es más costosa. El principal producto de la

transesterificación es el biodiesel y el glicerol los cuales pueden ser separados por medio de una sedimentación, filtración y decantación (Topf et al., 2012).

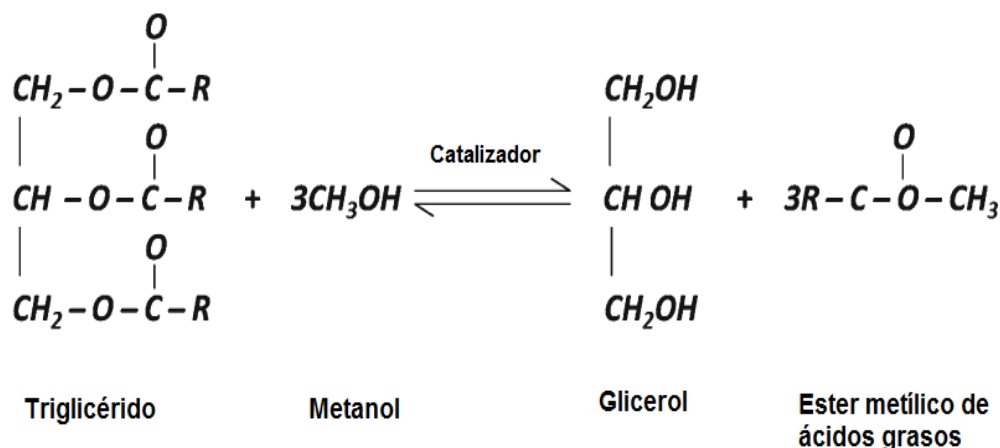


Figura 2. Reacción de transesterificación de triglicéridos para la producción de biodiesel (R es el grupo o cadena de ácidos grasos)

La figura 3 muestra un diagrama de flujo para la producción de biodiesel a partir de microalgas. El proceso empieza con la selección de la especie de microalga a utilizar, se establecen las condiciones de crecimiento y el sistema de cultivo, posteriormente se realiza la cosecha o separación de biomasa, obtenida la biomasa se procesa para extraer el aceite y se realiza la transesterificación para obtener el biodiesel (Mata et al., 2010).

Hasta la fecha no hay alguna especie de microalga que pueda decirse que es la mejor en términos de contenido de lípidos para la producción de biodiesel, sin embargo diatomeas y algas verdes son prometedoras (Garibay et al., 2009; Wiley et al., 2011; Fuentes, 2012).



Figura 3. producción de de microalgas

Diagrama de biodiesel a partir

2.2. Microalgas

Las microalgas son un conjunto heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares o multicelulares, localizados en diversos hábitats, tales como aguas marinas, dulces, salobres y residuales. Se presentan bajo un amplio rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes; son responsables de la producción del 50% del oxígeno y de la fijación del 50% del carbono en el planeta. Se estima que existen más de 100,000 especies (Garibay et al., 2009).

Se encuentran en diferentes formas, son típicamente pequeñas con un diámetro de 3 a 30 μm , constituidas por proteínas, carbohidratos y lípidos (Tabla 2) (Dermibas y Dermibas, 2010; Araujo et al., 2011).

Tabla 2. Composición química de las microalgas base seca (%)

Microalga	Proteína	Carbohidratos	Lípidos
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50–56	10–17	12–14
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	–	1.9
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8–18	21–52	16–40
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51–58	12–17	14–22
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2
<i>Spirogyra sp.</i>	6–20	33–64	11–21
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Euglena gracilis</i>	39–61	14–18	14–20
<i>Prymnesium parvum</i>	28–45	25–33	22–38
<i>Tetraselmis maculata</i>	52	15	3
<i>Porphyridium cruentum</i>	28–39	40–57	9–14
<i>Spirulina platensis</i>	46–63	8–14	4–9
<i>Spirulina maxima</i>	60–71	13–16	6–7
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11
<i>Anabaena cylindrica</i>	43–56	25–30	4–7

En la figura 4 se identifican los lípidos en una célula algal. Donde se observa que los fosfolípidos componen la membrana celular y los triglicéridos son almacenados en el cuerpo de la célula (Topf et al., 2012).

Los triglicéridos (TG) son lípidos neutrales y el principal componente de los aceites naturales, mientras que los fosfolípidos incluyen a los lípidos que contienen fósforo.

Los ácidos grasos son componentes de las membranas celulares, por lo tanto son necesarios para su desarrollo, pueden ser, monosaturados, polisaturados o saturados. Los ácidos grasos pueden estar unidos a otras moléculas, como triglicéridos o fosfolípidos, cuando no están unidos a otras moléculas son conocidos como ácidos grasos libres.

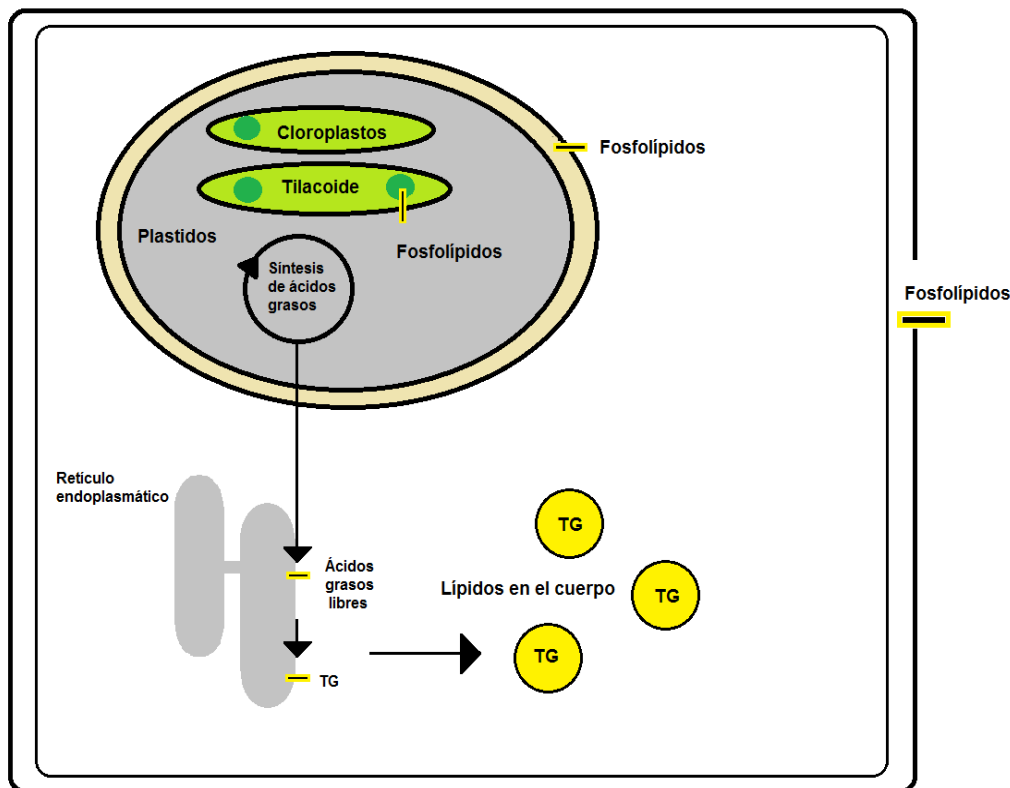


Figura 4. Localización de los lípidos en la célula algal

En la tabla 3 se muestran los principales usos de las diferentes clases de lípidos en la industria.

Tabla 3. Aplicaciones industriales de los componentes de los lípidos

Lípidos	Uso/función
Triglicéridos	Principal compuesto del aceite
Diglicéridos	Aditivo de alimentos: Efecto benéfico en desordenes de obesidad y peso
Monoglicéridos	Emulsificantes en la industria de alimentos
Ácidos grasos	Farmacéutica y alimentos industriales
Ésteres grasos	Principales constituyentes del biodiesel
Fosfolípidos	Emulsificantes, lubricantes y surfactantes

2.2.1. Clasificación

Las microalgas se clasifican de acuerdo al tipo de pigmento y morfología que posean, así como de las sustancias de reserva, generalmente se encuentran clasificadas como:

1. *Euglenofitas* son organismos unicelulares o coloniales con clorofila a y b, que no poseen pared celular, por ejemplo: *Euglena* y *Facus* (Bitton, 2005).
2. *Algas verdes* (clorofitas), estas algas contienen clorofila a y b, tienen la pared celular de celulosa, por ejemplo: *Clamydomonas*, *Gonium sociale*, *Pediastrum*, *Scenedesmus* y *Horidium*.
3. *Algas verde azules* (cianobacterias), son organismos procariotes fotosintéticos que poseen clorofila a, generalmente son organismos unicelulares, coloniales o filamentosos. Por ejemplo: *Anabaena*, *Anacystis*, *Oscillatoria*, *Nostoc* y *Agmenellum*.
4. *Algas doradas* (*Crisofitas*), estas algas poseen clorofila a y c, se caracterizan por contener silicio en su pared celular. Por ejemplo *diatomeas*, *Melosira*, *Cyclotella*, *Fragilaria* y *Navícula*.

2.2.2. Movilidad

Las microalgas pueden tener uno o más flagelos, en este último caso los flagelos pueden ser del mismo o diferente tamaños. Los flagelos se localizan generalmente en uno de los extremos de la célula. El número, el tamaño y la localización de los flagelos son características útiles para la identificación de microalgas. El flagelo les permite el movimiento en el agua.

La mayoría de las microalgas multicelulares carecen de movilidad. Algunas se encuentran ancladas en el cuerpo de agua donde habitan, y otras son arrastradas, por las olas o corrientes de agua, de un lugar a otro.

2.2.3. Reproducción

Los métodos de reproducción de las microalgas son la multiplicación vegetativa donde la célula se divide o se fragmenta, la asexual mediante la producción de una espora y la sexual por la unión de gametos.

En la reproducción vegetativa y asexual el microorganismo se divide en dos partes iguales, cada una con la misma información hereditaria. En algas unicelulares, la división puede ser longitudinal como por ejemplo la *Euglena* (Figura 5) o transversal.



Figura 5. División de celular de *Euglena* sp (Barsanti y Barsanti, 2006)

El proceso de reproducción asexual por medio de la esporulación es el más común en las microalgas. La esporulación o mitosis es el proceso mediante el cual las células producen una o más células reproductivas dentro de su pared celular. La célula original (madre) es llamada esporangio y la nueva o nuevas células son llamadas esporas, por ejemplo *Chlamydomonas* sp (Figura 6) (Barsanti y Barsanti, 2006).



Figura 6. Zoospora de *Chlamydomonas* sp. dentro de la pared celular

La reproducción sexual se lleva a cabo a través de la unión de las células sexuales, llamadas gametos, para combinar material nuclear antes de que surjan nuevas generaciones. La unión de los gametos forma el cigoto, posteriormente se divide por meiosis originando nuevas células (Figura 7) (Hammer, 1996; Ausdesirk y Ausdesirk, 1997).

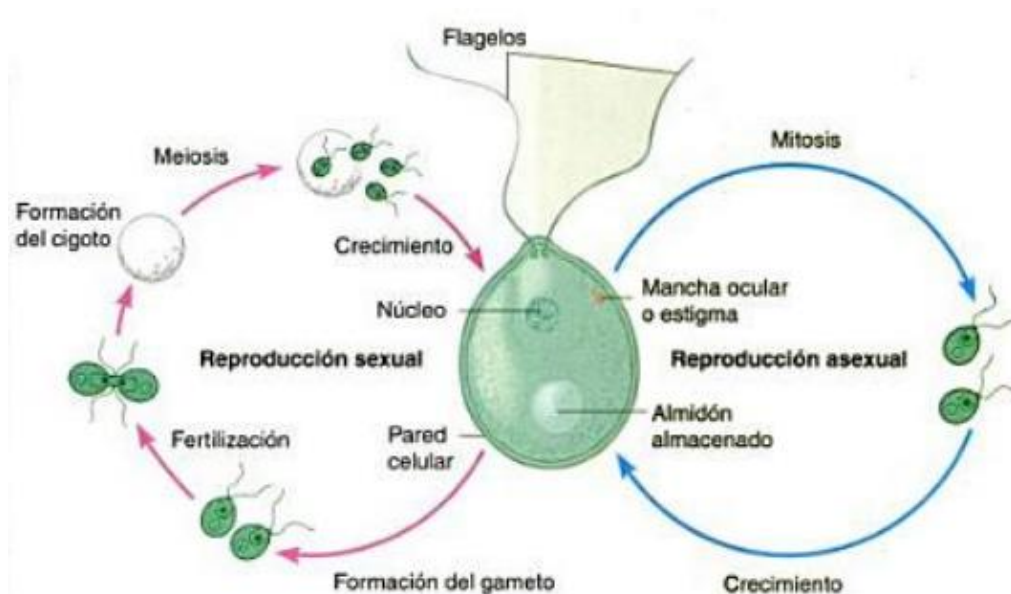


Figura 7. Reproducción sexual y asexual, característica principal de las *Chlamydomonas* sp

En promedio, las microalgas doblan su biomasa en 24 horas. Sin embargo, en fase exponencial algunas algas pueden doblar su biomasa en tiempos tan cortos como 3.5 horas (Brennan y Owende, 2010).

2.2.4. Condiciones de crecimiento

Existen varios factores que influyen en el crecimiento de las microalgas: factores abióticos como son la luz (cantidad y calidad), temperatura, concentración de nutrientes, dióxido de carbono, pH y salinidad; factores bióticos como las bacterias y competencia entre las microalgas.

1. Luz

Las microalgas son organismos fotosintéticos y sólo emplean la fracción del espectro de luz solar que es fotosintéticamente activa, entre 350 y 700 nm. El crecimiento de los microorganismos fotosintéticos es proporcional a la intensidad de la luz recibida.

2. Temperatura

Muchas microalgas pueden adaptarse fácilmente temperaturas superiores a 15°C, sin embargo a temperaturas menores a 4°C puede existir una pérdida total del cultivo.

3. Nutrientes

Los principales nutrientes minerales que éstas toman del medio y necesitan para su desarrollo son:

Carbono: Las microalgas pueden emplear como fuente de carbono el dióxido de carbono (CO_2) presente en la atmósfera, así como los iones bicarbonato (HCO_3^-). Algunos sistemas de cultivo inyectan aire enriquecido con dióxido de carbono.

Nitrógeno: el contenido en nitrógeno de la biomasa varía desde un 1% hasta más del 10%, depende de la disponibilidad y el tipo de fuente de nitrógeno. Las microalgas

pueden tomar nitrógeno del medio en forma de urea, amonio, nitrato, nitrito y nitrógeno gas.

Fósforo: es esencial en el crecimiento de las microalgas, mismas que consumen en forma de ortofosfatos.

Las microalgas pueden ser sometidas a estrés limitando los nutrientes para provocar una mayor acumulación de lípidos o proteínas (Khozin y Cohen, 2006; Rodolfi et al., 2009)

1. *Salinidad*

La salinidad del medio de cultivo tiene gran influencia tanto en el crecimiento como en la composición de las microalgas. Así como en su recolección.

2. *pH*

El pH en la mayoría de cultivos de microalgas se encuentra entre 7 y 9, con un óptimo entre 8.2–8.7. El control de pH se consigue mediante aireación o adición de CO₂. El proceso fotosintético de fijación de CO₂ provoca un aumento gradual de pH en el medio debido a la acumulación de radicales hidróxido (OH⁻).

2.3. **Sistemas de cultivo de microalgas**

Los sistemas empleados con mayor frecuencia en la producción de biomasa de microalgas son los de tipo abierto y cerrado. En los sistemas abiertos, a pesar de sus formas y diversos tamaños, ellos destacan por ser semejante al entorno natural de las microalgas. Los cultivos abiertos comprenden sistemas naturales (lagos, lagunas, estanques), artificiales, de superficie inclinada y estanques tipo circuito, estos últimos son los de mayor uso. En los sistemas cerrados o fotobioreactores la producción de biomasa se puede obtener en forma masiva (Bajhaiya et al., 2012).

2.3.1. Cultivos abiertos

Las lagunas abiertas son elipsoidales, con una separación central que permite formar canales poco profundos en forma de circuito cerrado; se mantienen en agitación mediante paletas giratorias y en ocasiones, cuentan con mecanismos para suministrar CO₂ y nutrientes. Las producciones factibles en estos sistemas son bajas, próximas a 1 g/L y 10-25 gm⁻²d⁻¹.

