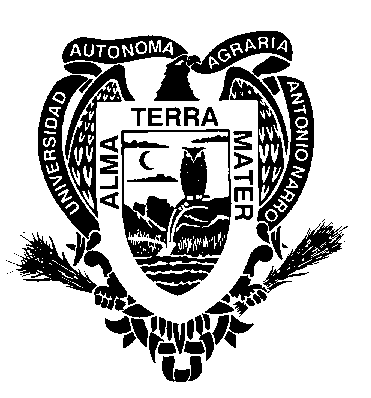
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**UNIDAD LAGUNA**

**DIVISÍON DE CARRERAS AGRONÓMICAS­­­**



**“EXTRACCIÓN DE ACEITE DE BIOMASA DE MICROALGAS EMPLEADAS EN EL TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUALES”**

**POR:**

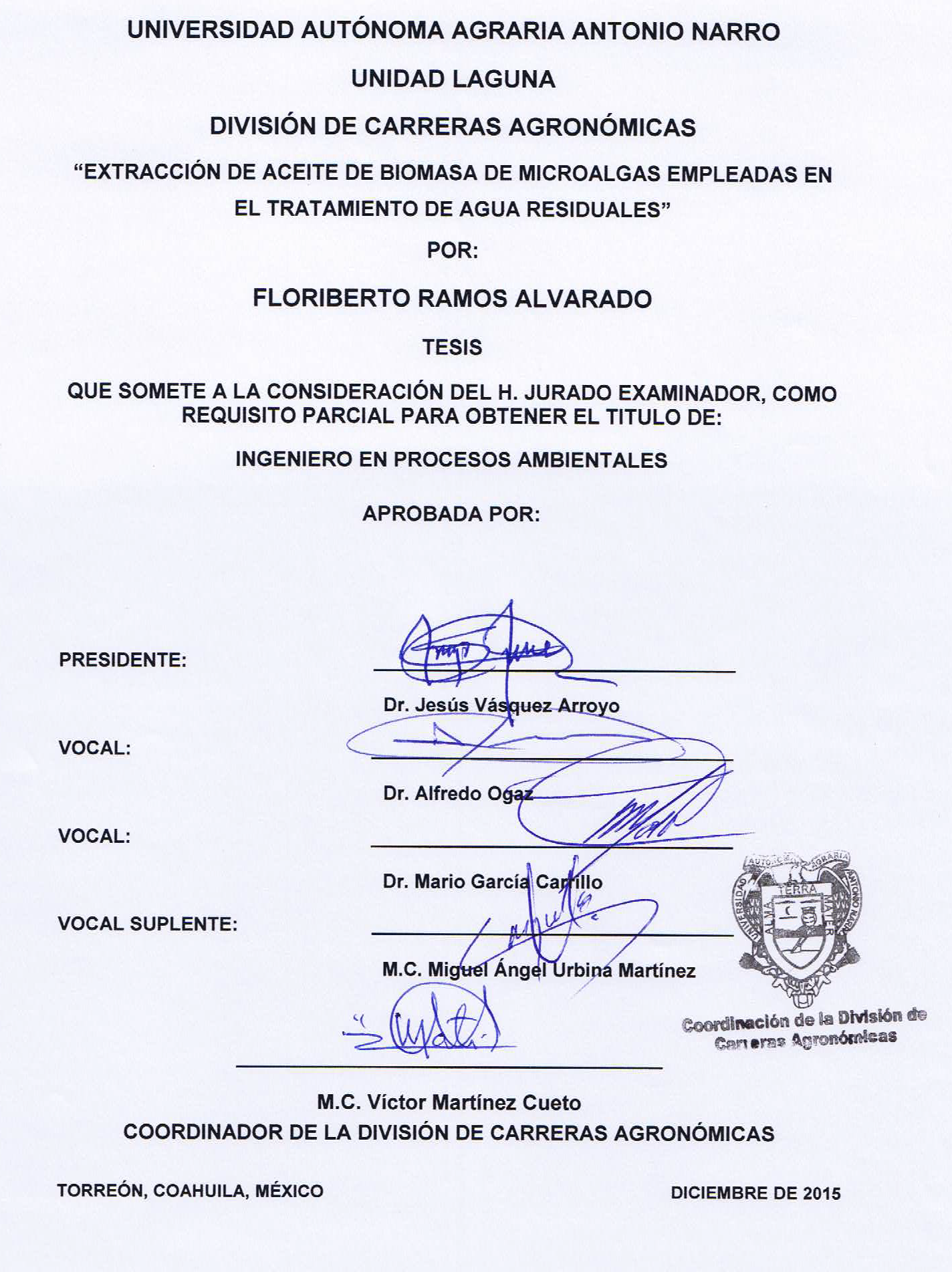
**FLORIBERTO RAMOS ALVARADO**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**INGENIERO EN PROCESOS AMBIENTALES**

**Torreón, Coahuila, México Diciembre de 2015**

****

****

# AGRADECIMIENTOS

Los autores estamos agradecidos en primer lugar a Dios por haber bendecido y guiado nuestros caminos a la culminación de una etapa importante para un ser humano.

Al Dr. Jesús Vásquez Arroyo principal asesor del seminario de investigación que con su apoyo y conocimiento nos guio a lo largo de todo el proyecto.

A mis padres, que con su apoyo incondicional y colaboración han hecho posible que llegamos a la culminación de mi carrera.

# DEDICATORIA

Dedico este proyecto de tesis en primer lugar en Dios por darme fortaleza, perseverancia y constancia a lo largo de mi sendero como estudiante universitario. A mis padres, que me han brindado su apoyo incondicional. A mis amigos y compañeros que he conocido a lo largo de mis estudios, que con su apoyo a lo largo de los años he llegado a cumplir mi meta.

**INDICE DE CONTENIDO**

INTRODUCCIÓN 1

OBJETIVO GENERAL. 3

OBJETIVO PARTICULAR. 3

HIPOTESIS 3

CAPÍTULO II 4

REVISIÓN DE LITERATURA 4

2.1. Microalgas 4

2.2. Normatividad en Agua residual 5

2.2.1. Microalgas presentes en el agua residual 6

2.3. Beneficios de las microalgas 6

2.4. Biomasa a partir de microalga 8

2.5. Composición de lípidos de microalgas 9

2.6. Extracción de lípidos 10

2.7. Ultrasonido extracción de aceite asistida 11

2.8. Extracción de aceite asistida por microondas 12

2.9. Método de extracción de disolventes 12

2.10. Extracción con CO2 supercrítico 14

2.11. Métodos químicos para la extracción de aceite 15

2.12. La extracción de aceite a partir de biomasa húmeda 16

2.13. Efecto del pretatamiento sobre la extracción de lípidos a partir de microalgas 17

CAPITULO III 19

MATERIALES Y MÉTODOS 19

3.1. Ubicación del experimento 19

3.2. Fotobiorreactor al aire libre 19

3.3. Modo operativo 20

3.4. Modelo matemático del sistema 20

3.5. Evaluación de la floculación por microalgas 21

3.6. Concentración de biomasa (gL-1) 22

3.7. NMX-AA-005-SCFI-2013 Análisis de agua – Medición de grasas y aceites recuperables en aguas naturales, residuales y residuales tratadas – Método de prueba (CANCELA A LA NMX-AA-005-SCFI-2000). 22

3.7.1. Grasas y aceites 22

3.7.2. Masa constante 22

3.7.3. Reactivos y patrones 22

3.7.4. Materiales 23

3.7.5. Equipo 23

3.7.6. Recolección, preservación y almacenamiento de muestras 24

3.7.7. Control de calidad 24

3.7.7.1. Referencias 24

3.7.8. Procedimiento 25

3.7.9. Cálculos 27

3.7.10. Interferencias 27

3.8. Variables de estudio del agua residual 28

3.8.1 pH 28

3.8.1.1. Determinación de pH: 28

3.8.2 Conductividad Eléctrica (CE) 29

3.8.2.1. Determinación de CE: 29

3.8.3. Sólidos totales (ST) 29

3.8.3.1. Determinación de sólidos totales (ST): 29

3.8.4 Sólidos totales volátiles (STV) 30

3.8.5. Demanda Química de Oxígeno (DQO) 31

3.8.5.1. Determinación de la DQO: 31

3.8.6. Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) 32

3.8.6.1. Determinación de la DBO: 32

3.8.7. Nitrógeno (N) 32

3.8.8. Fósforo (P) 33

3.8.9. Coliformes Fecales por número más probable (NMP/100mL-1) 34

CAPÍTULO IV 37

RESULTADOS Y DISCUSION 37

4.1. Preliminares 37

4.2. Caracterización de aguas residuales de San Pedro Coahuila 37

4.3. Estudios preliminares de floculación 38

4.4. Contenido de aceite con un método de extracción con solvente 39

4.5. Extracción con hexano 39

4.5.1. Extracción con Soxhlet 39

4.6. Desarrollo de métodos de extracción 44

4.7. pH 45

4.8. Conductividad Eléctrica 45

4.9. Temperatura 46

4.10. Producción de biomasa (mgL-1) 46

4.11. Extracción de lípidos método soxhlet 47

CONCLUSIONES 49

REFERENCIAS. 50

**INDICE DE CUADRO**

[Tabla 1 límites máximos permisibles de contaminantes promedio mensual 5](#_Toc436895388)

[Tabla 2. Microalgas empleadas en la degradación de diversos contaminante (Rawat y Ranjith Kumar, 2010). 7](#_Toc436895389)

[Tabla 3 contenido de aceite de algunas especies de microalga. 10](#_Toc436895390)

[Tabla 4 Productividad de lípidos para los distintos medios de cultivo de microalga 12](#_Toc436895391)

[Tabla 5 Determinación de lípidos en Ccal, Dun y Nanno: extracción con hexano – método Soxhlet (Pérez, 2012). 16](#_Toc436895392)

[Tabla 6 Composición Química de los géneros de microalgas 16](#_Toc436895393)

[Tabla 7 Resultados de NMP, con tres diluciones por triplicado 36](#_Toc436895394)

[Tabla 8 Características del agua residual de San Pedro 38](#_Toc436895395)

[Tabla 9 . Resultado de ensayos de pruebas de floculación con concentraciones previamente definidas 39](#_Toc436895396)

[Tabla 10 Pesos constantes de matraces de grasas y aceites utilizados para las determinaciones de extracción de aceite de biomasa de microalga. 40](#_Toc436895397)

[Tabla 11 Resultados de biomasa (mg/L-1) de microalgas obtenidas del tratamiento del agua residual de San Pedro, Coah 41](#_Toc436895398)

[Tabla 12 Primer reflujo inicio 08: 00, final 12:17. Resultados de la extracción de aceites (mg/L-1) de microalgas obtenidas del tratamiento del agua residual de San Pedro, Coahuila 42](#_Toc436895399)

[Tabla 13 Segundo reflujo inicio 12:17, final 16:17. Resultados de la extracción de aceites (mg/L-1) de microalgas obtenidas del tratamiento del agua residual de San Pedro, Coahuila 43](#_Toc436895400)

[Tabla 14 . Contenido mgl-1 y productividad de aceite obtenido de la biomasa de microalga del fotobiorreactor 43](#_Toc436895401)

# RESUMEN

Más del 80% de las aguas residuales en los países en vías de desarrollo se descarga sin tratamiento. Las microalgas son organismos fotosintéticos capaces de usar la energía solar y el dióxido de carbono para crear biomasa, generar biodiesel como energía renovable prometedores. El objetivo del presente estudio fue determinar el contenido de aceite de microalgas empleadas en el tratamiento de las aguas residuales de San Pedro de la Colonias, Coahuila. Se utilizó un fotobiorreactor piramidal, soportando una manguera de plástico transparente de 100 m de largo y ¾ de pulgada de diámetro externo, expuesta al medo ambiente. Se utilizó un contenedor de plástico de 200 L y se recirculó el agua tratada durante cuatro, cinco y hasta siete días en el transcurso de cinco semanas de Agosto a Noviembre del 2015. Se realizaron las determinaciones dé % de floculación, pH, C.E., biomasa, sólidos solubles totales y volátiles, DQO, N y P total, contenido y productividad de aceite de la biomasa. Los resultados de la extracción de aceite por el método soxhlet fue eficiente a los dos días de la tercer semana con una producción y productividad de Consideramos que los contenido de aceite en las microalgas generarán adecuada cantidad para generación futura de biodiesel bajo las condiciones de La Comarca Lagunera.

# Palabras Claves: Fotobiorreactor, Microalgas, Cultivo, Biomasa, Aceite.

# INTRODUCCIÓN

Se calcula que la Tierra tiene 1,386 millones de Km3 de agua. Es la única sustancia presente en la naturaleza que puede encontrarse tanto en forma sólida, líquida o gaseosa. Solamente el 0.007 % de esta es accesible para el consumo humano directo. En México se siembran 22 millones de hectáreas, los rendimientos de riego son 2.2 a 3.3. Veces más que los de temporal. A nivel mundial, la agricultura de riego origina el 40% de la producción agrícola (SEMARNAT, 2014).

Más del 80% de las aguas residuales en los países en vías de desarrollo se descarga sin tratamiento, contaminando ríos, lagos y zonas costeras (UNESCO, 2014). Al 2013 se tenía en México, 2,287 plantas para centros de población y 2,617 plantas para las aguas residuales industriales. La industria genera 210.3 m3 por segundo de aguas residuales, se trata solo el 29 % (SEMARNAT, 2014). Mientras que en Brasil, de la misma manera, solamente tratan el 38.7 % (Cynamon Kligerman y Bouwer, 2015).

Se denomina agua residual al agua que ha sido utilizada en las actividades diarias de tipo doméstico, industrial, agrícola u otro y que se contaminaron con sustancias fecales, orina, procedentes de desechos orgánicos de origen antropogénica, animales, además de residuos procedentes de la actividad industrial ([Meza Bazán, 2013](#_ENREF_29)).

Los métodos de tratamiento de las aguas residuales, donde se aplican fuerzas físicas se conocen como operaciones unitarias, mientras que los métodos de tratamiento en donde la remoción de contaminantes se debe a reacciones químicas o biológicas de llaman procesos unitarios. Actualmente operaciones y procesos unitarios se asocian para el tratamiento de aguas residuales municipales. Para realizar el tratamiento de las aguas residuales existen tres tipos de procesos: físicos, fisicoquímicos y biológicos ([Flores Torres, 2006](#_ENREF_16)).

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos capaces de usar la energía solar y el dióxido de carbono para crear biomasa. Debido a que las células crecen en suspensión acuosa, éstas, debe tener acceso eficiente al agua, CO2, y otros nutrimentos ([Widjaja. *et al.*, 2009](#_ENREF_48)). Éstas, son las plantas de más rápido crecimiento en el mundo y son importantes como fuente de biomasa (Demirbas. y Demirbas., 2011).

Las microalgas, como materia prima del biodiesel, son las fuentes de energía renovables prometedores que se pueden desarrollar de forma continua en el futuro. Debido a que la recuperación de los lípidos de microalgas a partir de microalgas seco incurre en altos costos, especialmente en el proceso de deshidratación, la extracción en húmedo se ha sugerido como un enfoque alternativo atractivo ([Park. *et al.*, 2014](#_ENREF_33)). También se describen otras aplicaciones potenciales y cómo combinarlos con la producción de biodiesel ([Mata. *et al.*, 2010](#_ENREF_28)).

Otro aspecto relacionado con el uso mundial de energía es que el transporte está aumentando rápidamente, especialmente en las economías en desarrollo como China y Brasil, donde este sector depende fuertemente de los productos a base de petróleo. Por lo tanto, se espera que las emisiones de CO2 procedentes del transporte sigan subiendo. Por esa razón, hay un gran interés, tanto de las empresas y los gobiernos, para fomentar el desarrollo de las materias primas para las energías renovables. Los expertos consideran que la producción de biocombustibles de microalgas alcanzará su escala comercial completa en el 2020, y del 2021 hasta 2030, podría representar entre el 1% y el 5% del consumo de combustible en todo el mundo ([Ribeiro. *et al.*, 2015](#_ENREF_41)).

# OBJETIVO GENERAL.

Determinación del contenido, tipo y calidad de aceite de microalgas obtenidas del tratamiento a las aguas residuales de La Comarca Lagunera para la producción de biocombustibles.

## OBJETIVO PARTICULAR.

Determinar los contenidos de aceite de la biomasa de microalgas obtenidas a partir del tratamiento de las aguas residuales de San Pedro de la Colonias, Coahuila.

## HIPOTESIS

El contenido de aceite en las microalgas es adecuado para la producción del biodiesel.