Las principales ventajas son: El bajo costo de construcción, de operación y de producción de biomasa. Sus desventajas son: Requieren de grandes áreas de terreno, presentan importantes pérdidas de agua por evaporación y de CO₂ por difusión a la atmósfera, reportan deficiente sistema de mezclado dando baja concentración celular, la cual a su vez, origina una baja productividad. Ésta última también resulta afectada por contaminación con otras algas y/o por organismos que se alimentan de las mismas (Hideroni, 2004).

A mediados de 1950 en Dortmund, Alemania se cultivó microalgas *Scenedesmus* y *Coelastrum* en un sistema abierto compuesto por cuatro lagunas tipo circuito de 80 m² (Figura 8), con el fin de producir proteínas de microalgas. La producción obtenida fue de 10 gm⁻²d⁻¹ y en los meses de verano de 30 gm⁻²d⁻¹ (Goldman, 1979).

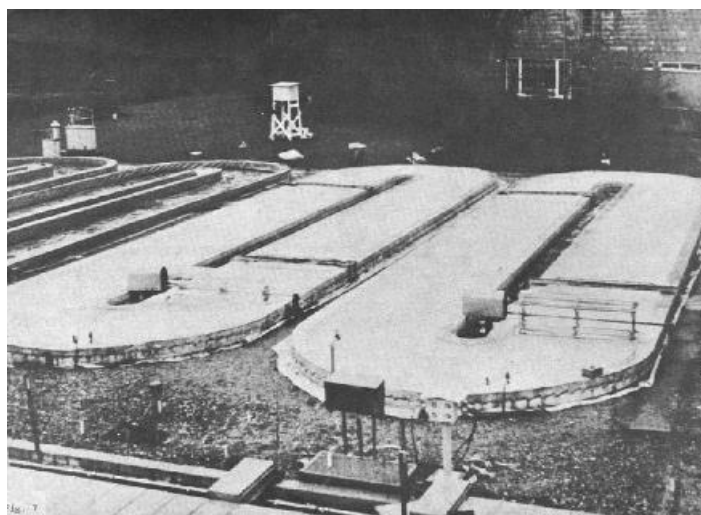


Figura 8. Cultivo abierto de microalgas en Dortmund, Alemania

2.3.2. Cultivos cerrados

Los fotobioreactores, son sistemas cerrados que permiten un control preciso de las condiciones de cultivo (Chisti, 2007; Ugwu et al., 2008), el cultivo de una sola especie, la obtención de una alta productividad de biomasa y evitan la contaminación (Molina et al., 1999; Petrusovski et al., 1995). Generalmente se obtiene una producción de 20 a 40 $\text{gm}^{-2}\text{d}^{-1}$ (Christenson y Sims, 2011).

La mayoría de los fotobioreactores expuestos a condiciones ambientales exteriores se caracterizan por tener grandes áreas de iluminación y desde este punto de vista, los tipo placa plana y los tubulares horizontales inclinados son los mejores (Figura 9) (Abdel-Raouf et al., 2012), excepto por la dificultad de escalamiento, mientras que los de columna de burbujeo y el tipo tanque agitado son de fácil escalamiento, pero tienen áreas de iluminación menores respecto al resto de los fotobioreactores (Ugwu et al., 2008).



Figura 9. Diseños de fotobioreactores cerrados: tubular horizontal (Abdel-Raouf et al., 2012) (imagen izquierda) y placa plana (Muñoz, 2013) (imagen derecha)

Actualmente, la principal desventaja de los sistemas cerrados consiste en sus elevados costos, atribuidos en mayor medida a la energía invertida en la agitación mecánica de los cultivos con la finalidad de evitar la sedimentación y favorecer la

transferencia de gases (Pulz y Scheibenbogen, 1998; Pulz, 2001; Carvalho et al., 2006; Chisti, 2008; Rittmann, 2008).

2.4. Cosecha de microalgas

Una vez que la biomasa de microalgas ha sido producida en alguno de los sistemas descritos, se da inicio a la etapa de cosecha o recolección, cuyo propósito es el de remover el agua y concentrar la biomasa compuesta por las células microalgales para su posterior procesamiento.

Los costos de la separación pueden contribuir del 20 al 30% en los costos de producción de biomasa algal (Molina et al., 2003), por lo que la selección de una técnica de recolección eficiente y de bajo costo es trascendental.

La filtración, centrifugación, floculación y flotación con aire disuelto, ya sea de forma individual o combinados, son los procedimientos de cosecha más comunes (Chen et al., 1998; Dismukes et al., 2008; Lee et al., 2009).

El método de cosecha depende de la especie, de la densidad celular y de las condiciones del medio de cultivo. Generalmente la densidad celular utilizada en la aplicación industrial se encuentra entre 0.3 y 5 g/L lo cual dificulta la separación y aumenta el costo (Wang et al., 2008).

En este trabajo de tesis se optó por emplear la técnica de ozoflotación para la separación de microalgas, debido a que esta técnica utiliza el ozono y la flotación para la separación eficiente de las microalgas.

2.4.1. Filtración

La filtración resulta conveniente para especies de microalgas grandes (> 70 micrones) como *Coelastrum* y *Spirulina*. No se puede utilizar para las especies de algas de

dimensiones menores a 30 micrones, como *Scenedesmus*, *Dunaliella* y *Chlorella* (Mohn, 1980), las cuales son capaces de formar colonias o son filamentosas. Cabe mencionar que esta operación a gran escala presenta inconvenientes tales como la obstrucción de los filtros, formación de tortas de filtración compresibles y altos costos de mantenimiento.

2.4.2. Centrifugación

La centrifugación es aplicable especialmente en el caso de las microalgas unicelulares con diámetros mayores a los 5 μm (Uduman et al. 2010). El proceso es rápido con una eficiencia de recolección superior al 95%. La recuperación de la biomasa depende de las características de sedimentación de las células y tiempo de residencia (Molina et al., 2003). La desventaja de este proceso es que consume grandes cantidades de energía, 3000 kWh son consumidos para recuperar una tonelada de biomasa seca (Wiley et al., 2011).

2.4.3. Floculación

La floculación es otro procedimiento común de cosecha, el cual es usado para agregar las microalgas incrementando el tamaño de las partículas y sedimenten fácilmente, mediante la adición de sales inorgánicas (alúmina, cloruro férrico, óxido de calcio) (Molina et al. 2003). Sin embargo, no es muy recomendada por la contaminación de la biomasa, de tal manera que ésta no puede ser utilizada posteriormente. El uso de polímeros orgánicos catiónicos como floculantes no presenta estos inconvenientes, pero son poco eficientes.

2.4.4. Flotación con aire disuelto

La flotación con aire disuelto (FAD) es una alternativa para la remoción de microalgas, este proceso generalmente va acompañado con la adición de un floculante para que

las microalgas formen floculos, y en lugar de que los floculos sedimenten estos serán unidos a las microburbujas que son introducidas en el proceso de floculación. Algunas microalgas de forma natural flotan en la superficie del agua por el aumento del contenido en lípidos.

2.4.5. Ozoflotación

Los estudios realizados que se tienen en la aplicación del ozono para la recuperación de microalgas por el proceso conocido como ozoflotación es aun limitado (Tabla 4). El proceso de ozoflotación es una combinación de las propiedades de oxidación del ozono y los principios físicos de la flotación. El ozono generalmente ha sido utilizado como oxidante y desinfectante en el tratamiento de agua residual (Ho et al., 2008).

En 1980, Betzer y colaboradores, observaron por primera vez la separación de microalgas por flotación inducida con ozono, a partir de un efluente de lagunas de oxidación. Utilizaron una columna de vidrio con un diámetro interno (\emptyset i) de 9.5 cm, altura (h) de 125 cm y un difusor de vidrio poroso con diámetro de poro de 30-60 μ m colocado en el fondo de la columna. La dosis de ozono aplicada fue de 15 a 50 mg/L. Obteniendo las siguientes conclusiones:

1. La completa separación de las algas es obtenida sin la necesidad de adicionar un agente químico, dejando solo como residuo agua con oxígeno.
2. La espuma de algas puede espesarse por gravedad para formar un denso, puro y valioso producto.

Benoufella et al., (1994) experimentaron el proceso de ozoflotación como un pre tratamiento, seguido de la coagulación floculación y filtración, con el fin de disminuir la cantidad de *Microcystis aeruginosa* (cianobacteria) presente en agua cruda a nivel piloto. Diferentes dosis de ozono fueron aplicadas (0.055, 0.55, 1.1 y 2 mg/L), obteniendo como resultado un daño en las células algales así como una pérdida de clorofila. Además de mejorar la floculación.

Tabla 4. Estudios de separación de microalgas por ozoflotación

Suspensión de microalgas	Equipo	Condiciones de operación	Efecto resultante	Referencia
Algas muestra obtenida del efluente de una laguna de oxidación.	Reactor: h: 125 cm Øi: 9.5 cm Difusor: 30-60 µm de poro	V: 5.0-7.5 L de muestra TRH: 20 min Qgas: 2.0-4.0 L/min Pgas: 0.5 kg/cm ² Dosis de ozono: 15 a 50 mg/L	Líquido incoloro 98% de remoción de sólidos suspendidos o algas	Betzer et al. 1980
Alga: <i>Microcystis aeruginosa</i> Cultivada	Planta piloto	Qgas: 1.5 a 5 L/h Pgas: 0.5 kg/cm ² Dosis de ozono: 0.055, 0.55, 1.1 y 2 mg/L Alga: 10 ⁸ -10 ¹⁰ algas/L Tiempo: 60 min	Reducción de turbiedad Reducción de algas	Benoufella et al. 1994
Alga: <i>Chlorella vulgaris</i> Se obtuvo la cepa de agua dulce del sur de Taiwan y se cultivó	Reactor: H: 47 cm Øi: 5 cm Difusor: 30 - 60 µm de poro	Qgas: 0.6 L/min Pgas: 0.65 kg/cm ² Dosis de ozono: 0.005-0.03 mg/mg de biomasa.	Reducción de turbiedad de 98% Células aglomeradas de aprox. de 50 µm	Cheng et al. 2010
Alga: <i>Scenedesmus obliquus</i> FSP-3 Se obtuvo la cepa de agua dulce del sur de Taiwan y se cultivó.	Reactor: H: 47 cm Øi: 5 cm Difusor: 30-60 µm de poro	Qgas: 0.6 L/min Pgas: 0.65 kg/cm ² Dosis de ozono: 0.2-0.5 mg/mg de biomasa [O ₃]: 63 mg/L [O ₃]: 98 mg/L [O ₃]: 135 mg/L Turbiedad: 1000,400,240 UTN Tiempo: 4 min	Reducción de turbiedad de 95% Células aglomeradas de 10-30 µm.	Cheng et al. 2011

Langlais et al., (1991) describieron la aplicación del proceso de ozoflotación como un pretratamiento para la remoción de microalgas de agua cruda en la planta de tratamiento Saint Blaise (Autun, Francia). Usando la unidad de operación mostrada en la figura 10.

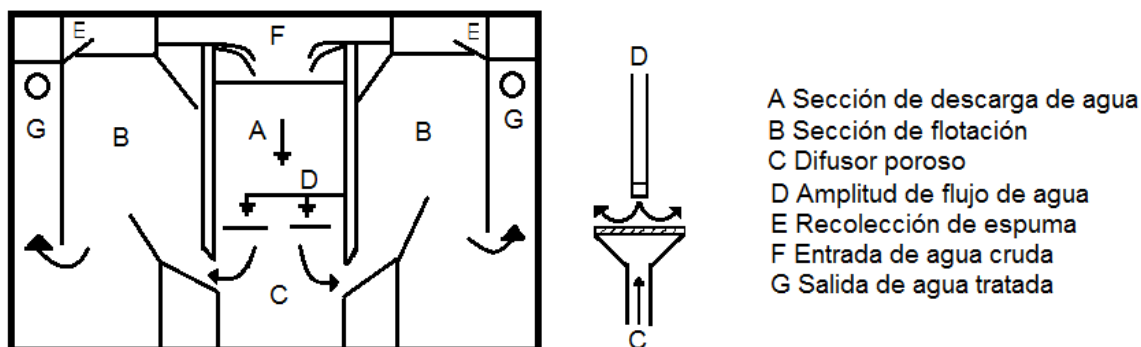


Figura 10. Unidad para el proceso de ozoflotación (Langlais et al., 1991)

La unidad está compuesta por dos secciones:

- Sección A: ozonación
- sección B: flotación

En la sección A el sistema opera a contracorriente. El flujo de agua es dirigido de la parte superior a la inferior, mientras el ozono es difundido por un platillo poroso localizado en el fondo de la sección. Cuando el ozono pasa a través del difusor y entra en contacto con el agua, se forman pequeñas burbujas que son inducidas a entrar a la sección B. En esta sección las burbujas se adhieren a las partículas suspendidas (microalgas) separándolas del líquido.

En la primavera de 1987 y 1988, la planta Saint Blaise trataba un caudal de 220 m³/h, el cual presentaba un florecimiento de microalgas, por tal motivo fue sometido a un tren de tratamiento, utilizaron el proceso de ozoflotación como un pretratamiento, aplicando una concentración de ozono en fase gas entre 45 y 50 gO₃/L, seguido de una floculación, filtración y desinfección. Dado como resultado 98% y 69% de remoción

de microalgas respectivamente. Además de mostrar una disminución de turbiedad y color.

Recientemente Cheng et al., (2010) evaluaron el proceso de ozoflotación para la recuperación de *Chlorella vulgaris* en un reactor de 45 cm de altura y 5 cm de diámetro interno, encontraron que con una dosis de ozono aplicada menor a 0.05 mg/g biomasa era suficiente para la separación de microalgas por ozoflotación, obteniendo como resultado inmediato una disminución de la turbiedad del 98%. Mientras que en 2011 separaron *Scenedesmus obliquus* FSP-3 obteniendo un 95% de disminución de turbiedad con una dosis de ozono aplicada entre 0.3 y 0.5 mg/g de biomasa, recuperando las microalgas en la espuma formada, debido a la liberación de proteínas que permiten la efectiva flotación.

El proceso de ozoflotación para la recuperación de microalgas combina la floculación y flotación en una sola etapa del tratamiento, siendo esta su principal ventaja, debido a que no contamina la biomasa recuperada y no requiere la adición de un coagulante.

Efecto del ozono en las microalgas

El ozono, como cualquier otro oxidante (dióxido de cloro) tiene un efecto letal sobre las microalgas o limita su crecimiento (Langlais et al., 1991). Sin embargo bajo ciertas condiciones, se puede lograr solo un daño celular que permita la liberación de biopolímeros (por ejemplo: proteínas y polisacáridos) que actúan como surfactantes naturales. La liberación de surfactantes poliméricos naturales se presentan como la formación de espuma en las cámaras de contacto, a su vez la espuma concentra a las microalgas. Dando como resultado una separación de las microalgas del medio líquido. En la figura 11 se muestra un esquema de la reacción del ozono con la microalga.

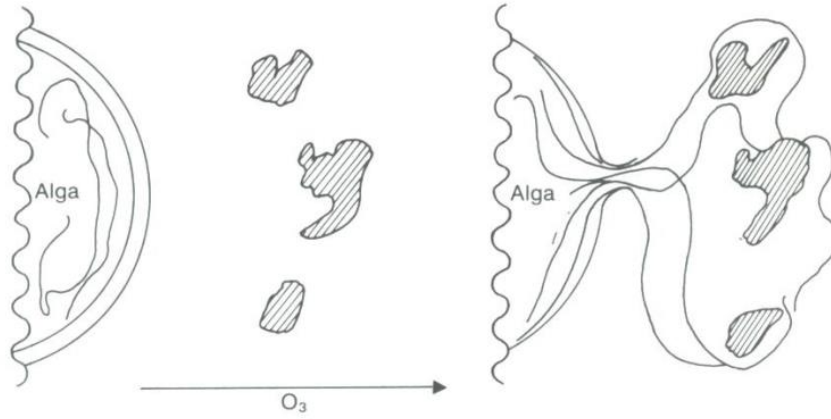


Figura 11. Reacción del ozono con alga (Langlais et al., 1991)

3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La metodología experimental que se siguió en este trabajo se dividió en cinco etapas:

1. Muestreo y caracterización fisicoquímica del agua con microalgas en diferentes épocas del año (fría y cálida)
2. Identificación de los géneros de microalgas presentes en el lago Nabor Carrillo así como en las lagunas facultativas del ex lago de Texcoco
3. Implementación de un reactor para el proceso de ozoflotación a escala laboratorio
4. Pruebas experimentales de separación de microalgas por ozoflotación siguiendo un diseño de experimentos factorial 3^3
5. Extracción y conversión de lípidos a ésteres metílicos de ácidos grasos de la biomasa recolectada con el proceso de ozoflotación

3.1. Muestreo y caracterización del agua residual tratada

3.1.1. Recolección de agua residual

La recolección de muestras en la zona del ex lago de Texcoco se realizó en las lagunas facultativas, específicamente en la laguna terciaria y en el lago artificial Nabor Carrillo. Las muestras se recolectaron considerando las normas NMX-AA-014-1980 “Cuerpos receptores-muestreo” y NMX-AA-003-1980 “Agua residual-muestreo”.

Se muestrearon volúmenes de 20 L de agua ambos cuerpos, durante época fría (Octubre a Enero) y época cálida (Marzo a Julio), cada quince días.

3.1.2. Parámetros fisicoquímicos

La caracterización fisicoquímica de las muestras de agua recolectadas, comprendieron la temperatura, pH, ortofosfatos, nitratos y conductividad parámetros que influyen en el desarrollo de las microalgas, mientras que la turbiedad, sólidos suspendidos totales y concentración de microalgas fueron parámetros de control en el proceso de ozoflotación. Los métodos analíticos utilizados se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos determinados en muestras de agua

Parámetro	Método analítico
Temperatura	Método visual (Medidor portátil)
pH	Método 4500 HB
Ortofosfatos	Método 8178 Hach
Nitratos	Método 8039 Hach
Turbiedad	*Método 2130 B
Conductividad eléctrica	*Método 2510 B
Sólidos suspendidos totales	Método gravimétrico
Concentración de microalgas	Método directo (cámara de Neubauer)

*APHA, AWWA y WPCF (1992)

3.2. Identificación de microalgas

La identificación de microalgas se llevó a cabo colocando una gota de la suspensión de microalgas recolectadas en un portaobjetos, el cual se colocó en la platina del microscopio de epifluorescencia (Zeiss Axioskop 2) para observar la morfología y características que presentan, posteriormente las características encontradas son comparadas con las claves taxonómicas de microalgas, descritas en los métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales (APHA et al., 1992) para definir el género de microalga.

3.3. Ozoflotación de microalgas

El objetivo de estas pruebas fue determinar las condiciones de operación: tiempo de ozonación, flujo y concentración de ozono a las que debe de operar el sistema de ozoflotación para llevar a cabo la separación de microalgas, utilizando un diseño experimental factorial.

3.3.1. Diseño experimental

Las pruebas de laboratorio se realizaron con base en un diseño de experimentos, integrado por dos tipos de variables: de respuesta e independientes. Donde, las variables de respuesta son número de microalgas/ml, la turbiedad y los sólidos suspendidos totales (SST). Las variables independientes del experimento, también llamados “factores” fueron: el tiempo de ozonación, la concentración de ozono y flujo de ozono, cada uno con tres niveles (bajo, medio y alto) codificados como -1, 0 y 1 respectivamente. Así se generó el diseño de experimental factorial 3^3 , el cual mostro un total de 27 experimentos con 2 réplicas, la matriz del diseño factorial se presenta en la tabla 6 con los niveles codificados y valores reales.

La ecuación general del modelo matemático es:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{1,2}x_1x_2 + b_{1,3}x_1x_3 \quad \text{Ec. 1}$$

En la ecuación 1 y representa la variable de respuesta (turbiedad, sólidos suspendidos y numero de microalgas), las variables independientes: tiempo de ozonación (x_1), concentración de ozono en fase gas (x_2) y flujo de ozono (x_3), mientras que $b_0 \dots b_{1, 2, 3}$ son los coeficientes de las variables independientes.

Mediante el empleo del software estadístico STATGRAPHIC Centurion XV, se calcularon las combinaciones de los niveles, para la máxima recolección de microalgas, sólidos suspendidos totales y turbiedad.

Tabla 6. Matriz del diseño experimental con las condiciones codificadas y reales

No. de experimento	Variables (Valores codificados)			Variables (Valores reales)		
	x ₁	x ₂	x ₃	Flujo de ozono (L/min)	Tiempo (min)	Concentración de ozono (mg/L)
1	-1	-1	-1	0.2	5	25
2	-1	-1	0	0.2	5	35
3	0	0	-1	0.4	10	25
4	-1	1	1	0.2	15	45
5	-1	0	-1	0.2	10	25
6	-1	0	1	0.2	10	45
7	1	0	1	0.6	10	45
8	-1	1	0	0.2	15	35
9	-1	-1	1	0.2	5	45
10	-1	0	0	0.2	10	35
11	0	0	1	0.4	10	45
12	1	0	-1	0.6	10	25
13	0	-1	0	0.4	5	35
14	1	1	0	0.6	15	35
15	-1	1	-1	0.2	15	25
16	1	0	0	0.6	10	35
17	0	-1	1	0.4	5	45
18	0	1	1	0.4	15	45
19	1	1	1	0.6	15	45
20	1	-1	-1	0.6	5	25
21	0	1	0	0.4	15	35
22	0	-1	-1	0.4	5	25
23	1	-1	0	0.6	5	35
24	1	-1	1	0.6	5	45
25	0	0	0	0.4	10	35
26	1	1	-1	0.6	15	25
27	0	1	-1	0.4	15	25

3.3.2. Arreglo experimental del sistema de ozoflotación

El arreglo experimental utilizado en las pruebas de ozoflotación es un sistema en línea compuesto por (Figura 12):

- 1) Separador de aire: Extrae el aire y separa el oxígeno de los demás gases, obteniendo una corriente de aire enriquecido con oxígeno de un 21% pasa a un 81% aproximadamente.
- 2) Generador de ozono (Emery Trailigaz Labo 76): De acuerdo a lo anterior, el aire enriquecido con oxígeno pasa al generador, el cual por medio de una descarga eléctrica genera el ozono, este generador tiene una capacidad de producción de 19 g O₃/h.
- 3) Rotámetro: Mide la cantidad de flujo de ozono que se está suministrando (L/min).
- 4) Destructor catalítico: Elimina las trazas de ozono que no reaccionaron en el reactor o que no fueron atrapadas por los lavadores de gases, para su disposición segura al medio ambiente.
- 5) Lavador de gases: Se utilizan dos lavadores, uno para contener la solución de KI al 2% donde el ozono que no es transferido o que no reacciona es eliminado en su totalidad, y otro para la recolección de biomasa microalgal.
- 6) Unidad de contacto: Reactor implementado para la interacción de las microalgas presentes en el agua con el ozono, fue de vidrio con una geometría cilíndrica. Las dimensiones del reactor utilizado son: altura de 67 cm, diámetro interno de 4.9 cm, diámetro externo de 5.4 cm, con una capacidad de 1.3 L y consta de 3 puertos de muestreo a 20 cm, 40 cm y 50 cm a partir de la base. En el fondo de la columna se encuentra colocado un difusor poroso de vidrio de 30 a 60 μm de diámetro de poro por el cual es alimentado el ozono.

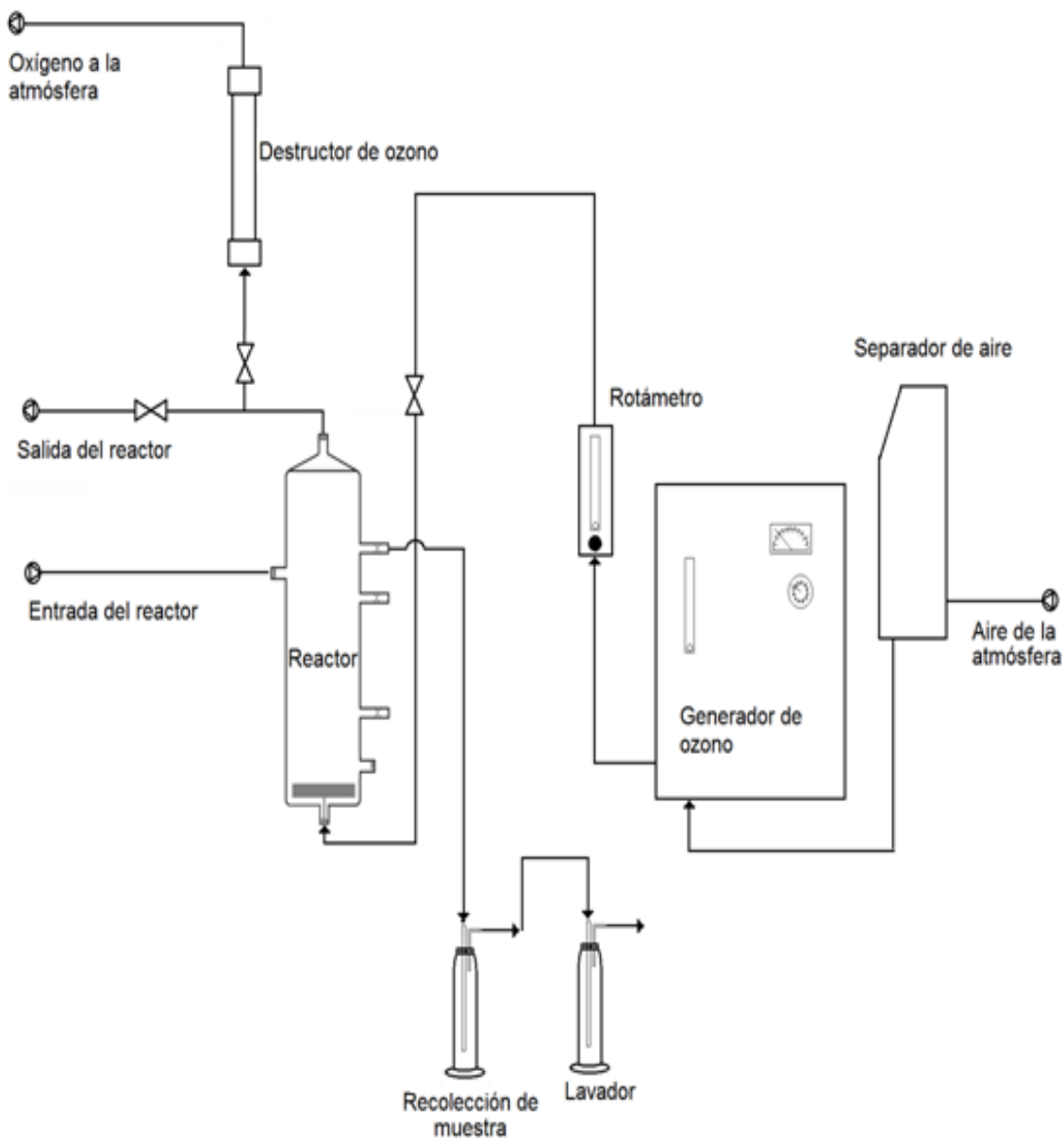


Figura 12. Diagrama del sistema experimental para ozoflotación de microalgas

3.3.3. Cosecha de microalgas por ozoflotación

Las pruebas experimentales de ozoflotación de microalgas consistieron en:

- 1) Homogenizar la suspensión de microalgas del bidón y medir la concentración de microalgas (en número de microalgas por mL de agua), turbiedad y sólidos suspendidos totales.

- 2) Establecer las condiciones de operación: concentración de ozono, flujo de ozono y tiempo de ozonación como lo indica el diseño de experimentos,
- 3) Tomar una muestra de 950 ml y colocarla en el reactor.
- 4) Llevar a cabo la ozoflotación.
- 5) Medir los parámetros de respuesta al final de la ozoflotación.
- 6) Repetir el proceso hasta concluir con las condiciones establecidas por el diseño de experimentos.

Todos los experimentos fueron desarrollados a temperatura ambiente y por lote. Como producto de interés del proceso, se tiene la concentración de las microalgas en la espuma formada (Figura 13).

La concentración inicial y final del ozono en fase gas se determinó utilizando el método yodometrico (Anexo A).



Figura 13. Formación de espuma

La figura 14 muestra el desarrollo de una prueba de ozoflotación con microalgas del lago Nabor Carrillo, en el cual se observa la concentración de microalgas en la espuma formada a través del tiempo de ozonación.

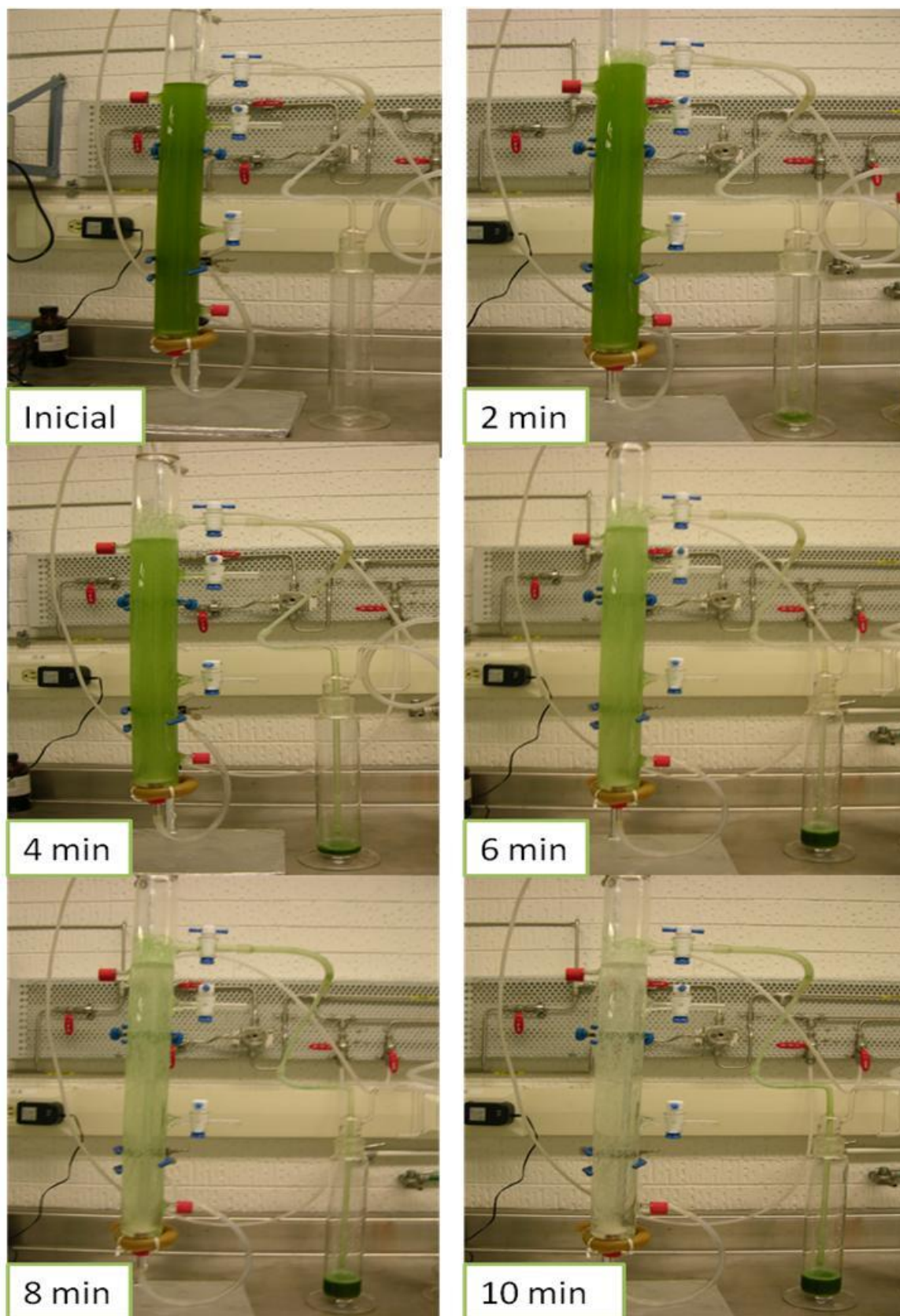


Figura 14. Desarrollo de una prueba de ozoflotación de microalgas

3.4. Secado de biomasa

Se realizaron 30 pruebas de ozoflotación con diferentes dosis de ozono aplicada (22.1 mg O₃/Lagua, 51.6 mg O₃/Lagua, 63.2 mg O₃/Lagua y 94.7 mg O₃/Lagua y 142.1 mg O₃/Lagua). Se obtuvo un concentrado de microalgas recolectado en la espuma formada por el proceso de ozoflotación. La concentración de biomasa microalgal en la espuma recolectada se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 minutos en una centrifuga (Beckman modelo J2-21), posteriormente la pastilla concentrada se congeló con hielo seco a -70 °C para ser sometida a una liofilización (Liofilizadora LABCONCO Free Zone 4.5), bajo una presión de vacío de 0.180 mbar por 24 hrs con el fin de obtener la biomasa seca.