# 

# CAPÍTULO II

## REVISIÓN DE LITERATURA

## 2.1. Microalgas

Las microalgas son un conjunto heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares procariontes (cianobacterias) y eucariontes, que se localizan en hábitats diversos tales como aguas marinas, dulces, salobres, residuales o en el suelo, bajo un amplio rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes; se les considera responsables de la producción del 50% del oxígeno y de la fijación del 50% del carbono en el planeta ([Hernández. *et al.*, 2009](#_ENREF_21)).

Las condiciones apropiadas para un crecimiento algal vigoroso son: (l) suministro e nutrimentos y CO2 en concentraciones adecuadas; (ll) iluminación adecuada, (lll) mantenimiento favorable de la temperatura y (lV) adecuada agitación, para evitar la precipitación de las células y asegurar una distribución homogenea de los componentes y luz (Tamiya, 1957).

El cultivo de microalgas en sistemas abiertos se desarrolla bien, pero solamente algunas especies se pueden mantener, en virtud del control del pH alcalino y un ambiente selectivo. Los fotobiorreactores cerrados ofrecen una opción para el manejo monoespecífico de una diversidad de algas en comparación con los sistemas abiertos (Molina *et al*., 2001). Así mismo, se sabe que los parásitos son ubícuos en los sistemas biológicos y por tanto tendrán una función importante en controlar las poblaciones de algas en estudio. La cepas típicas empleada para estos propósitos son: *Chlorella*, *Arthrospira*, *Dunaliella* y *Haematococcus* (Bajpai et al., 2014). El potencial de expansión del cultivo comercial de microalgas con una diversidad de aplicaciones, incluyendo a los biocombustibles, alimento y fármacos, los parásitos llegarán a ser importantes se tomen en cuentan en los posibles impactos económicos adversos a los que enfrentaran los proyectos de innovación (Carney y Lane, 2014).

## 2.2. Normatividad en Agua residual

Establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se re usen en servicios al público.

Tabla 1 límites máximos permisibles de contaminantes promedio mensual

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Tipo de reusó | Coliforme Fecales nmp/100ml | Huevos de helminto (h/l) | Grasas y aceites mg/l | DBO5 mg/l | SST mg/l |
| Servicios al público con contacto directo | 240 | 1 | 15 | 20 | 20 |
| Servicios al público con contacto indirecto u ocasional | 1,000 | 5 | 15 | 30 | 30 |

NOM-003-SEMARNAT-1997. Establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público, sin poner en riesgo la salud de los usuarios.

NOM-002-SEMARNAT-1996. Esta NOM establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal con el fin de prevenir y controlar la contaminación de las aguas y bienes nacionales, así como proteger la infraestructura de dichos sistemas.

La NOM-001-SEMARNAT-1996. Establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, con el objeto de proteger su calidad y posibilitar su reúso.

### 2.2.1. Microalgas presentes en el agua residual

En un primer estudio con cepas nativas de microorganismos presentes en las aguas residuales de la acuicultura, se estudiaron tres cultivos de algas: un consorcio indígena mixta y cultivos puros de *Chlorella* y *Scenedesmus*. Se evaluaron los efectos de las condiciones axénicas y no axénicas sobre la capacidad del sistema para mantener la función y capacidad de recuperación. Se utilizaron dos criterios de éxito para examinar la resistencia del sistema: la productividad de los productos finales deseables (biomasa, clorofila, almidón y lípidos) y la eliminación de nitratos y materia orgánica de las aguas residuales ([Halfhide. *et al.*, 2014](#_ENREF_18)).

## 2.3. Beneficios de las microalgas

Debido a una mayor eficiencia de conversión de la luz, la producción de biocombustibles de algas requiere significativamente menos área de tierra que, los sistemas de biocombustibles basados en cultivos agrícolas, incluso de origen vegetal. Además, las algas pueden ofrecer beneficios ecológicos adicionales mediante la reducción de los contaminantes antropogénicos en el medio ambiente y la reducción de la concentración de CO2 en el aire para mantener el su equilibrio en el ciclo del carbono, si y solo si, adoptamos proceso de ingeniería ecológica de la tecnología de las algas y diseñar un sistema de crecimiento eficiente en utilizar el recurso natural sostenible Cuadro 2 ([Ramaraj. *et al.*, 2015](#_ENREF_39)).

Tabla 2. Microalgas empleadas en la degradación de diversos contaminante (Rawat y Ranjith Kumar, 2010).

|  |  |
| --- | --- |
| Microalgas | Tipos de aguas residuales |
| *Prototheca zopfi* | Hidrocarburos derivados del petróleo |
| *Chlorella pyrenoidosa* | Tintes azoicos en aguas residuales |
| *Chlorella sp.* | Residuos de ganadería digeridos anaeróbicame |
| *Ankistrodesmus* y *Scenedesmus* | Aguas residuales de industria del papel y alperujos |
| *Spirulina platensis* | Agua residual urbana |
| *Chlorella sokoniana* | Agua residual en heterotrofia sin luz |
| *Botryococcus braunii* | Agua residual tras tratamiento secundario |
| *Scenedesmus* | Altos niveles de amonio en efluente de digestión anaerobia |

La actual inestabilidad de los precios mundiales del petróleo ha motivado a los investigadores y empresarios para buscar alternativas de solución a las necesidades de combustible de transporte y energía. Los biocombustibles representan una prometedora alternativa a largo plazo a los combustibles derivados del petróleo, pero las materias primas actuales tienen muchos inconvenientes bien documentados, incluyendo los impactos del uso de la tierra cuestionables, escalabilidad insuficiente, reducciones mínimas netas de energía, y (GEI) de reducción de gases de efecto invernadero marginal. Los biocombustibles producidos a partir de microalgas se afirma que tienen el potencial para hacer frente a estas deficiencias sobre la base de los resultados de las evaluaciones del ciclo de vida (LCA) recientes ([Quinn. *et al.*, 2014](#_ENREF_38)).

Microalgas fotosintéticas son organismos unicelulares que, durante su cultivo, pueden fijar el dióxido de carbono de manera eficiente de diversas fuentes, incluidos los gases del aire y de escape de los procesos industriales. Esta característica puede conducir a beneficios económicos en el proceso de producción de biodiesel a través del mecanismo de desarrollo limpio, para las que puedan concederse créditos de carbono para beneficios ambientales y que contribuirán a la reducción de costes en el proceso de producción ([Soares. *et al.*, 2013](#_ENREF_44)).

## 2.4. Biomasa a partir de microalga

La parte aérea de las plantas, las cuales llevan a cabo la fotosíntesis y están por lo general en la fase de crecimiento suele denominarse biomasa verde. Ésta, contiene principalmente carbohidratos, proteínas, fibras, flavonoides, colorantes, vitaminas, hormonas, aminoácidos y enzimas pero menos almidón y lignina. La producción primaria de fotosíntesis en especies C3 en climas templados, pueden llegar a producir hasta 20 ton de materia seca y 4 ton de proteína por ha por año, mientras que las plantas C4 en climas tropicales pueden producir 80 ton de materia seca y 6 ton de proteína (Schönicke et al., 2015).

Biomasa de microalgas como materia prima para la producción de biocombustibles es una alternativa que atrae a la utilización de las plantas terrestres para la producción de biocombustibles. Sin embargo, hoy en día los sistemas de cultivo de microalgas con fines de producción de energía parece todavía no ser económicamente viable. Las microalgas, aunque cultivada bajo condiciones de estrés, tales como el inanición de nutrientes, salinidad alta, alta temperatura, etc. acumular cantidades considerables (hasta el 60-65% de peso seco) de lípidos o hidratos de carbono junto con varios metabolitos secundarios (Markou. y Nerantzis., 2013).

Los sistemas empleados con mayor frecuencia en la propagación de microalgas para la producción de biodiesel son del tipo abiertos que asemejan el entorno natural de las microalgas como lagos, lagunas y estanques. Las producciones y productividades de biomasa posibles en estos sistemas son bajas, cercanas a 1 g/l y 10-25 g/m2/d, respectivamente. Con estos bajos niveles productivos, los costos de producción son elevados, a pesar de la sencillez y el bajo costo de inversión en infraestructura, si se compara con sistemas cerrados ([Evelyn Faife Pérez  *et al.*, 2012](#_ENREF_15)).

## 2.5. Composición de lípidos de microalgas

Una moléculas de ácido graso consiste de un grupo carboxilado hidrofílico unido a un extremo de una cadena de hidrocarburo hidrofóbico. Fig. 1.