3.5. Extracción de lípidos

El contenido de lípidos fue medido utilizando el método Bligh & Dyer, el cual consiste en secar 0.5 g de biomasa liofilizada en una balanza de humedad (OHAUS MB45) a 60°C hasta obtener peso constante. La biomasa seca se mezcló con 22.5 ml de una solución metanol y cloroformo (1:2 v/v) en un matraz Erlenmeyer, el matraz es tapado y colocado en el refrigerador durante una noche, posteriormente la muestra es filtrada utilizando un filtro Whatman de 70 mm de diámetro, la muestra es transferida a un matraz limpio y se agrega una solución de cloruro de potasio (0.88%) en un 25% del peso inicial. La solución es mezclada, en la cual se forman dos fases, la capa superior fue removida usando una pipeta Pasteur. La capa inferior de la mezcla fue transferida en un tubo de centrifuga limpio pesado. Los solventes fueron removidos por evaporación a temperatura ambiente en una campana de extracción por varios días hasta obtener peso constante. El contenido de lípidos fue obtenido por diferencia del tubo a peso constante menos el tubo pesado limpio.

3.6. Transesterificación in situ

La identificación de ésteres metílicos de ácidos grasos fue determinada usando la transesterificación in situ descrita por Garcés y Mancha (1993). Una mezcla de solventes fue preparada con metanol:tolueno:2,2-dimetoxipropano:ácido sulfúrico (39:20:5:2 por volumen), la mezcla de solventes (3.3 mL) fue combinada con heptano (1.7 mL) y agregada a 0.2 g de microalgas seca seguida de una vigorosa agitación, posteriormente se incubó a 80°C por 2 h (incubadora IKA KS 4000). La muestra se enfrió y la capa superior formada fue separada, se analizó usando un cromatógrafo de gases (CG, Hewlett Packard 5890 Serie II) bajo las siguientes condiciones: corriente de helio de 7 psi, presión de aire 32 psi, presión de hidrógeno 22 psi, una columna de capilaridad fue usada con una presión de calentamiento de 4.5 psi. Una muestra de 250 mg de la capa superior fue mezclada con 250 µL de la solución estándar (C17:0 sigma Aldrich 51 633, 10 mg/mL) en un vial de 2 mL. 5 µL de la mezcla (muestra con estándar) fue inyectado al cromatógrafo de gases y los datos fueron colectados en el software DataApex Clarity. La concentración de FAME es expresada como una fracción de masa en porcentaje del total del peso de la muestra.

3.7. Clases de lípidos

En la tabla 7 se muestra los solventes utilizados así como las cantidades que se requieren para la separación de lípidos en sus diferentes clases, la determinación se basa en la metodología de Kaluzny et al., 1985.

En la figura 15 se muestra una representación esquemática del proceso, el cual consiste en una serie de diluciones donde el solvente o mezcla de solventes aplicados extraen los lípidos deseados.

Tabla 7. Solventes para la extracción de clases de lípidos

Nombre	Solventes	Cantidad
A	Cloroformo-2-propanol 2: 1	4 mL
B	2% Ácido acético en dietil eter	4 mL
C	Metanol	4 mL
D	Hexano	4 mL
E	1% Dietil eter, 10% cloruro de metileno y hexano	6 mL
F	5% acetato de etilo y hexano	8 mL + 4 mL
G	15% acetato de etilo y hexano	4 mL
H	Cloroformo-metanol 2:1	4 mL

10 mg de la mezcla de lípidos fueron secados con nitrógeno y fueron disueltos en un volumen mínimo de cloroformo (<0.5 mL). Una columna de aminopropil (500 mg) fue colocada en el equipo Vac Elut, se lavo dos veces con 2 mL de hexano a una presión de vacío de aproximadamente 10 kPa. El vacío fue liberado después de la segunda lavada de hexano para prevenir que la columna llegara a estar completamente seca.

La mezcla de lípidos con cloroformo fue colocada en la columna bajo vacío, el cloroformo fue recolectado en el tubo de ensaye del equipo y los lípidos son retenidos en la columna de aminopropil. La columna fue lavada con 4 mL del solvente A. Esta dilución fue guardada ya que contiene a los lípidos neutrales (I). Una serie de tubos fue colocada en la gradilla del equipo rotulada con los nombres de los solventes previamente.

La columna fue diluida con 4 mL del solvente B, la dilución contiene a los ácidos grasos libres (II). Esta columna fue diluida con 4 mL de solvente C y la dilución fue guardada (III) ya que representan lo fosfolípidos (PL).

La dilución I fue secada con una corriente de nitrógeno y reconstruida con 0.2 mL de hexano. Una columna de aminopropil limpia fue colocada en el equipo Vact Elut y la dilución I en hexano fue colocada en la columna, 5 mL del solvente D fueron colocadas en la columna y la dilución (IV, ésteres de colesterol (CE)) fue guardada.

Una nueva columna de aminopropil fue empacada con la columna existente, 6 mL del solvente E fueron colocados en ambas columna y la dilución fue guardada (V, triglicéridos (TG)). Las columnas empacadas fueron diluidas con 12 mL de solvente F, la dilución fue guardada (VI, colesterol (C)).

Las columnas fueron separadas, la columna superior fue diluida con 4 mL del solvente G seguida de 4 mL del solvente H, las diluciones son guardadas (VII, diglicéridos (DG) y VIII, monoglicéridos (MG)).

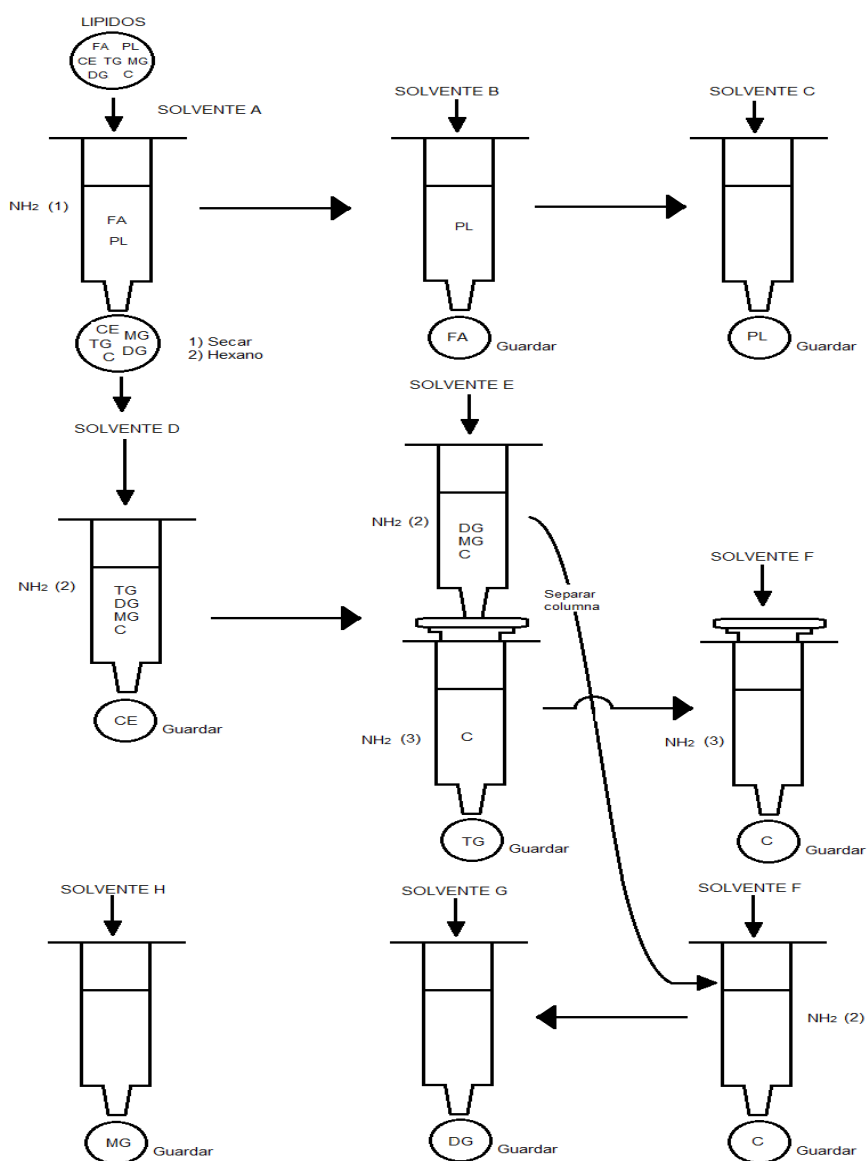


Figura 15. Representación esquemática del proceso para aislar clases de lípidos

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización del agua residual tratada

Las características fisicoquímicas del agua utilizada en las pruebas se muestran en la tabla 8. La presencia de nutrientes nitrógeno, como nitratos y fósforo como ortofosfatos, además de la temperatura explican la presencia de las microalgas. El efecto que causa en el agua son elevado pH por la actividad fotosintética que realizan, así como un aumento en la turbiedad y los sólidos suspendidos totales.

Tabla 8. Caracterización del agua del ex lago de Texcoco

Parámetros	Época cálida		Época fría	
	Laguna facultativa	Lago Nabor Carrillo	Laguna facultativa	Lago Nabor Carrillo
pH (unidades de pH)	8.80 ± 0.89	9.54 ± 0.42	8.69 ± 0.45	8.55 ± 0.62
T(°C)	21.45 ± 1.91	21.00 ± 0.99	18.95 ± 3.89	18.65 ± 3.04
Turbiedad (UTN)	399.00 ± 8.49	712.50 ± 46.59	285 ± 20.62	447.50 ± 18.70
Conductividad (mS/cm)	2.06 ± 0.02	4.84 ± 0.11	2.04 ± 0.11	3.10 ± 0.45
Nitratos (mg/L)	0.81 ± 0.30	0.67 ± 0.52	0.6 ± 0.28	0.55 ± 0.49
Ortofosfatos(mg/L)	50 ± 39.59	42 ± 35.36	50 ± 42.43	50 ± 45.25
Sólidos suspendidos totales (mg/L)	343.50 ± 15.61	419 ± 23.00	271.50 ± 10.36	388.5 ± 19.70
Microalgas(células/mL)	1.79x10 ⁵ ± 0.93	2.15x10 ⁵ ± 1.24	1.88x10 ⁵ ± 0.37	1.40x10 ⁵ ± 1.17

4.2. Identificación de microalgas

La presencia de microalgas en las lagunas facultativas y lago Nabor Carrillo dan un color verde al agua. En la figura 16 se muestran fotografías tomadas al microscopio de las microalgas identificadas tanto en lago Nabor Carrillo como en las lagunas facultativas, siendo estas: a) *Anabaena* sp., b) *Desmodesmus* sp., c) *Actinastrum* sp., d) *Nitzschia* sp., e) *Scenedesmus* sp., f) *Microcystis* sp., g) *Cyclotella* sp., h) *Arthospira* sp., i) *Merismopedia* sp., j) *Coelastrum* sp., k) *Scenedesmus* sp., l) *Spirulina* sp., m) *Desmodesmus* sp., n) *Anabaena* sp., o) *Chlamydomonas* sp., p) *Euglena* sp., q) *Chlorella* sp., r) *Oscillatoria* sp., s) *Phacus*, t) *Diatomea*, u) *Phacus*, v) *Pseudopediastrum boryanum* y w) *Desmodesmus* sp. Se identificaron un total de 18 géneros de microalgas.

Algunos géneros de microalgas identificados en este estudio, han sido estudiados en el tratamiento de agua residual como *Anabaena*, *Spirulina*, *Chlamydomonas*, *Chlorella* y *Phormidium* (Hoffmann, 1998). Sin embargo, Chinnasamy et al., 2010 evaluaron el uso de agua residual municipal e industrial para cultivar microalgas con el fin de obtener biodiesel, encontraron 15 géneros de microalgas con una producción de biomasa de 9.2-17.8 tons ha⁻¹año⁻¹.

La planta de lagunas facultativas presentó un consorcio integrado por *Scenedesmus* sp., *Diatomea*, *Euglena* sp., *Merismopedia* sp., *Chlorella* sp., *Pseudopediastrum boryanum*, *Cyclotella* sp, *Anabaena* sp, *Arthospira* sp y *Oscillatoria* sp. Siendo *Scenedesmus* sp. el género dominante en el época cálida (Figura 17) y para la época fría predomina el género *Oscillatoria* sp.

En el consorcio de microalgas del lago Nabor dominaron *Oscillatoria* sp. y *Cyclotella* sp. en la época cálida principalmente y *Oscillatoria* sp. en época fría (Figura 18). El “bloom” de microalgas se dió en el lago Nabor Carrillo en la época cálida.

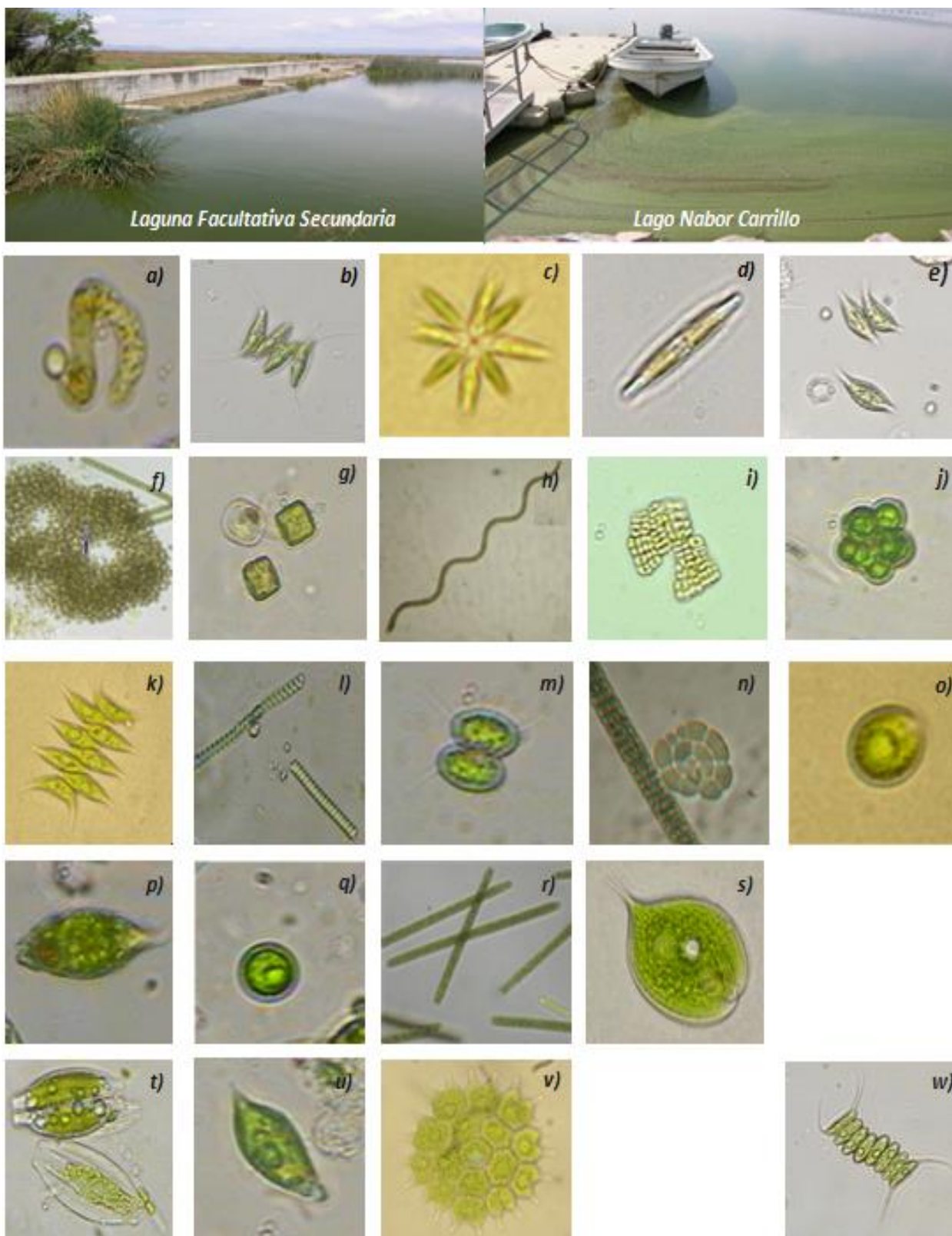


Figura 16. Fotografías de microalgas en las lagunas facultativas y lago Nabor Carrillo. Donde a) *Anabaena* sp., b) *Desmodesmus* sp., c) *Actinastrum* sp., d) *Nitzschia* sp., e)

Scenedesmus sp., f) *Microcystis* sp., g) *Cyclotella* sp., h) *Arthrospira* sp., i) *Merismopedia* sp., j) *Coelastrum* sp., k) *Scenedesmus* sp., l) *Spirulina* sp., m) *Desmodesmus* sp., n) *Anabaena* sp., o) *Chlamydomonas* sp., p) *Euglena* sp., q) *Chlorella* sp., r) *Oscillatoria* sp., s) *Phacus*, t) *Diatomea*, u) *Phacus*, v) *Pseudopediastrum boryanum* y w) *Desmodesmus* sp.

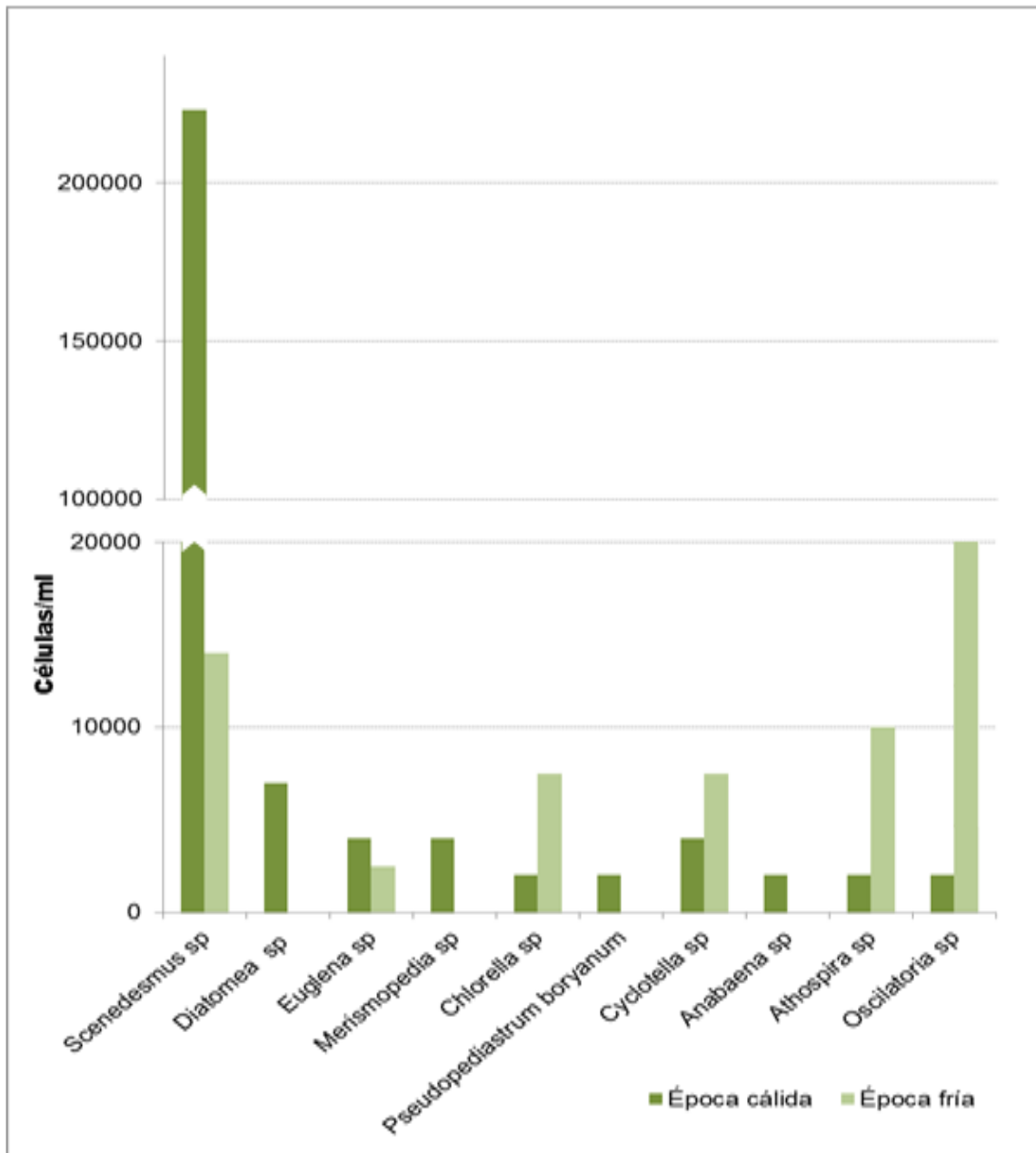


Figura 17. Microalgas en lagunas facultativas

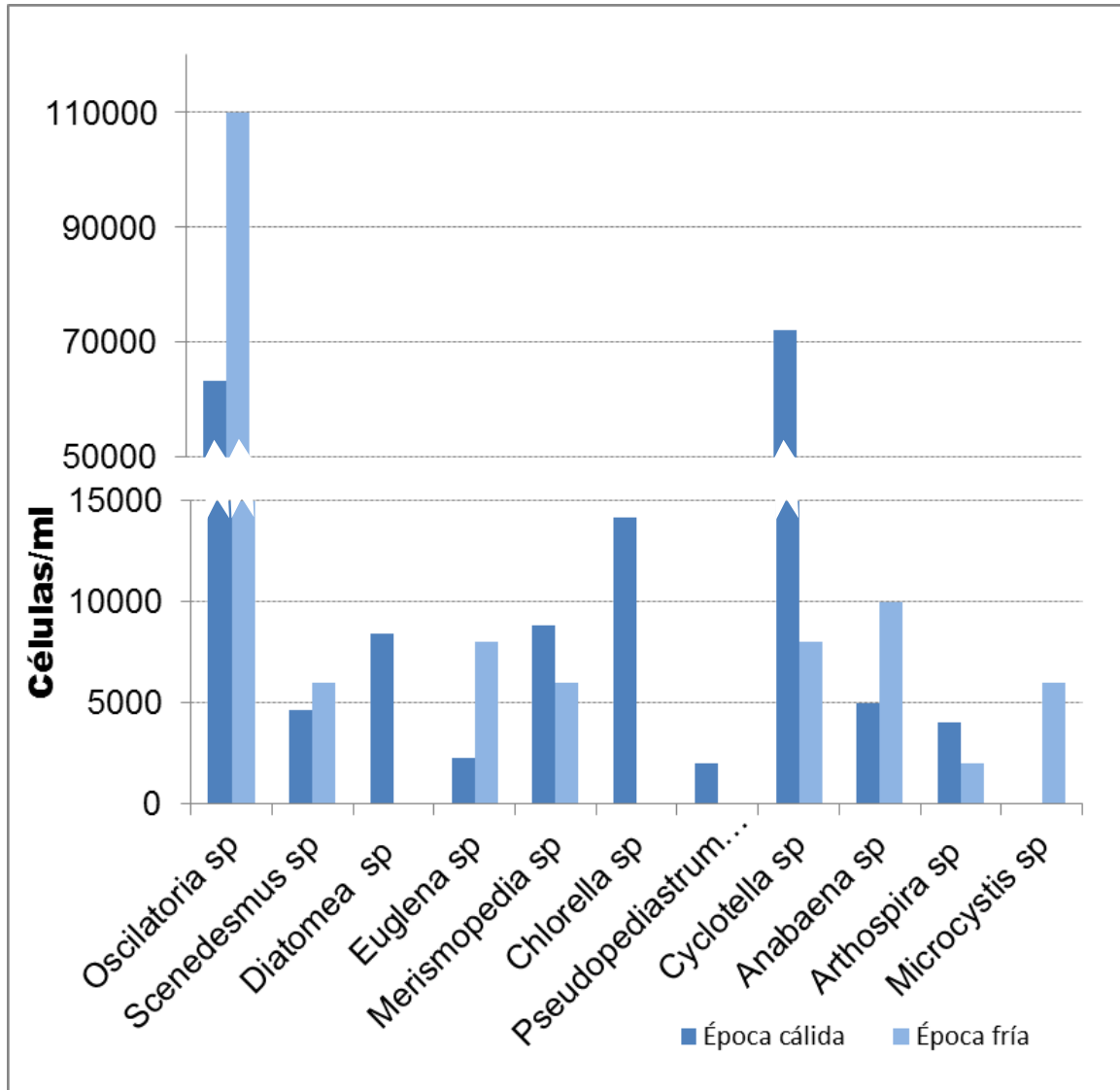


Figura 18. Microalgas en el lago Nabor Carrillo

En la actualidad, varios investigadores han encontrado que las algas verdes son precursoras de biodiesel, específicamente *Chlorella*. Li et al., 2011 cultivaron *Chlorella* sp en agua residual municipal para la producción de biodiesel y obtuvieron 0.92 g de microalga L⁻¹d⁻¹. Suali y Sarbatly en 2012, investigaron el género *Chlorella*, encontraron que debido al contenido de lípidos y alta productividad, 80% peso seco y 7.1 g⁻¹L⁻¹d⁻¹ respectivamente, hacen de esta microalga un candidato ideal como materia prima para el biodiesel.

4.3. Pruebas de ozoflotación de microalgas

La tabla 9 presenta los valores promedio de las réplicas de las 27 pruebas de ozoflotación de microalgas. Estos resultados fueron utilizados para obtener las condiciones que permiten estimar el porcentaje de separación de microalgas, la disminución de la turbiedad y sólidos suspendidos en el agua.

Tabla 9. Resultados promedio de los experimentos para la optimización del proceso

No. De experimento	Variables (Valores codificados)			Respuesta promedio		
	x ₁	x ₂	x ₃	% SST	% microalgas	% Turbiedad
1	-1	-1	-1	11.58±1.48	17.74±2.16	14.40±5.98
2	-1	-1	0	26.32±3.73	79.06±2.96	11.77±0.33
3	0	0	-1	35.26±0.95	35.07±1.84	4.85±0.24
4	-1	1	1	59.21±1.87	61.02±1.82	54.40±1.13
5	-1	0	-1	26.32±4.45	29.83±4.44	16.80±4.52
6	-1	0	1	45.56±3.18	54.97±4.45	41.83±3.07
7	1	0	1	82.37±0.84	91.63±2.96	97.95±0.64
8	-1	1	0	50.66±2.37	65.44±1.48	28.80±2.98
9	-1	-1	1	68.42±0.01	59.16±3.40	63.89±2.81
10	-1	0	0	38.16±1.86	83.25±3.33	20.80±1.33
11	0	0	1	65.13±1.24	94.77±1.48	89.15±2.42
12	1	0	-1	10.53±0.45	32.98±1.13	1.94±0.01
13	0	-1	0	32.90±1.87	53.92±1.77	14.28±2.58
14	1	1	0	71.06±2.17	89.21±1.44	90.98±3.68
15	-1	1	-1	52.63±0.44	57.06±0.37	14.97±0.96
16	1	0	0	36.84±0.01	95.81±1.34	31.88±0.37
17	0	-1	1	79.61±0.93	92.67±1.48	96.80±0.33
18	0	1	1	77.63±1.31	91.63±2.96	95.20±0.33
19	1	1	1	77.64±1.86	93.72±2.95	98.98±0.16
20	1	-1	-1	31.58±3.72	34.02±2.41	17.83±3.40
21	0	1	0	56.58±1.86	91.63±2.96	74.52±0.16
22	0	-1	-1	15.79±3.72	73.82±1.48	10.06±0.16
23	1	-1	0	39.47±1.23	87.43±0.00	27.31±0.46
24	1	-1	1	75.00±0.29	92.67±1.48	97.94±1.93
25	0	0	0	42.11±1.17	79.06±2.96	34.29±0.49
26	1	1	-1	63.16±1.17	45.54±2.24	53.72±1.06
27	0	1	-1	55.26±3.72	56.01±1.85	49.37±3.10

Antes de estimar los valores óptimos de las variables del proceso de ozoflotación que presenten un valor máximo de separación de microalgas, es necesario determinar las variables estadísticamente significativas y el modelo matemático que contenga esas variables para calcular los valores donde la función presente un máximo.

La figura 19 presenta el grafico de Pareto, en el que se observa los factores experimentales y sus interacciones de influencia estadísticamente significativa sobre la recuperación de microalgas. Las barras color gris indican una influencia positiva mientras que las barras de color azul indican una influencia negativa en el proceso.

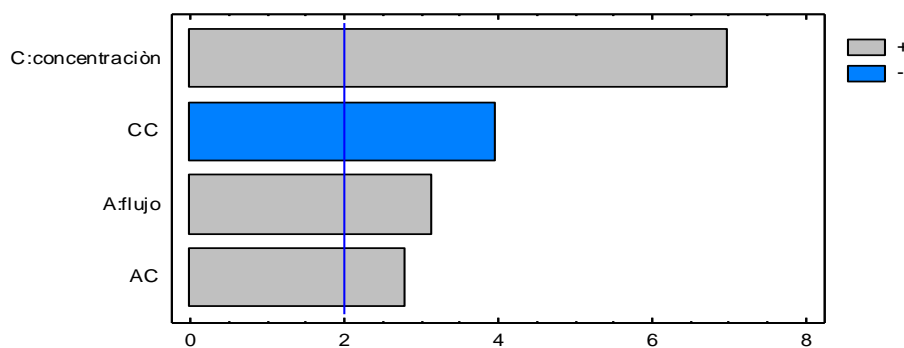


Figura 19. Grafica de Pareto respecto al número microalgas

En la figura 19 se observa que, en orden de importancia, la concentración de ozono (C), el flujo de ozono y la interacción flujo: concentración (AC) presentan una influencia significativa sobre las microalgas, a mayor concentración y flujo. Mayor será el efecto sobre las microalgas sin embargo la interacción CC afecta negativamente a la respuesta. El ajuste matemático simplificado se presenta en la ecuación 2.

$$Y \text{ microalgas} = 80.5322 + 8.36083x_1 + 18.6197x_3 + 9.16375x_1x_3 - 18.3514x_3^2 \text{ ec. 2}$$

En la figura 20 se observa que la concentración de ozono y tiempo de ozonación tienen influencia significativa sobre los sólidos suspendidos totales, mientras que la interacción concentración: tiempo (BC) disminuye el efecto. El ajuste matemático simplificado se presenta en la ecuación 3.

$$Y_{SST} = 36,9354 + 6,32167 x_1 + 10,4531 x_2 + 18,8033 x_3 + 10,2753 x_2^2 - 10,4704 x_2 x_3 + 7,47278 x_3^2 \quad \text{ec. 3}$$