**Fig 1**. (a) Cadena de un ácido graso. El ácido graso (C18:0 o ácido esteárico) a la izquierda. Ácido graso insaturado (C18:1 o ácido oleico) a la derecha. Éste último es de isomería cis. (b) moléculas de lípidos. Triacilglicerol (lípido neutro) en la izquierda. Fosfolípidos (lípido polar) a la derecha. R´, R´´, R´´´ en las moléculas de acilglicerol representan cadenas de ácidos grasos ([Halim *et al.*, 2012](#_ENREF_19)).

## 2.6. Extracción de lípidos

Extracción de lípidos de microalgas, prestando especial atención al uso de la extracción con disolventes orgánicos y extracción con fluidos supercríticos. Se concluye con una evaluación de cómo los diferentes procesos de pretratamiento celulares pueden efectuar la extracción de lípidos de microalgas, así como una actualización sobre los últimos avances en el campo, tales como el desarrollo de un método de metilación en la extracción de lípidos de microalgas simultánea y el establecimiento de un método de extracción de lípidos de microalgas tabla 3 ([Halim. *et al.*, 2012](#_ENREF_20)).

Muestra las diferencias del contenido de aceite en algunas especies de microalgas.

Tabla 3 contenido de aceite de algunas especies de microalga.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Especie microalgas | Contenido de aceite (% del peso seco) | Productividad de lípidos (mg L -1 d -1 ) | Referencias |
| Parietochoris incisa (d) | 60 a | NR | Solovchenko et al. (2008) |
| Nannochloropsis sp. (m) | 60 a | 204 | Rodolfi et al. (2009) |
| Neochloris oleoabundans (d) | 56 a | 13.22 | Gouveia et al. (2009) |
| Chlorella vulgaris (d) | 42 a | 12.77 | Widjaja et al. (2009) |
| Crypthecodinium cohnii (m) | 41.14 a | 82 | Mendoza et al. (2008) |
| Scenedesmus obliquus (d) | 43 b | NR | Mandal y Mallick (2009) |
| Neochloris oleoabundans (d) | 38c | 133 | Li et al. (2008c) |
| Nannochloropsis sp. (m) | 28.7 c | 90 | Gouveia y Oliveira (2009) |
| Chlorella vulgaris (d) | 27 c | 127.2 | Francisco et al (2010) |
| Nanochloropsis oculata (m) | 30.7 c | 151 | Chiu et al. (2009) |
| Dunaliella (m) | 67 c | 33.5 | Takagi et al. (2006) |
| Choricystis minor (d) | 21.3 c | 82 | Mazzuca-Sobczuk y Chisti (2010) |
| Chlorella protothecoides (d) | 50.3 d | NR | Xiong et al. (2008) |
| Chlorella vulgaris (d) | 21 d | 54 | Liang et al (2009) |
| Scenedesmus rubescens (m) | 73 e | NR | Matsunaga et al (2009 |

a Cultivo bajo supresión de nitrógeno; b Cultivo bajo deficiencia de nitrógeno; c Cultivo con suficiencia de nutrientes; d cultivo heterotrófico; e Ausencia de nutrientes. m = marina y d = dulceacuícola; NR = no reportado ([Pacheco Vega Juan Manuel *et al.*, 2010](#_ENREF_32)).

## 2.7. Ultrasonido extracción de aceite asistida

El método de Folch fue adaptado para ser realizado bajo ultrasonido solicitud (Modelo-UP200S / UP400S, Hielscher-Tecnología de ultrasonido) con los procesadores que emiten energía ultrasónica entre 200 y 400 W. La biomasa (0,5 g) se mezcló y se homogeneizó con una mezcla de 20 ml de cloroformo: metanol (3: 1 v / v). La mezcla se sometió a ultrasonidos durante 10 min. Este procedimiento se realizó por triplicado ([Caroline Souza Pamplona Silva *et al.*, 2014](#_ENREF_2)).

La productividad lipídica mantuvo este mismo comportamiento observándose que el medio F/2 resulto con un valor relativamente similar al obtenido con el medio F (cuadro 4), lo cual presenta grandes ventajas desde el punto de vista de su escalamiento, pues se pudiera ahorrar la mitad de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo;

Tabla 4 Productividad de lípidos para los distintos medios de cultivo de microalga

F F2 F3 F4

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Modelo | lnX = 12.7791 +0.9067t | lnX = 12.6948 +0.9431t | lnX = 12.7975 +0.8099t | lnX = 13.1331 +0.6451t |
| Lípido (% base seca) | 25.46 | 18.52 | 16.31 | 9.16 |
| Producción promedio de lípido (mg/L/d | 15.69 | 13.82 | 10.75 | 4.76 |

Proceso de extracción de lípido por ultrasonido ([Soto León *et al.*, 2014](#_ENREF_45)).

## 2.8. Extracción de aceite asistida por microondas

Se ha realizado la extracción de lípidos utilizando sistemas de microondas (modelo Discover / Universidad-Wave, Cem Corporation), que consistía en una cámara interna cilíndrica de 75 mm de diámetro y 100 mm de altura. La biomasa (0,5 g) se transfirió a un reactor de vidrio con una capacidad de 25 mL. Una mezcla de cloroformo y metanol se utiliza como un disolvente extractor. La mezcla se mantuvo durante 1 h a 100 irradiaciones W y una temperatura constante de 60 ° C. El reactor se acopló a un condensador de reflujo para evitar pérdidas de disolvente como el vapor ([Silva. *et al.*, 2014](#_ENREF_43)).

## 2.9. Método de extracción de disolventes

El efecto de la ruptura celular en la recuperación de lípidos posterior mediante extracción con disolventes se evaluó mediante la realización de extracciones en *Chlorella sp*. Suspensiones que se rompieron en distinta medida por la alta presión de homogeneización. Descripciones de mecanismos de recuperación de lípidos fueron apoyados por la digitalización de imágenes de microscopía electrónica (SEM) de las células dañadas, con la extensión de la ruptura celular se cuantifica por recuento de células. Recuperación de lípidos por solvente monofásico la extracción se encontró que era un proceso de dos etapas ([Yap. *et al.*, 2014](#_ENREF_49)).

Eficiencias energéticas, irreversibilidades totales de proceso, el consumo de energía y la destrucción de energía se calcularon para todas las vías de extracción de aceite de microalgas basados en disolventes evaluados. Se demostró que el análisis de energía llevado a identificar la extracción de petróleo basada en hexano (HBE) como la alternativa más adecuada de las rutas asignadas para la ampliación desde el punto de vista energético, que presenta una eficiencia de exergía máximo de 51% y las pérdidas energéticos de 982.000 MJ considerando una producción de 104.000 t de aceite de microalgas por año ([Peralta-Ruiz. *et al.*, 2013](#_ENREF_36)).

Se propone el uso de metanol CO2-expandido (cxMeOH) y dióxido de carbono líquido (LCO2) para extraer los lípidos de Botryococcus braunii. Cuando el CO2 comprimido se disuelve en metanol, el disolvente se expande en volumen, disminuye la polaridad y así aumenta en su selectividad para biodiesel lípidos deseables. Extracción en fase sólida del extracto de algas mostró que la cxMeOH extrajo 21 mg de biodiesel lípidos deseables por ml de disolvente orgánico en comparación con 3 mg / mL utilizando metanol puro o mezcla de cloroformo / metanol. El LCO2 no polar mostró una alta afinidad por los lípidos no polares. Usando LCO2, es posible extraer hasta 10% de lípidos neutros con respecto a la masa de algas seco. A diferencia de las extracciones que utilizan disolventes convencionales, estos nuevos métodos requieren poco o nada de disolventes orgánicos volátiles, inflamables o clorados ([Paudel. *et al.*, 2014](#_ENREF_34)).

El uso de lípidos obtenidos a partir de biomasa de microalgas se ha descrito como una alternativa prometedora para la producción de biodiesel para sustituir petro-diesel. Se trata de etapas tales como el cultivo de microalgas, la recolección de la biomasa, la extracción y la transesterificación de los lípidos. El objetivo del presente estudio fue comparar diferentes métodos de extracción de lípidos totales. Estos métodos fueron probados en la biomasa de Chlorella vulgaris con el etanol disolventes, hexano y una mezcla de cloroformo: metanol en proporciones de 1: 2 y 2: 1. Los disolventes se asocian con otros mecanismos de la ruptura celular, tales como el uso de un homogeneizador Potter y el ultrasonido tratamiento. El porcentaje de triglicéridos en los lípidos totales se determinó por el método de glicerol-3-fosfato oxidasa-p-clorofenol (K117 triglicéridos nomoreagent; BIOCLIN). Entre los métodos probados, la mezcla de cloroformo: metanol (2: 1), asistido por ultrasonido fue más eficiente, extraer un promedio de 19% de lípidos totales, de los cuales 55% son los triglicéridos. El análisis por cromatografía de gases no mostró diferencias en los perfiles de ésteres metílicos de aceites obtenidas mediante los diferentes métodos ([Santos. *et al.*, 2015](#_ENREF_42)).

## 2.10. Extracción con CO2 supercrítico

El *sp* microalga *Nannochloropsis*. Se utilizó en este estudio, en un contexto de biorrefinería, como materia prima de biomasa para la producción de ácidos grasos para el biodiesel, biohidrógeno y compuestos de alto valor añadido. La biomasa de microalgas, que tiene un alto contenido en lípidos y pigmento (principalmente carotenoides), se sometió a extracción con CO2 supercrítico. Se evaluó la temperatura, presión y velocidad de flujo de disolvente para comprobar su efecto sobre el rendimiento de extracción. Las mejores condiciones operativas para extraer 33 g de lípidos / se encontraron 100 g de biomasa seca para ser a 40 C, 300 bares y un caudal de CO2 de 0,62 g / min. También se estudió el efecto de la adición de un co-disolvente (etanol). Cuando el CO2 supercrítico dopado con 20% (w / w) se utilizó etanol, era posible extraer 45 g de lípidos / 100 g de biomasa seca de lípidos y recuperar 70% de los pigmentos. Además, la biomasa restante después de la extracción se utilizó eficazmente como materia prima para producir biohidrógeno través de la fermentación oscuro por Enterobacter aerogenes que resulta en un rendimiento de producción de hidrógeno de 60,6 ml / g de biomasa seca ([Nobre. *et al.*, 2013](#_ENREF_31)).

## 2.11. Métodos químicos para la extracción de aceite

Los métodos químicos de extracción de lípidos son la extracción Soxhlet, extracción con fluidos supercríticos, acelerada extracción por solvente y métodos mecánicos son expulsor del aceite, asistida por microondas de extracción, la extracción asistida por ultrasonido. Este artículo es una revisión de los diferentes métodos utilizados para la extracción de aceites o lípidos a partir de biomasa de microalgas para la producción de biodiesel. Se observa que el rendimiento de la extracción de lípidos a partir de microalgas se podría aumentar mediante el uso de métodos de pre tratamiento, tales como ultrasonidos y técnicas asistidas por microondas junto con la extracción por solvente ([Mubarak. *et al.*, 2014](#_ENREF_30)).

Los resultados obtenidos bajo este método se presentan en la tabla 5. Los rendimientos obtenidos se tomaron como datos de control, es decir, se considerarán como punto de partida para comparar el desempeño obtenido con los demás métodos. Como se explicó en el capítulo anterior para este método sólo se realizaron dos pruebas por ensayo.

Tabla 5 Determinación de lípidos en Ccal, Dun y Nanno: extracción con hexano – método Soxhlet (Pérez, 2012).

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Masa de cada muestra: 2,5 g en Ccal y Dun; 5 g en Nanno | | | |  |  |
| Cepa | muestra | lipidos (g) | % de lipidos | | Prom. |
| *Chaetoceros calcitrans* | C1 | 0,25890 | 10.36 |  |  |
|  | C2 | 0,25650 | 10.26 |  | 10,31 |
| *Dunnaliella tertiolecta* | D1 | 0,31530 | 12.61 |  |  |
|  | D2 | 0,31800 | 12.72 |  | 12,67 |
|  | N1 | 0,31920 | 6.38 |  |  |
| *Nannochloropsis sp.* | N2 | 0,31530 | 6.31 |  | 6,35 |

La caracterización de la biomasa fue realizada por el Instituto Colombiano del Petróleo (ICP), los datos se presentan en la Tabla 6 los cuales son porcentajes en base seca. Cabe resaltar que el alto porcentaje de cenizas se debe al floculante empleado, el cual afecta negativamente el contenido propio de los metabolitos de las microalgas.

Tabla 6 Composición Química de los géneros de microalgas

**Composición Química [%p]**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Genero | Nitrógeno | Proteína | Cenizas | Material polisacárido de microalga | Lípidos |
| *Navicula sp.* | 3,2 | 15,1 | 51,6 | 5,3 | 13,2 |
| *Amphiprora sp.* | 2,1 | 10,0 | 52,8 | 10,3 | 12,0 |

([Peñaranda Rincón Laura Antonia *et al.*, 2011](#_ENREF_35)).

## 2.12. La extracción de aceite a partir de biomasa húmeda

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un método escalable para extraer el SLS de biomasa húmeda de microalgas con hexano, y para su posterior transformación en biodiesel SL de estos (FAME). El HPH se ensayó como el único pre-tratamiento de la biomasa de microalgas, con alto contenido de agua (86% en peso de agua). En la búsqueda de un proceso económicamente viable, se utilizaron baja temperatura (aproximadamente la temperatura ambiente, 20-22°C) y la cantidad mínima de hexano. Se utilizaron dos lotes de biomasa de diferente composición lipídica, y con el fin de comparar los lípidos extraídos, se informaron los datos importantes para la calidad del biodiesel ([Callejón. *et al.*, 2014](#_ENREF_1)).

Se propone un nuevo procedimiento-cloroformo libre para la producción eficiente de biodiesel a partir de microalgas húmedo. Biodiesel crudo se produce a través de la extracción con hexano después de transesterificación asistida por microondas (EHMT) de los lípidos en microalgas húmedo. Efectos de diferentes parámetros, incluyendo la temperatura de reacción, tiempo de reacción, la dosificación de metanol, y la dosificación de catalizador, de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) el rendimiento se investigan. El rendimiento de FAME extraído en el hexano de la microalgas húmeda se incrementó 6 veces después de la transesterificación de los lípidos ([Cheng. *et al.*, 2014](#_ENREF_3)).

## 2.13. Efecto del pretatamiento sobre la extracción de lípidos a partir de microalgas

Extracción del aceite a partir de células de microalgas es un procedimiento importante y costoso, que a menudo implica el uso de disolventes tóxicos. El uso de extracción con disolvente requiere entrada de energía adicional para recuperar los disolventes, y tiene el potencial de contaminar los sólidos de algas, restringiendo así opciones para su uso final. El contacto entre el material celular a extraer y el disolvente puede ser determinante a la cantidad de los productos extraídos (Iqbal. y Theegala., 2013).

Disrupción celular eficiente es crítico para la recuperación de lípidos a partir de microalgas para la producción de biodiesel. La ruptura de *Chlorella sp*. Y *Navicula sp*. Por homogeneización a alta presión (HPH) después ácida (HCl, a pH 1,5) y térmica (hasta 123 ° C) pretratamiento fue investigado cuantitativamente (recuento de células) y cualitativamente mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

# 

# CAPITULO III

## MATERIALES Y MÉTODOS

## 3.1. Ubicación del experimento

El presente trabajo se llevará a cabo en las Instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna Durante el periodo Marzo−Noviembre del 2015, ubicada en los 25° 55´ latitud norte y 103° 37´ longitud oeste con una altura de 1127 metros sobre el nivel del mar. Se utilizaron las instalaciones de los Laboratorios de Agroecología, Riego y Drenaje y Suelos.

## 3.2. Fotobiorreactor al aire libre

Un fotobiorreactor: Es un sistema cerrado dedicado a producir biomasa fotoautotrófica, donde la energía es administrada por luz artificial. Éste, está diseñado para cultivar biomasa microbiana fotosintética, como las de microalgas y cianobacterias (López-Sánchez y Moráles-Narvaez, 2006).

El diseño del biorreactor está formado de tambos de plásticos con capacidad de 200 litro de agua residual, está conectada a manguera de 100 metros de largo con un diámetros de ¼ con capacidad de 25 litros, la manguera está fijada en una base metálica con una altura de 2 metros. Se le conecto una bomba para que bombeara el agua residual para obtener un mayor rendimiento de microalgas (Figura 2).

**Figura 2**. Fotobiorreactores empelados en el estudio.

## 3.3. Modo operativo

El fotobiorreactor exterior fue operado como un quimiostato. Se preparó el tanque de 200 L utilizando 2/3 de agua residual por 1/3 de agua con microalgas obtendias de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Torreón, del Sistema Municipal de Aguas y Saneamiento (SIMAS).