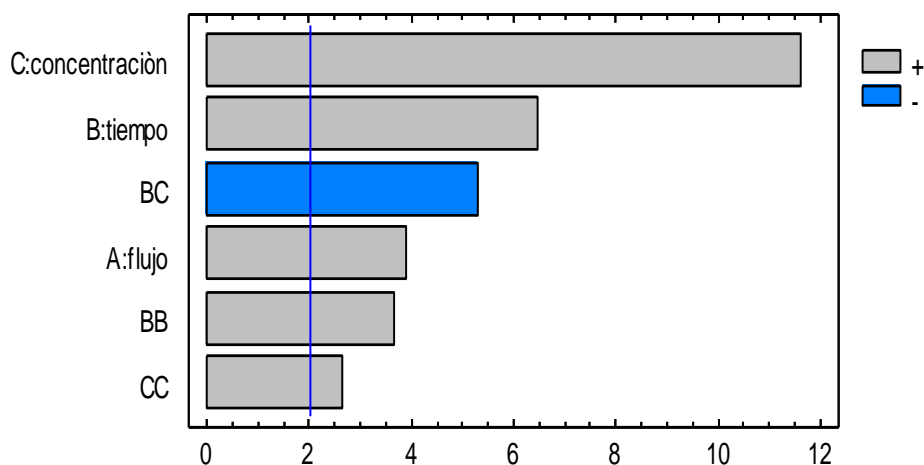


Figura 20. Gráfica de Pareto respecto a los sólidos suspendidos totales

Los tres factores tienen influencia significativa en la turbiedad, solo las interacciones tiempo: concentración (BC) y flujo: flujo (AA) disminuyen el efecto (Figura 21). El ajuste matemático simplificado se presenta en la ecuación 4.

$$Y_{Turbiedad} = 33,7206 + 13,9367 x_1 + 11,4806 x_2 + 30,7886 x_3 - 8,15833 x_1^2 + 7,70667 x_1 x_2 + 8,95292 x_1 x_3 + 13,3467 x_2^2 - 7,15167 x_2 x_3 + 13,8225 x_3^2 \quad \text{ec. 4}$$

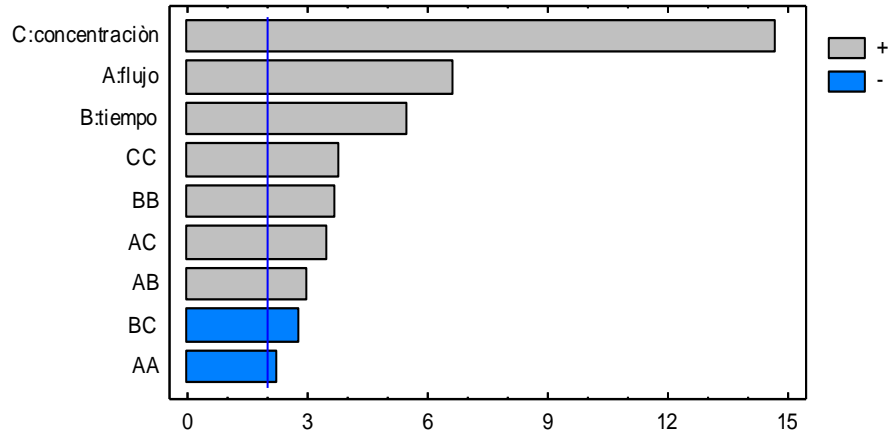


Figura 21. Grafica de Pareto respecto a la turbiedad

El análisis de varianza para la recuperación de SST, se muestra en la tabla 10, debido a que el valor p es menor a 0.05, la cantidad de remoción de solidos suspendidos totales es diferente con los factores evaluados. De igual manera se observa en la cantidad de microalgas y turbiedad.

Tabla 10. Análisis de varianza de recuperación de SST

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F-calculada	Valor - P
A:flujo	1438,68	1	1438,68	15,26	0,0003
B:tiempo	3933,59	1	3933,59	41,73	0,0000
C:concentraciòn	12728,4	1	12728,4	135,04	0,0000
BB	1266,98	1	1266,98	13,44	0,0006
BC	2631,11	1	2631,11	27,92	0,0000
CC	670,109	1	670,109	7,11	0,0105
Total error	4335,64	46	94,2531		
Total (corr.)	27260,9	53			

Otro estadístico calculado fue R cuadrada, la cual indica el porcentaje de variabilidad del parámetro de optimización o de respuesta que representa el modelo matemático, mientras más alto sea el valor el modelo describirá mejor los resultados, sin embargo este estadístico se ve influenciado por la cantidad y tipo de variable independiente. El programa estadístico StatGraphics Centurion propociona una R cuadrada corregida que puede interpretarse como una corrección de error ya que disminuye la R cuadrada

cuando se introducen variables innecesarias, si aumenta puede considerarse una variable de interés. Los valores encontrados de R cuadrada y R cuadrada corregida se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. R cuadrada y R cuadrada corregida de las variables de respuesta

	Microalgas	SST	Turbiedad
R cuadrada (%)	63.40	84.09	89.14
R cuadrada corregida (%)	60.41	82.06	86.92

En la figura 22 se muestra el efecto de los factores evaluados en el proceso, en la recuperación de microalgas, remoción de turbiedad y sólidos suspendidos totales, donde los factores de influencia significativa son la concentración de ozono en fase gas y flujo de ozono. Las gráficas fueron construidas con las ecuaciones 2, 3 y 4.

Con el diseño factorial aplicado se determinó que las condiciones óptimas para el proceso de ozoflotación de microalgas son: flujo de ozono de 0.6 L/min, tiempo de ozonación de 5 minutos y una concentración de ozono en fase gas de 45 mg/L, equivalente a una dosis de ozono aplicada de 0.38 mgO₃/mg de biomasa seca. Bajo estas condiciones es posible separar el 98.32% del número de contenido de microalgas, 79.82 % de sólidos suspendidos totales y 94.37 % de turbiedad.

Estas condiciones óptimas concuerdan con los resultados de Cheng et al. 2011 en cuanto al flujo (0.6 L/min) y tiempo (4 minutos), ya que se aplicó menor concentración de ozono y se obtuvo una disminución de turbiedad superior al 90%.

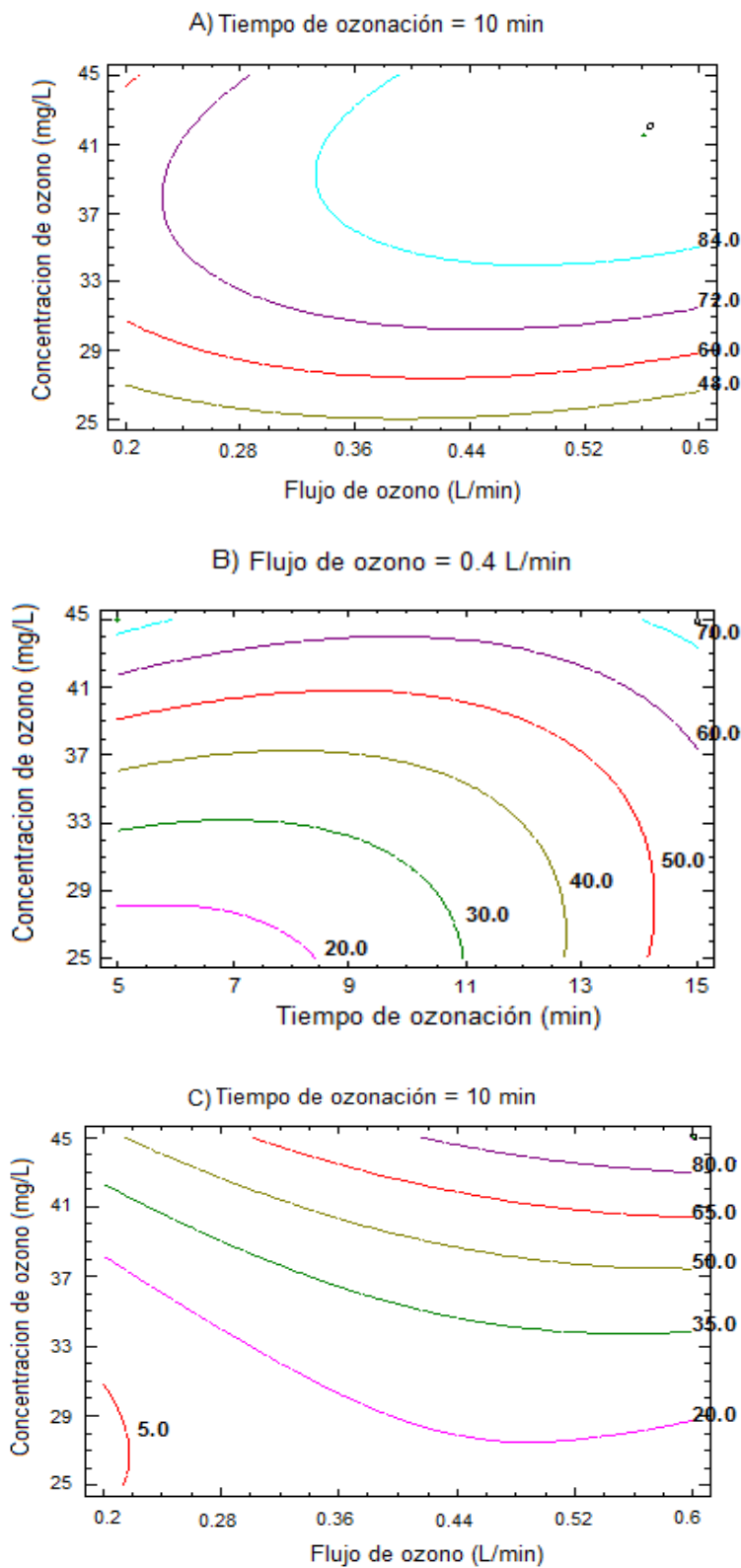


Figura 22. Efecto del tiempo de reacción, el flujo y la concentración de ozono en:

A) Microalgas, B) SST y C) Turbiedad

4.4. Recuperación de biomasa por ozoflotación

La recuperación del concentrado de microalgas con ozono en el tiempo se ve influenciada por la diferente dosis de ozono aplicada.

Con las siguientes condiciones de operación: concentración de ozono de 3 mg/L O₃, flujo de ozono de 0.2 LO₃/min y tiempo de ozonación de 35 min (equivalente a una dosis de ozono aplicada de 22.1 mgO₃/L agua), la espuma empieza a formarse aproximadamente a los cinco minutos, se acumula y empieza a salir a los quince minutos por el puerto indicado para su recolección, las microalgas concentradas en la espuma quedan en el contenedor en un volumen de 8.75±0.35 mL al final del tiempo de ozonación.

Con las siguientes condiciones de operación: concentración de ozono de 7 mg/L O₃, flujo de ozono de 0.2 LO₃/min y tiempo de ozonación de 35 min (equivalente a una dosis de ozono aplicada de 51.6 mgO₃/L agua), la espuma empieza a formarse aproximadamente a los cinco minutos, se acumula y empieza a salir a los doce minutos por el puerto indicado para su recolección, las microalgas concentradas en la espuma quedan en el contenedor en un volumen de 7.85±1.91 mL.

Con las siguientes condiciones de operación: concentración de ozono de 25 mg/L O₃, flujo de ozono de 0.6 LO₃/min y tiempo de ozonación de 4 min (equivalente a una dosis de ozono aplicada de 63.2 mgO₃/L agua), la espuma empieza a formarse aproximadamente a los cuatro minutos, se acumula y empieza a salir por el puerto indicado para su recolección, las microalgas concentradas en la espuma quedan en el contenedor en un volumen de 19.25±7.42 mL.

Con las siguientes condiciones de operación: concentración de ozono de 30 mg/L O₃, flujo de ozono de 0.6 LO₃/min y tiempo de ozonación de 5 min (equivalente a una dosis de ozono aplicada de 94.7 mgO₃/L agua), la espuma empieza a formarse

aproximadamente a los dos minutos, se acumula y sale por el puerto indicado para su recolección, las microalgas concentradas en la espuma quedan en el contenedor en un volumen de 35.5 ± 0.71 mL.

Con las siguientes condiciones de operación: concentración de ozono de 45 mg/L O_3 , flujo de ozono de 0.6 LO_3/min y tiempo de ozonación de 5 min (equivalente a una dosis de ozono aplicada de 142.1 mg O_3 /L agua), la formación de espuma empieza en el momento en el cual entra en contacto el ozono con la suspensión microalgal. La espuma se acumula en un minuto y sale por el puerto superior para su recolección, las microalgas recolectadas en la espuma quedan en el contenedor en un volumen de 49.5 ± 4.95 mL.

El efecto que tiene el ozono en las células de las microalgas concentradas en la espuma se muestra en la figura 23 donde se aprecia que las microalgas han muerto y desintegrado. *Oscillatoria* sp es una célula sensible al ozono y puede fraccionarse o permanecer completa con una DOA de 22.1 mg O_3 /L agua, 51.6 mg O_3 /L agua y 63.2 mg O_3 /L agua a diferencia de *Scenedesmus* sp y *Cyclotella* sp que no presentan algún cambio físico en su estructura.

Cuando se aplica una DOA de 94.7 mg O_3 /L agua y 142.1 mg O_3 /L agua se aprecia que *Oscillatoria* sp y *Arthospira* sp han perdido la clorofila, ya que las células observadas no presentan color, mientras que *Euglena* sp ha sido dañada su pared celular, además bajo estas DOA se aprecia que las células permanecen integra. Wert et al. (2013) observó que no hubo una completa lisis o fragmentación celular de microalgas *Microcystis aeruginosa*, *Oscillatoria* sp y *Lyngbya* sp, solo el daño se presentó como una pérdida de clorofila a.

4.5. Lípidos

El consorcio de microalgas recuperado por centrifugación contiene 2.35%p y 5.85%p de lípidos en época fría y cálida, respectivamente. Sin embargo, el porcentaje de

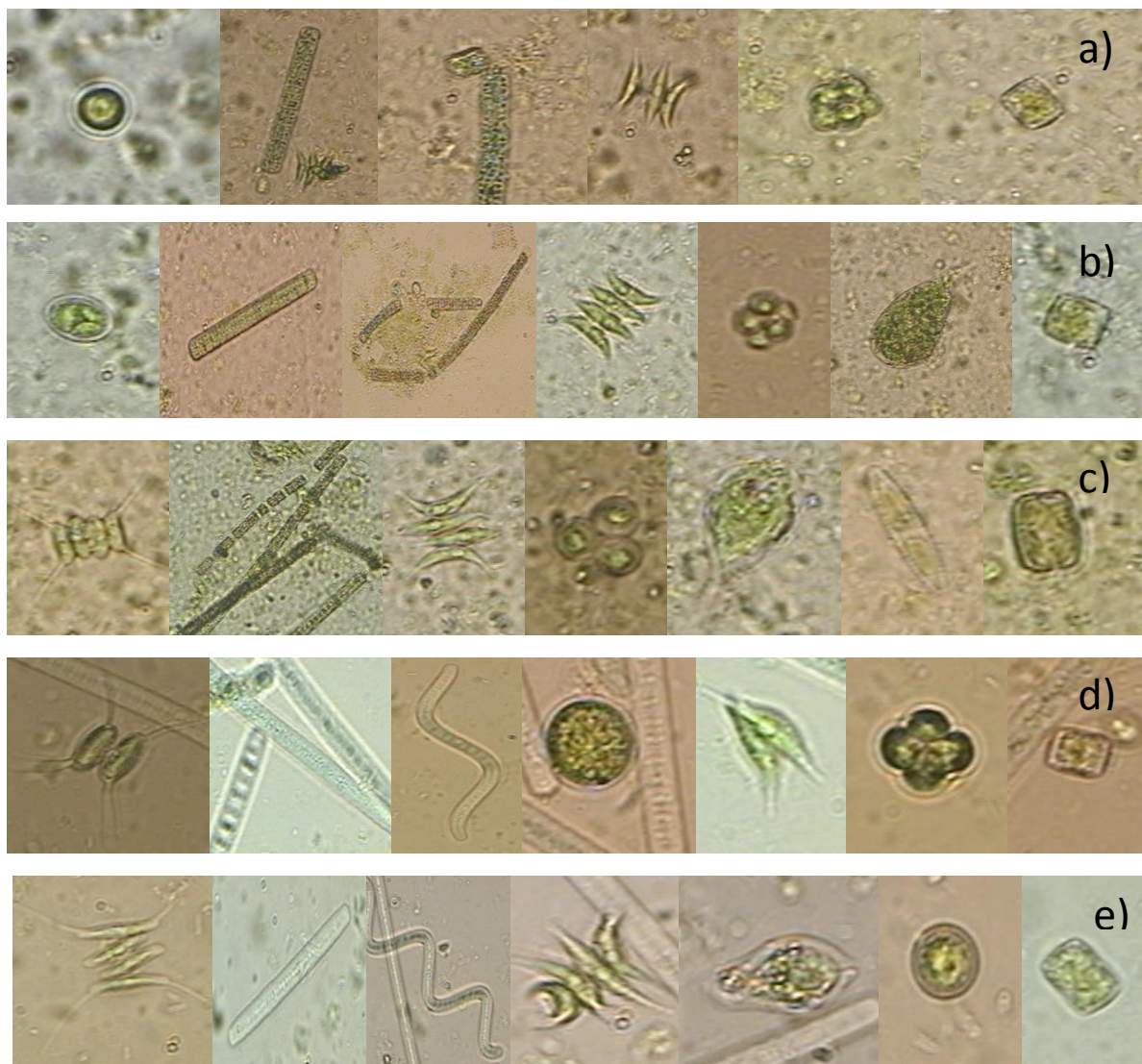


Figura 23. Efecto del ozono en el consorcio recuperado por ozoflotación con diferentes DOA: a) 22.1 mgO₃/L agua, b) 51.6 mgO₃/L agua, c) 63.2 mgO₃/L agua, d) 94.7 mgO₃/L agua y e) 142.1 mgO₃/L agua.

lípidos extraído de la biomasa recuperada por ozoflotación es mayor comparado con la biomasa obtenida por centrifugación obteniendo los resultados mostrados en la tabla 12. Además se puede observar que con una DOA de 51.6 mgO₃/L agua y 63.2 mgO₃/L agua se obtiene un promedio de 11.95±0.07%p de lípidos totales. Christenson y Sims (2011) reportan, que un consorcio de microalgas cultivado en agua residual municipal contiene 11.3%p lípidos y Pittman et al (2011) reportan, que para un consorcio de microalgas compuesto por *Chlorella* sp., *Micractinium* sp. y

Actinastrum sp. hay 9%p lípidos, mientras que en cultivos de microalgas con agua residual municipal con un tratamiento primario o secundario donde el alga dominante es diferente se encuentra una mayor cantidad de lípidos, por ejemplo *Chlamydomonas reinhardtii* (25.25%p lípidos), *Scenedesmus obliquus* (31.4%p lípidos) y *Botryococcus braunii* (17.85%p lípidos).