## 3.4. Modelo matemático del sistema

Nomenclatura.

h = Altura (m)

r = radio de una esfera de gas (m)

t= tiempo (s)

rmc = Densidad del medio de cultivo (Kg m-3)

rg = Densidad del gas (Kg m-3)

Dr = Gradiente de densidad (Kg m-3)

Pg = Presión del gas (Kg m-1s-2)

Vg = velocidad del gas (m s-1)

ag = Aceleración del gas (m s-2)

Fg = Fuerza de una burbuja de gas (Kg m s-2)

g = Constante de aceleración de la gravedad (ms-2)

## 3.5. Evaluación de la floculación por microalgas

Para el ensayo de floculación los cultivos de micro algas fueron agitados para dispersar las células y 3 mL de la suspensión de células fueron colocados dentro de celdas espectrofotométricas desechables de 10x10 mm para medir la densidad óptica (D.O.) a 690 nm por medio de una muestra de la suspensión de células tomada a una profundidad de 4 cm de la superficie, la cual fue designada como A. Despues los tubos de ensayo se dejaron reposar por 30 min, y otros 3 mL de la suspensión de células fue tomada para una segunda medición a una D.0. 690 nm la cual fue designada como B. La eficiencia de floculación F fue calculada por la ecuación (Alam *et al*., 2014):

% F= (1-B/A)\*100

La evaluación de la floculación de las microalgas fue realizada a temperatura de laboratorio y no fueron agregados iones metálicos durante el experimento de floculación a excepto de los especificados.

Los valores de pH fueron ajustados a un rango 7.0 usando HCl o NaOH a 5 mM. Sales metálicas de AlSO4 a concentraciones de 0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 y 1.0 mg/L fueron probadas como coagulantes catiónicos y un polímero, a las mismas concentraciones, se evaluaron diferentes velocidades (RPM) y tiempo en el equipo de jarras, las pruebas se realizaron por duplicado con un volumen de 600 mL.

## 3.6. Concentración de biomasa (gL-1)

La concentración de biomasa fue estimada diariamente por mediciones de peso seco de las muestras de las aguas residuales con la mezcla. Se flocularon muestras de 1L y se filtraron empleando un embudo Buchner con papel filtro Whatman No. 1 previamente pesado. Se dejó filtrar completamente por 24 y posteriormente el filtrado se colocó en estufa a 68 ºC por 24 h a peso constante. Por diferencia del peso del papel previamente pesado se obtiene la biomasa expresada en gL-1.

## 3.7. NMX-AA-005-SCFI-2013 Análisis de agua – Medición de grasas y aceites recuperables en aguas naturales, residuales y residuales tratadas – Método de prueba (CANCELA A LA NMX-AA-005-SCFI-2000).

### 3.7.1. Grasas y aceites

Son los compuestos orgánicos constituidos principalmente por ácidos grasos de origen animal y vegetal, así como de hidrocarburos del petróleo que son extraídos de la muestra utilizando hexano como solvente.

### 3.7.2. Masa constante

Es la masa que se registra cuando el material ha sido calentado, enfriado y pesado hasta obtener una diferencia < 0,000 5 g en dos ciclos consecutivos.

### 3.7.3. Reactivos y patrones

Todos los productos químicos usados en este método deben ser grado reactivo, a menos que se indique otro grado. Cuando se indique agua debe entenderse agua que cumpla con las siguientes características: a) Conductividad: 5,0 μS/cm máx a 25 °C; b) pH: 5,0 a 8,0.

a) Ácido clorhídrico concentrado (HCl); b) hexano (C6H14);

c) ácido sulfúrico concentrado (H2SO4);

d) suspensión de tierra de diatomeas-sílice: de aproximadamente 10 g/L de agua;

e) ácido clorhídrico (1:1): mezclar volúmenes iguales de ácido clorhídrico concentrado y agua;

f) ácido sulfúrico (1:1): mezclar volúmenes iguales de ácido sulfúrico concentrado y agua;

g) aceite de referencia: preparar una mezcla de grasas y aceites pesando cantidades aproximadamente iguales de aceite mineral y vegetal mixto comercialmente disponibles, acorde a la concentración requerida de grasas y aceites, y agregar la mezcla pesada a 1 L de agua, preservar de acuerdo a 8.3, y

h) sílica gel o agente desecante con indicador colorido de humedad.

### 3.7.4. Materiales

a) Cartuchos de extracción de celulosa;

b) papel filtro con tamaño de poro medio;

c) trozos de papel filtro o algodón;

d) embudo Büchner y matraz kitazato;

e) probeta graduada de 1 L con divisiones de al menos 10 mL;

f) pinzas, y

g) desecador.

### 3.7.5. Equipo

a) Equipo de extracción por recirculación del solvente;

b) bomba de vacío u otra fuente de vacío;

c) horno de secado capaz de mantener 103 °C + 2 °C; u otro dispositivo;

d) balanza analítica calibrada, con una resolución de 0,1 mg;

e) parrilla o manta de calentamiento, y

f) se permite el uso de equipos comerciales automatizados para la extracción.

## 3.7.6. Recolección, preservación y almacenamiento de muestras

**3.7.6.1** De la superficie del cuerpo de agua colectar un volumen de aproximadamente 1 L de muestra en un frasco de vidrio de boca ancha y tapa con contratapa de plástico o metálica. No se permite la colecta de una muestra compuesta. Dado que la muestra entera se ocupa en esta prueba, no se pueden tomar alícuotas de la muestra para realizar otro tipo de análisis.

**3.7.6.2.** En caso de existir la presencia de aceites emulsionados en el agua a muestrear, la muestra se toma de 20 cm a 30 cm de profundidad, en el sitio con menor turbulencia para asegurar una mayor representatividad.

**3.7.6.3.** La muestra debe preservarse por acidificación con ácido clorhídrico 1:1 ó ácido sulfúrico 1:1 a un valor de pH de dos o menor y refrigerarla de 4 °C ± 2 °C. Para muestras con un pH menor de 8, generalmente es suficiente con adicionar 5 mL. Para aquellas muestras con pH superior a 8 agregar ácido concentrado para evitar la dilución de la muestra.

**3.7.6.4.** Evitar llenar el frasco completamente para evitar pérdida de grasas y aceites.

**3.7.6.5.** El tiempo máximo de almacenamiento previo al análisis es de 30 días.

## 3.7.7. Control de calidad

Cada laboratorio que utilice este método debe operar un programa de control de calidad en referencia a la norma mexicana NMX-AA-115-SCFI-2001 (véase 3 Referencias).

## 3.7.7.1. Referencias

Para la correcta aplicación de esta norma mexicana se deben consultar las siguientes normas mexicanas vigentes o las que las sustituyan:

**NMX-AA-089/1-SCFI-2010**

Protección al ambiente - Calidad del agua - Vocabulario - Parte 1. (Cancela a la NMX-AA- 089/1-1986). Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 03 de marzo de 2011.

**NMX-AA-089/2-SCFI-2010**

Protección al ambiente - Calidad del agua - Vocabulario - Parte 2. (Cancela a la NMX-AA- 089/2-1992). Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 29 de agosto de 2013.

**NMX-AA-115-SCFI-2001**

Análisis de agua – Criterios generales para el control de la calidad de resultados analíticos. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 17 de abril de 2001.

## 3.7.8. Procedimiento

**3.7.8.1.** Medir el pH de las muestras el cual debe ser de dos o menor, si no tiene este valor acidifique con ácido clorhídrico 1:1 o ácido sulfúrico 1:1.

**3.7.8.2.** Para muestras con un pH menor de 8, generalmente es suficiente con adicionar 5 mL de ácido clorhídrico 1:1 ó 2 mL de ácido sulfúrico 1:1; para aquellas muestras con pH superior a 8 agregar ácido concentrado para evitar la dilución de la muestra.

**3.7.8.3.** Preparar los matraces de extracción introduciéndolos al horno a una temperatura de 103 °C ± 2 °C, enfriar en desecador y pesarlos, repetir el procedimiento hasta obtener una diferencia de < 0,000 5 g en dos ciclos consecutivos; para los cálculos utilizar el último valor de la masa.

**3.7.8.4.** Preparar el material filtrante colocando un papel filtro en el embudo Büchner, colocar el embudo en un matraz Kitazato y agregar 100 mL de la suspensión de tierra de diatomeas-sílice sobre el filtro, aplicar vacío y lavar con al menos 100 mL de agua.