Tabla 12. Lípidos totales del consorcio de microalgas

DOA para la separación (mgO ₃ /Lagua)	Lípidos totales (%p)
0	5.85
22.1	8.96
51.6	12.00
63.2	11.90
94.7	11.74
142.1	8.38

Con los datos de la tabla 12 se realiza la gráfica de la figura 24, donde se muestra la recuperación de lípidos con respecto a la biomasa seca recuperada con las diferentes dosis de ozono.

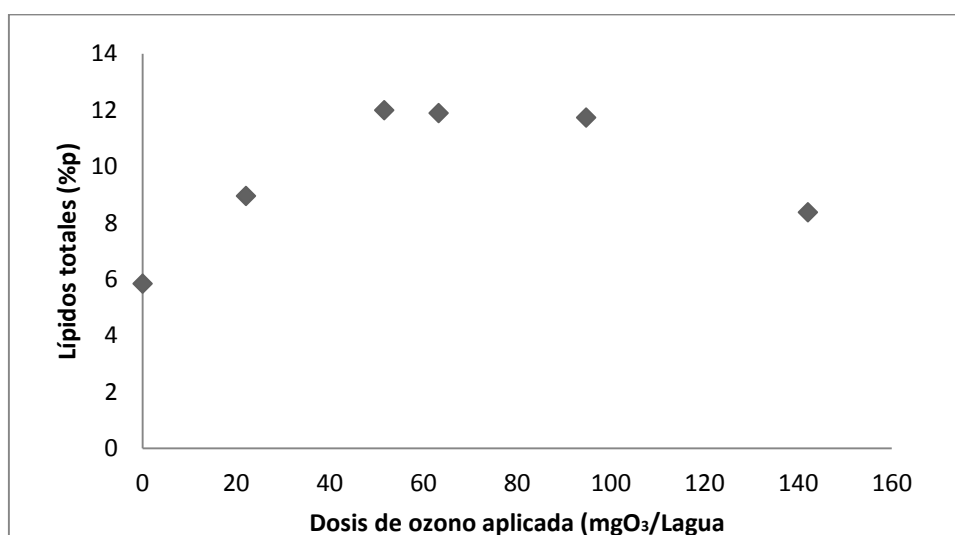


Figura 24. Efecto de la dosis de ozono aplicada en la recuperación de lípidos del consorcio de microalgas

El perfil de FAME obtenido para la biomasa recuperada por centrifugación en época fría y cálida es duplicado de 0.64%p a 1.23%p respectivamente, y está integrado por ácido láurico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido estérico, ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico como se muestra en la tabla 13, donde el ácido palmítico y linolénico son los que se encuentran en abundancia en el consorcio.

Tabla 13. Perfil de FAME para el consorcio de microalgas

Composición de ésteres metílicos de ácidos grasos		FAME microalga (%p)	
		Época fría	Época cálida
C12:0	Láurico	0.03	0.05
C16:0	Palmítico	0.39	0.59
C16:1n9c	Palmitoleico	0.07	0.13
C18:0	Estérico	0.02	nd
C18:1n9c	Oleico	0.01	nd
C18:2n6c	Linoleico	0.02	0.18
C18:3n3	Linolénico	0.11	0.27
Total (%p)		0.64	1.23

nd: no detectado

En la tabla 14 se muestra el perfil de FAME obtenido para la biomasa recuperada por ozoflotación donde la cantidad y calidad de ácidos grasos fue variando, debido a que el ozono daño la membrana celular haciendo que esta sea permeable y por lo tanto los lípidos están disponibles para su extracción.

Los principales integrantes del perfil de ésteres metílicos del consorcio de microalgas cultivadas en agua residual recuperadas por el proceso de ozoflotación fueron el ácido palmítico (C16:0) y linolénico (C18:3n3).

Tabla 14. Perfil de ácidos grasos del consorcio de microalgas recuperadas por centrifugación y ozoflotación

Composición de los ésteres metílicos de ácidos grasos		FAME microalga por centrifugación (%p)	FAME del consorcio de microalgas recuperada por ozoflotación (%p)				
			22.1 mgO ₃ /LH ₂ O	51.6 mgO ₃ /LH ₂ O	63.2 mgO ₃ /LH ₂ O	94.7 mgO ₃ /LH ₂ O	142.1 mgO ₃ /LH ₂ O
10:00	Caprico					0.01	0.11
12:00	Láurico	0.05			0.06	0.01	0.02
13:00	Tridecanoico			0.03	0.03	0.03	0.03
14:00	Mirístico		0.08	0.11	0.10	0.05	0.07
14:1n9c	Miristoleico		0.09	0.06	0.07	0.03	0.05
15:00	Pentadecanoico		0.06	0.04	0.02	0.04	0.03
16:00	Palmítico	0.59	1.28	1.58	1.85	1.51	1.80
16:1n9c	Palmitoleico	0.13	0.30	0.26	0.34	0.28	0.25
18:00	Estérico		0.04	0.06	0.06	0.05	0.08
18:1n9c	Oleico		0.16	0.06	0.31		0.01
18:2n6c	Linoleico	0.18	0.12	0.15		0.20	0.12
18:3n3	Linolénico	0.27	0.16	0.21	0.39	0.26	0.04
22:1n9	Behénico						0.03
Total (%p)		1.23	2.30	2.54	3.23	2.47	2.64

Con los datos de la tabla 14 se elabora la gráfica de la figura 25 donde se muestra el perfil de ésteres metílicos de ácidos grasos obtenido para el consorcio de microalgas recuperado en época cálida en el lago Nabor Carrillo. Se aprecia que sobresale la presencia del ácido palmítico el cual es un ácido grasos sintetizado por las microalgas verde azules, como la *Spirulina platensis*, *Myxosarcina chroococcoides*, *Chlorogloea cylindrica*, *Anabaena flos-aquae*, *Mastigocladus laminosus* y *Anacystis nidulans* (Hitchcock y Nichols, 1971).

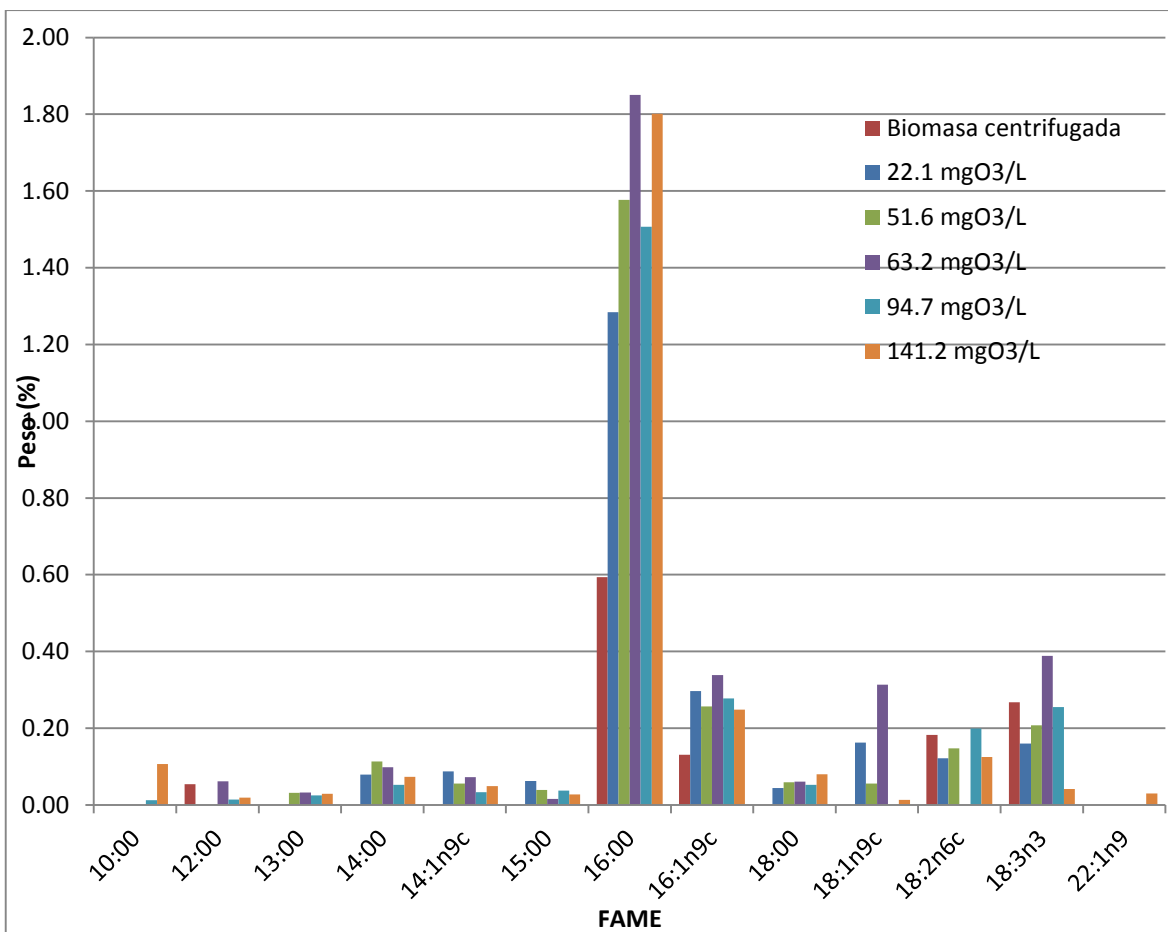


Figura 25. Perfil de ésteres metílicos de ácidos grasos para el consorcio de microalgas.

En la norma europea EN 14214 (EN, 2008), se establece como límite máximo un contenido de 12% en peso de ester metílico de ácido linolénico (18:3n3), el cual es uno de los ácidos grasos presentes en el perfil de lípidos obtenido con la biomasa microalgal recuperada por ozono.

Los lípidos totales del consorcio de microalgas recolectadas en época fría fueron separados principalmente en lípidos neutrales (NL), fosfolípidos (PL) y ácidos grasos libres, usando el método descrito por Kaluzny et al(1985). Siendo los PL los componentes principales de la membrana celular, obteniéndose un valor de 44.26% de los lípidos totales y los NL son 55.74% del total de lípidos.

La fracción de lípidos neutrales fue separada en subclases, donde se obtiene un porcentaje mayor de monoglicéridos (15.06%), seguido de colesterol (14.06%), colesterol éster (10.04%), fosfolípidos (9.84%), diglicéridos (8.53%) y triglicéridos (8.03%) (Figura 26). Sin embargo la cantidad de triglicéridos (TAG) puede variar, modificando algunos parámetros en el cultivo de microalgas.

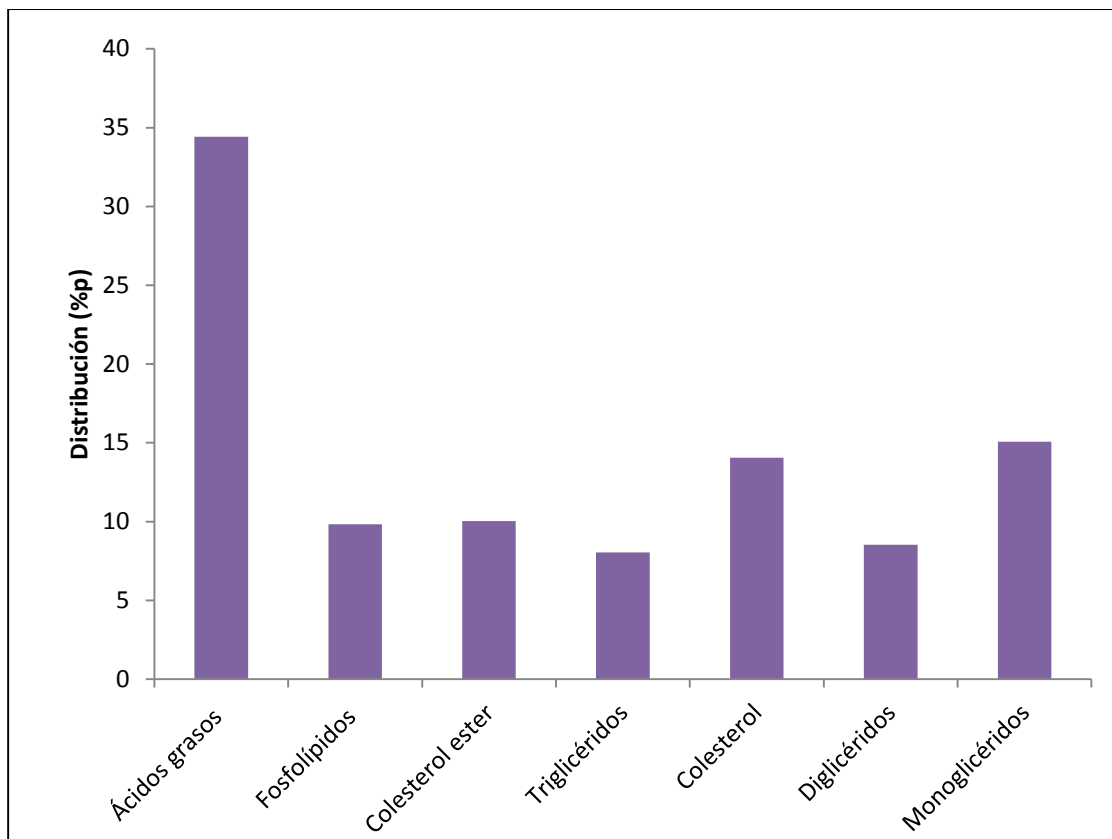


Figura 26. Aislación de clases de lípidos del consorcio de microalgas

Chen et al (2007), encontraron que para un cultivo puro de *Nitzschia laevis*, los lípidos neutrales son los principales constituyentes y representan un 78.6% de los lípidos totales. Siendo los TAG los componentes predominantes de los lípidos neutrales (87.9%), modificando la concentración de carbono como nutriente. En otro estudio realizado por Chen et al (2008), aumentaron la temperatura del medio de crecimiento de *Nitzschia laevis* (mayor a 23°C), observando que no hay un cambio significativo en el contenido de TAG (64.5–69.1% de lípidos totales). Bigogno et al (2002)

estudiaron a la microalga verde *Parietochloris incisa* la cual puede almacenar una cantidad de TAG en un 43% del total de lípidos hasta 77% de lípidos totales en su fase estacionaria. Henderson y Mackinlay 1989, cultivaron *Chroomonas salinaque* a 8°C y 20°C, obtenido semejante proporción de TAG (45.2 a 47.5% del total de lípidos) con ambas temperaturas, aunque reporta una mayor cantidad de lípidos a 8°C (21.9%p) que a 20°C (14.9%p).

El contenido de lípidos, TAG y ésteres metílicos de ácidos grasos en cada muestra de microalgas es diferente. Wahlen et al, (2011) reporta el contenido de estos parámetros para diferente microalgas (diatomeas, algas verdes, cianobacterias y un consorcio de microalgas), observando que *Chaetoceros gracilis* (diatomea) tiene un alto contenido de TAG (27.3% p), mientras que el consorcio obtenido de la laguna de agua residual municipal tiene menos del 1% p. Los TAG en las cianobacterias no fueron detectados mientras que las algas verdes presentan entre 6 y 7% p.

5. CONCLUSIONES

En forma general, la separación de microalgas recolectadas en el lago Nabor Carrillo es favorecida por el efecto del ozono aplicado.

En forma específica se concluyó lo siguiente:

1. La caracterización del agua residual de las lagunas y del lago Nabor Carrillo en época fría y cálida, presentó valores de pH de 8 a 10, temperatura de 18 a 21°C, concentración de fósforo como ortofosfatos de 42 a 50 mg/L y concentraciones de nitratos de 0.55 a 0.81 mg/L, la integración de estos parámetros favoreció el crecimiento de microalgas. La concentración de microalgas en estas épocas es del orden de 10^5 células/mL, la presencia de microalgas en el agua contribuyen a la turbiedad (285 a 712 UTN), y también a la concentración de sólidos suspendidos totales (271 a 419 mg/L).
2. El reactor dimensionado y construido a nivel laboratorio para el proceso de ozoflotación con relación diámetro altura de 11.36, permitió una eficiencia de recuperación del 94%, de concentración de microalgas expresado en células por mL en la espuma recolectada
3. Se analizaron las variables del proceso, utilizando un diseño de experimentos factorial 3^3 , el cual arrojó que las variables de influencia significativa son: la concentración de ozono en fase gas y flujo de ozono, en la recuperación de microalgas por el proceso de ozoflotación.
4. Los valores óptimos estimados para las variables de respuesta evaluadas, permiten una recolección de microalgas (cel/mL) mayor al 90% en la espuma formada por el proceso de ozoflotación.

5. La biomasa microalgal recuperada por el proceso de ozoflotación aplicando las diferentes dosis de ozono, mostró una mejora en la extracción de lípidos (5.85%p a 12.0%p), así como en el perfil de ácidos grasos. Siendo la mayor cantidad de biodiesel de 3.23%p con el consorcio de microalgas recolectado por ozoflotación (DOA de 63.2 mgO₃/Lagua).

6. RECOMENDACIONES

El reactor implementado puede ser mejorado, aumentando el volumen del reactor, considerando algunos parámetros de diseño como volumen desplazado del agua por el gas ozono y tamaño de la burbuja, además de la implementación de un colector en el mismo reactor.

Aislar y cultivar *Scenedesmus* sp., *Desmodesmus* sp., *Clamidomonas* sp. y *Clorella* sp. en agua residual modificando parámetros sencillos como la luz, aireación y temperatura para aumentar el rendimiento de biomasa, mejorar la producción de biodiesel e incrementar la rentabilidad

Evaluar la calidad fisicoquímica y microbiológica del agua residual sobrante en el reactor después de la recuperación de microalgas con la flotación inducida con ozono con el fin darle una aplicación.

7. FUENTES CONSULTADAS

Abdel-Raouf N, Al-Homaidan AA and Ibraheem IBM (2012) Microalgae and wastewater treatment. *Journal of biological science* 19, 257-275.

APHA-AWWA-WPCF (1992). *Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales*. 17ª ed. Ed. Díaz Santos. España. pp. 2-12 a 2-14, 2-63 a 2-65, 10-200 a 10-211.

Araujo GS, Matos LJBL, Goncalves LRB, Fernandes FAN and Farias WRL (2011) Bioprospecting for oil producing microalgal strains: Evaluation of oil and biomass production for ten microalgal strains. *Bioresource Technology* 102, 5248-5250.

Audesirk T and Audesirk G (1997) *Biología*. Ed. Prentice Hall, 2ª ed. México, pp. 441-442

Barsanti L and Barsanti P (2006), *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. Ed. Taylor & Francis Group, US. pp. 12.

Bajhaiya AK, Suseela MR and Ramteke PW (2012) Approaches and prospectives for algal fuel. In Gordon Richard and Seckbach Joseph. *The science of algal fuels*. Ed Springer. USA. pp 43-62.

Ballot A, Dadheech PK, Haande S and Krienitz L (2008) Morphological and Phylogenetic Analysis of *Anabaenopsis abijatae* and *Anabaenopsis elenkinii* (Nostocales, Cyanobacteria) from Tropical Inland Water Bodies. *Microb Ecol* 55:608-618.

Betzer N, Argaman Y and Kott Y (1980) Effluent treatment and algae recovery by ozone-induced flotation. *Water Research*. 14, 1003-1009.

Benoufella F, Laplanche A, Boisdon V and Bourbigot MM (1994) Elimination of *Microcystis cyanobacteria* (blue-green-algae) by an ozoflotation process: A pilot plant study. *Wat. Sci. Tech.*, 30, 245-257.

Bitton G (2005) *Wastewater microbiology*. Third edition. Ed. Wiley. Florida. pp. 31-32.

Bigogno C, Khozin-Goldberg I, Boussiba S, Vonshak A and Cohen Z (2002) Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. *Phytochemistry*. 60, 497-503.

Brennan L and Owende, P (2010) Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extraction of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14, 557-577.

Carvalho AP, Meireles LA and Malcata FX (2006) Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol. Prog.* 22, 1490-1506.

Cheng YL, Juang YC, Liao GY, Ho SH, Yeh KL, Chen CY, Chang JS, Liu JC and Lee DJ (2010) Dispersed ozone flotation of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*. 101, 9092–9096.

Cheng YL, Juang YC, Liao GY, Tsai PW, Ho SH, Yeh KL, Chen CY, Chang JS, Liu JC, Chen WM and Lee DJ (2011) Harvesting of *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using dispersed ozone flotation. *Bioresource Technology*. 102, 82–87.

Chen YM, Liu JC and Ju YH (1998) Flotation removal of algae from water. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 12, 49-55.

Chen GC, Jiang Y and Chen F (2007) Fatty acid and lipid class composition of the eicosapentaenoic acid-producing microalga, *Nitzschia laevis*. *Food Chemistry*. 104, 1580–1585.

Chen GQ, Jiang Y and Chen F (2008) Variation of lipid class composition in *Nitzschia laevis* as a response to growth temperature change. *Food Chemistry* 109. 88-94.

Chisti Y (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25, 294–306.

Chisti Y (2008) Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*. 26, 126-131

Christenson L and Sims R (2011) Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advances*. 29, 686-702.

Chinnasamy S, BA, Hunt RW and Das KC (2010) Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresource Technology* 101, 3097-3105.

Cruickshank GG (1984) *Proyecto Texcoco*. IV Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental S.M.I.S.A.A.C. México. pp. 680-684

Demirbas A and Demirbas MF (2010) *Algae energy algae as a new source of Biodiesel* Ed. Springer. Alemania. pp. 75-158.

Deniz F, Saygideger SD, Karaman S (2011) Response to Copper and Sodium Chloride Excess in *Spirulina* sp.(Cyanobacteria). *Bull Environ Contam Toxicol*. 87, 11–15.

Dismukes GC, Carrieri D, Bennette N, Ananyev GM and Posewitz MC (2008) Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Curr. Opin. Biotechnol*. 19, 235-240.

EN, European Standard EN14214 (2008) Automotive fuels-Fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines-Requirements and test methods.

Fuentes GC (2012) Dinoflagellates as feedstock for biodiesel production. In Gordon Richard and Seckbach Joseph. *The science of algal fuels*. Ed Springer. USA. pp 235-254.

García G (1998). "Proyecto lago de Texcoco, Rescate hidroecológico". CNA, México.

García E (1988) *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köpen*. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México. 35.

Garcés R and Mancha M (1993) One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. *Analytical Biochemistry*. 211. 139-143.

Garibay HA, Vázquez-Duhalt R, Sánchez SMP, Serrano CL y Martínez JA (2009). Biodiesel a partir de Microalgas. *BioTecnología*. 13, 38-61.

Goldman JC (1979) Outdoor algal mass cultures-I. Applications. *Water research*. 13, 1-19.

Hammer MJ (1996) *Water and wastewater technology*. Ed Pretice Hall. USA. pp. 56-78

Henderson RJ and Mackinlay EE (1989) Effect of temperature on lipid composition of the marine Cryptomonad *Chroomonas salina*. *Phytochemistry*. 28, 2943-2948.

Hideroni S (2004). Mass production of *Spirulina*, an edible microalga. *Hydrobiologia*. 512, 39-44.

Hitchcock C and Nichols BW (1971). *Plant lipid biochemistry: The biochemistry of fatty acids and acyl lipids with particular reference to higher plants and algae*. Ed. Academia Press Inc. Londres. pp. 75-80.

Ho LB, Chul SW, Manna B, Kyu HJ (2008) Dissolved ozone flotation (DOF) - a promising technology in And municipal wastewater treatment. *Desalination* 225, 260-273.

Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M and Darzins A (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J*. 54, 621-639.

Kaluzny MA, Duncan LA, Merrit MV and Epps DE (1985) Rapid separation of lipids classes in high yield and purity using bonded phase columns. *Journal of Lipid Research*. 26, 135-140.

Khozin GI and Cohen Z (2006) The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry*. 67, 696-701.

Langlais B, Reckhow DA and Deborah RB (1991) *Ozone in water treatment, application and engineering*. Ed. Lewis publishers. USA, pp. 21-25.

Lee AK, Lewis DM and Ashman PJ (2009) Microbial flocculation, a potentially low cost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel. *J. Appl. Phycol.* 21, 559-567.

Li YG, Xu L, Huang YM, Wang F, Guo C and Liu CZ (2011) Microalgal biodiesel in China: Opportunities and challenges. *Applied Energy*. 88, 3432-3437.

Li Y, Chen YF, Chen P, Min M, Zhou W, Martinez B, Zhu J, Ruan R (2011) Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. *Bioresource Technology*. 102. 5138-5144.

Loera-Quezada MM and Olguín EJ (2010) Las microalgas oleinosas como Fuente de biodiesel: retos y oportunidades. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal*. 1, 91-116.

Mata MT, Martins AA and Caetano NS (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14, 217–232.

Mayén PI (1967) Estudio físico geográfico del lago de Texcoco. Tesis de licenciatura. UNAM.

Molina GE, Belarbi EH, Ación FFG, Robles MA and Chisti Y, (2003), Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics, *Biotechnology Advances*. 20, 491-515.

Molina GE, Ación FFG, García CF and Chisti Y, (1999). Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *J Biotechnol*. 70, 231-247.

Mohn FH (1980) *Experiences and strategies in the recovery of biomass in mass culture of microalgae* In: G. Shelef and C.J. Soeder, Editors, *Algal biomass*, Amsterdam. pp. 547-571.

Muciño D. (2001). Proyecto regional. Estudio general del caso lago de Texcoco, México. Convenio: IDRC - OPS/HEP/CEPIS. 2000 - 2002. pp. 24, 54.

Muñoz TR (2013). Conferencia. El potencial de la biotecnología algal en ingeniería ambiental. Mexico.15 de Agosto de 2013.

Norma Mexicana. NMX-AA-014-1980 “Cuerpos receptores-muestreo”.

Norma Mexicana. NMX-AA-003-1980 “Agua residual-muestreo”.

Orta de Velásquez MT, Monje-Ramírez I and Yañez NI (2012) Saline landfill leachate disposal in facultative lagoons for wastewater treatment. *Environmental Technology*. 33, 247-255.

Petrusevski B, Bolier G, Van Breemen AN and Alaerts GJ (1995) Tangential flow filtration: a method to concentrate freshwater algae, *Water Research*, 29. 1419-1424.

Pittman JK, Dean AP, Osundeko O (2011) The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*. 102, 17-25.

Pragya N, Pandey KK and Sahoo PK (2013) A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. *Renewable and sustainable energy reviews*. 24, 159-171.

Pulz O (2001) Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57, 287-293.

Pulz O and Scheibenbogen K. (1998) Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input. *In: Advances in biochemical engineering/biotechnology*. Ed. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. pp. 123-152.

Rittmann BE (2008) Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.* 100, 203-212.

Rodolfi L, Zittelli GC, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G and Tredici MR (2009) Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 102, 100-112.

Suali E and Sarbatly R (2012) Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16, 4316-4342.

Topf M, Mordechai T, Yael MT, Iluz D, Dubinsky Z and Yehoshua Y (2012) Algal oils: biosynthesis and uses. En Gordon Richard and Seckbach Joseph. *The science of algal fuels*. Ed Springer. vol 25.USA. pp. 193-214.

Ugwu CU, Aoyagi H and Uchiyama H (2008) Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*. 99, 4021-4028.

Uduman N, Qi Y, Danquah MK, Forde GM and Hoadley A (2010) Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. *J Renew Sust Energ.* 2, 012701-012715

Wahlen BD, Willis RM and Seefeldt LC (2011) Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures. *Bioresource Technology*. 102, 2724-2730.

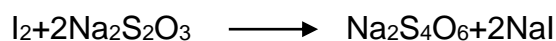
Wang B, Li Y, Wu N and Lan WC (2008) CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 79, 707-18.

Wert EC, Dong MM and Rosario-Ortiz FL (2013) Using digital flow cytometry to assess the degradation of three cyanobacteria species after oxidation processes. *Water research*. 47, 3752-3761.

Wiley PE, Campbell JE and McKuin (2011) Production of biodiesel and biogas from algae: A review of process train options. *Water Environment Research*, 83, 326-338.

Anexo A. Cuantificación de ozono en fase gas (Método Yodométrico)

Existen numerosos métodos para la determinación de ozono en fase gas, todos basados en el desplazamiento del yodo a diferente pH de una solución alcalina de acuerdo a la siguiente reacción:



El yodo liberado es titulado con una solución reductora, la cual puede ser arsenito o tiosulfato de sodio (APHA, 1992).

Reactivos:

Solución 0.1 N de tiosulfato de sodio

Solución 1 N de ácido sulfúrico

Solución de yoduro de potasio al 2%

Material:

- Pipetas
- Bureta
- Matraces Erlenmeyer
- Lavadores de gas

Determinación

Se llena un matraz burbujeador que será el primer lavador (lavador de gas) con 200 mL de yoduro de potasio al 2%, se conecta la manguera al punto de muestreo del generador e introducir el otro extremo en el matraz que contiene la solución de KI. Se ajusta el flujo con aire enriquecido con oxígeno en otro matraz burbujeador que será el segundo lavador que contiene solución de KI; se burbujea un volumen en el primer lavador, este volumen se mide con el rotámetro y al mismo tiempo se registra la temperatura y la presión del gas. Se acidifica esta solución con 10 mL de ácido

sulfúrico 1 N, se titula con una solución de tiosulfato de sodio 0.1 N; se continuar con la titulación hasta decolorar. Se registra el volumen gastado de tiosulfato, se sigue el mismo procedimiento para determinar la concentración de ozono a la salida del sistema. Y se realizan los siguientes cálculos:

$$[O_3]_{ge} = \frac{T * N * 24}{V_{gas}} \dots\dots\dots (1)$$

$$[O_3]_{gs} = \frac{T * N * 24}{V_{gas}} \dots\dots\dots (2)$$

Donde:

$[O_3]_{ge}$ es la concentración de ozono en fase gas a la entrada del reactor (mg/L gas)

$[O_3]_{gs}$ es la concentración de ozono en fase gas a la salida del reactor (mg/L gas)

T son los mililitros de tiosulfato de sodio consumidos

N es la normalidad del tiosulfato de sodio

24 es un factor de corrección, que indica que 1 ml de tiosulfato corresponde a 24 mg de ozono

V_{gas} es el volumen de gas que pasa a través del rotámetro en un tiempo de contacto dado