**3.7.8.5.** Transferir el total de la muestra acidificada al embudo Büchner preparado, aplicando vacío hasta que cese el paso de agua. Para determinar el volumen inicial de la muestra vierta el filtrado en una probeta de 1 L.

**3.7.8.6.** Con ayuda de unas pinzas, transferir el material filtrante a un cartucho de extracción. Limpiar las paredes internas del embudo y el frasco contenedor de la muestra, así como la contratapa del frasco con trozos de papel filtro o algodón previamente impregnados de disolvente (hexano), tener cuidado en remover la película de grasa y los sólidos impregnados sobre las paredes; colocar los trozos de papel o algodón en el mismo cartucho.

**3.7.8.7.** Secar el cartucho en el horno a 103 °C + 2 °C, por un período de 30 minutos mínimo; transcurrido este período colocar en el equipo de extracción.

10.8 Adicionar el volumen adecuado de hexano al recipiente de extracción previamente puesto a masa constante y preparar el equipo de extracción. Evitar tocar con las manos el cartucho y el recipiente de extracción, para ello utilizar pinzas o guantes de látex.

**3.7.8.9.** Colocar el equipo de extracción sobre la parrilla de calentamiento, controlar la temperatura del reflujo y extraer a una velocidad de 20 ciclos/hora durante un período de 4 h, el cual se contabiliza a partir del primer reflujo del n-hexano en el equipo de extracción.

**3.7.8.10.** Una vez terminada la extracción recuperar la mayor cantidad del disolvente y evaporar el remanente.

**3.7.8.11.** El recipiente de extracción libre de disolvente se coloca en el desecador hasta que alcance la temperatura ambiente.

**3.7.8.12.** Pesar el recipiente de extracción y por diferencia de masa medir las grasas y aceites recuperables.

**3.7.8.13.** Analizar una muestra control de calidad (la cual fue preparada como se indica en el capítulo 3.7.3.) y un blanco de reactivo, bajo las mismas condiciones de la muestra.

## 3.7.9. Cálculos

**3.7.9.1.** Calcular las grasas y aceites recuperables (GYA) en la muestra usando la siguiente ecuación:

Dónde:

GYA las grasas y aceites recuperables, en mg/L;

mf es la masa del recipiente de extracción con el residuo, en mg;

mi es el valor de la masa constante del recipiente de extracción vacío, en mg;

Vm es el volumen de la muestra, en L, y Blanco es el valor del blanco de reactivo, en mg/L.

**3.7.9.2.** Reportar los resultados del análisis, en mg/L En caso de requerir reportar la media ponderada de grasas y aceites el laboratorio deberá calcular ésta, en función del caudal de la n muestras simples tomadas.

## 3.7.10. Interferencias

**3.7.10.1.** Los hexanos tienen la facilidad de disolver no solamente las grasas y aceites minerales y vegetales, sino también otras sustancias como azufre elemental, tintes y otros compuestos orgánicos.

**3.7.10.2.** Existen pérdidas importantes de hidrocarburos de cadena corta y aromáticos simples con puntos de ebullición menores a 150 °C.

**3.7.10.3.** Puede obtenerse interferencia positiva durante el secado del residuo debido a la adsorción de humedad si no se utiliza un desecador.

## 3.8. Variables de estudio del agua residual

Las variables de estudio son los aspectos o atributos que nos interesa conocer de nuestro modelo de estudio. Las determinaciones realizadas en el presente trabajo fueron:

* pH (concentración de iones hidrogeniones)
* Conductividad eléctrica (C.E. mScm-1)
* Sólidos totales (ST, mgL-1)
* Sólidos totales volátiles (STV, mgL-1)
* Demanda química de oxígeno (DQO, mgL-1)
* Nitrógeno (N, mgL-1)
* Fósforo (P, mgL-1)
* Coliformes fecales por número más probable (NMP 100 mL-1).

## 3.8.1 pH

El pH es la concentración de iones de hidrogeno en una muestra. La medición del pH del agua es importante debido a que valores altos o bajos son tóxicos para los organismos acuáticos, ya sea directamente o indirectamente. Es un parámetro relevante utilizado en la evaluación de las propiedades corrosivas de un medio ambiente acuático.

### 3.8.1.1. Determinación de pH:

Se midió el pH a las muestras de aguas residuales con el potenciómetro Denver Instrument UltraBASIC. Se calibró según las instrucciones del manual, se utilizaron tres puntos de calibración ([DOF, 2011](#_ENREF_8)).

Se lavó el electrodo con agua y se sumergió en la muestra, se agitó la muestra, se dejó reposar y se registró la lectura.

## 3.8.2 Conductividad Eléctrica (CE)

La CE es una expresión numérica de la capacidad de una solución para transportar una corriente eléctrica. Esta capacidad depende de la presencia de iones, de su concentración total, de su movilidad, valencia y concentraciones relativas, así como de la temperatura.

### 3.8.2.1. Determinación de CE:

Se determinó según Norma Mexicana ([DOF, 2000](#_ENREF_8)). Se encendió el equipo y se realizó la calibración para su uso de acuerdo al manual del equipo HANNA HI 993310. Las muestras y la disolución de calibración se mantuvieron a temperatura ambiente. Se enjuagó el electrodo antes de realizar la medición para evitar contaminación de la muestra por electrolitos. Se sumergió el electrodo en la muestra, se agitó, se dejó reposar. Una vez estabilizada la lectura, se anotó el valor de conductividad. Se reportaron los resultados como micromhos/cm.

## 3.8.3. Sólidos totales (ST)

Se define a los sólidos totales como la suma de los sólidos suspendidos totales, sales disueltas y materia orgánica.

### 3.8.3.1. Determinación de sólidos totales (ST):

La determinación de ST se realizó conforme a lo establecido en el proyecto de Norma Mexicana ([DOF, 2012](#_ENREF_13))

En función de la cantidad de sólidos probables se pesó una cantidad de muestra a temperatura ambiente previamente homogenizada de 20 ml que contuvo como mínimo 25 mgL-1 de sólidos totales, (Se seleccionó el volumen de muestra de tal manera que el residuo seco sobre la cápsula estuviera en un intervalo de masa de 2.5 – 200 mg).

Se transfirió 20 ml de la muestra a una cápsula de porcelana (previamente puesta a peso constante registrado como m1). Se secó la muestra en la estufa (MAPSA HDT-18) hasta alcanzar una temperatura de 103°C – 105°C por 24 horas. Se transfirió al desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente y se determinó su peso (m2).

Se calculó el contenido de sólidos totales de las muestras como:

ST= (m2-m1)/V

Dónde:

*ST:*  Son los sólidos totales, en mgL-1;

*m2:* es la masa de la cápsula con el residuo, después de la evaporación, en mg;

*m1:* es la masa de la cápsula vacía a peso constante, en mg

*V:* es el volumen de muestra, en L.

## 3.8.4 Sólidos totales volátiles (STV)

Los STV es la cantidad de materia orgánica (incluidos aquellos inorgánicos) capaz de volatilizarse por el efecto de la calcinación a (550 ± 50) °C en un tiempo de 15

a 20 min.

Determinación de sólidos totales volátiles (STV):

Se introdujo la cápsula conteniendo el residuo de ST a la mufla (Thermolyne 4800) a 550°C ± 50°C durante 15 min a 20 min, se transfirió la cápsula a la estufa a 103°C - 105°C aproximadamente por 20 min, se enfrió la cápsula a temperatura ambiente en el desecador y se determinó su peso registrado como m3.

Se calculó el contenido de sólidos totales volátiles de las muestras como:

STV= (m3-m2)/V.

Dónde:

STV: es la materia orgánica total, en mgL-1;

M3: es la masa de la cápsula con el residuo, después de la calcinación, en mg;

M2: es la masa de la cápsula con el residuo, después de la evaporación, en mg;

V: es el volumen de muestra, en L.

Se utilizaron cinco repeticiones para reducir el coeficiente de variación al 5%.

## 3.8.5. Demanda Química de Oxígeno (DQO)

Se entiende por DQO, la cantidad de materia orgánica e inorgánica en un cuerpo de agua susceptible de ser oxidada por un oxidante fuerte ([DOF, 2001d](#_ENREF_12)).

### 3.8.5.1. Determinación de la DQO:

La DQO se realizó siguiendo las especificaciones del manual de procedimientos del colorímetro HATCH DR/890.

Se tomó una muestra de 50 ml de la parte aerobia del biorreactor, después se licuó la muestra por dos minutos para llegar a la homogenización total de la materia orgánica.

Se tomaron dos mililitros con una pipeta automática, se vierten en un vial y agitan por 10 segundos en vortex. El análisis se realizó por duplicado.

Posteriormente se introdujo la muestra en el digestor HACH DR/890 a 150°C por 120 minutos.

Enseguida se enfriaron los tubos a temperatura ambiente y se realizó la lectura en el colorímetro HACH DR/890.

## 3.8.6. Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO)

La DBO Es una estimación de la cantidad de oxígeno que requiere una población microbiana heterogénea para oxidar la materia orgánica de una muestra de agua en un periodo de 5 días.

El método se basa en medir el oxígeno consumido por una población microbiana en condiciones en las que se ha inhibido los procesos fotosintéticos de producción de oxígeno en condiciones que favorecen el desarrollo de los microorganismos ([DOF, 2001b](#_ENREF_10)).

### 3.8.6.1. Determinación de la DBO:

Ésta se obtuvo a partir de la DQO multiplicada por un factor de conversión de 0.9.

## 3.8.7. Nitrógeno (N)

Debido a que el nitrógeno es un nutriente esencial para organismos fotosintéticos, es importante el monitoreo y control de descargas del mismo al ambiente.

Los compuestos nitrogenados se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Las fuentes de nitrógeno incluyen además de la degradación natural de la materia orgánica, fertilizantes, productos de limpieza y tratamiento de aguas potables ([DOF, 2001a](#_ENREF_9)).

Determinación de Nitrógeno:

La determinación de nitrógeno total se realizó de acuerdo a las especificaciones del manual de procedimientos del colorímetro HATCH DR/890.

Se tomó una muestra de 50 ml de la parte aerobia del biorreactor, después se licuó la muestra por dos minutos para llegar a la homogenización total de la materia orgánica.

Se tomaron cinco mililitros de muestra y se transfirieren a un vial. Se agitó por 10 segundos en vórtex. El análisis se realizó por duplicado.

Después se pasó la muestra al digestor HACH DR/890 a 105°C por 30 minutos.

Enseguida se enfriaron los tubos a temperatura ambiente y se realizó la lectura en el colorímetro HACH DR/890.

## 3.8.8. Fósforo (P)

El fósforo es un nutriente esencial para el crecimiento de organismos, por lo que la descarga de fosfatos en cuerpos de aguas puede estimular el crecimiento de macro y microorganismos fotosintéticos en cantidades nocivas.

El fósforo generalmente se encuentra en aguas naturales, residuales y residuales tratadas como fosfatos. Éstos se clasifican como orto fosfatos, fosfatos condensados y compuestos órgano fosfatados. Estas formas de fosfatos provienen de una gran cantidad de fuentes, tales como productos de limpieza, fertilizantes, procesos biológicos, etc. ([DOF, 2001c](#_ENREF_11)).

Determinación de Fósforo:

La determinación de fósforo total se realizó de acuerdo a las especificaciones del manual de procedimientos del colorímetro HATCH DR/890.

Se tomó una muestra de 50 ml. De la parte aerobia del biorreactor, después se licuó la muestra por dos minutos para llegar a la homogenización total de la materia orgánica.

Se tomaron 5 mililitros con una pipeta automática, se vaciaron en el vial y se agitó por 10 segundos en un vortex cada tubo. El análisis se realizó por duplicado.

Después se introdujo la muestra en el digestor HACH DR/890 a 105°C por 30 minutos.

Cumplido el tiempo del digestor, se enfriaron los tubos a temperatura ambiente y se realizó la lectura en el colorímetro HACH DR/890.

## 3.8.9. Coliformes Fecales por número más probable (NMP/100mL-1)

Número Más Probable: también llamada técnica de dilución en tubo, proporciona una estimación estadística de la densidad microbiana presente con base a que la probabilidad de obtener tubos con crecimiento positivo disminuye conforme es menor el volumen de muestra inoculado.

Coliformes fecales: son bacilos Gram negativos, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos que a 35°C fermentan la lactosa con la producción de gas bajo las condiciones especificadas en la Norma.

Determinación de Coliformes Fecales por N.M.P.:

Se determinó el número más probable en base a la Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994.

Se realizó la dilución de la muestra agitándola previamente y transfiriéndola a volúmenes de 1 ml de muestra a cada uno de los 3 tubos para obtener las respectivas diluciones de x10-1, x10-2 y x10-3.

Para la muestra presuntiva se realizó el muestreo por triplicado.

Para la inoculación se tomaron tres tubos de concentración 1.5 de caldo lactosado marca Bioxon y se inoculó con una pipeta automática 1 ml de la primera dilución (dilución 0.1 previamente agitada con un vortex) a cada uno de los tubos de caldo lactosado.

Para la siguiente inoculación se tomaron tres tubos a concentración normal de caldo lactosado y se inoculó con una pipeta automática 1 ml de la segunda dilución (dilución 0.01 previamente agitada con un vortex) a cada uno de los tres tubos de caldo lactosado.

Se incubaron los tubos a 35 ± 5 °C por 24 ± 2 horas y se observó si hubo o no formación de gas, en caso contrario, se prolongó la incubación hasta 48 ± 2 horas.

Prueba confirmativa

De cada tubo que mostró formación de gas, se tomó 1 ml con una pipeta automática y se inoculó en un tubo con caldo de confirmación BRILA marca Bioxon al 2%. Se incubó a 35 ± 5 °C por 24 ± 2 horas o si la formación de gas o se observa en ese tiempo, prolongar la incubación por 48 ± 2 horas.

Para la expresión de los resultados se tomó la serie de tubos de la prueba confirmativa que dio formación de gas después del periodo de incubación requerido y se buscó NMP en los cuadros correspondientes.

Índice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos; como se muestra en la tabla 7 (diluciones 0.1, 0.01 y 0.001 g).

Tabla 7 Resultados de NMP, con tres diluciones por triplicado

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Combinación  de positivos | Índice del  NMP por g | 95% límites  de confianza | |
|  |  | Bajo | Alto |
| 0-0-0 | <3 | <0.5 | <9 |
| 0-0-1 | 3 | <0.5 | 9 |
| 0-1-0 | 3 | <0.5 | 13 |
| 0-2-0 | --- | --- | --- |
| 1-0-0 | 4 | <0.5 | 20 |
| 1-0-1 | 7 | 1 | 21 |
| 1-1-0 | 7 | 1 | 23 |
| 1-1-1 | 11 | 3 | 36 |
| 1-2-0 | 11 | 3 | 36 |
| 2-0-0 | 9 | 1 | 36 |
| 2-0-1 | 14 | 3 | 37 |
| 2-1-0 | 15 | 3 | 44 |
| 2-1-1 | 20 | 7 | 89 |
| 2-2-0 | 21 | 4 | 47 |
| 2-2-1 | 28 | 10 | 150 |
| 2-3-0 | --- | --- | --- |
| 3-0-0 | 23 | 4 | 120 |
| 3-0-1 | 39 | 7 | 13 |
| 3-0-2 | 64 | 15 | 380 |
| 3-1-0 | 43 | 7 | 210 |
| 3-1-1 | 75 | 14 | 230 |
| 3-1-2 | 120 | 30 | 380 |
| 3-2-0 | 93 | 15 | 380 |
| 3-2-1 | 150 | 30 | 440 |
| 3-2-2 | 210 | 35 | 470 |
| 3-3-0 | 240 | 36 | 130 |
| 3-3-1 | 460 | 71 | 240 |
| 3-3-2 | 1100 | 150 | 480 |
| 3-3-3 | >1100 | >150 | >480 |

# 

# CAPÍTULO IV

# RESULTADOS Y DISCUSION

## 4.1. Preliminares

Primeras pruebas 10 de abril del 2015.

Se tomaban diferentes muestra, inicialmente se tomaron cinco litros de agua residual obteniendo un peso seco de 1.0795 g/5 L, generando una biomasa promedio de 359 mgL-1. Se realizó una segunda prueba en el que se tomaron 10 L del fotobiorreactor con un peso seco de 1.4187 g/10L promediando la biomasa 141.8 mgL-1. Finalmente, se tomaron 15 L obteniendo un peso seco de 2.3021 g/15 L promediando la biomasa 153.4mg L-1. Estas pruebas se realizaron con la finalidad de observar el efecto de adaptación de las microalgas al sistema de biorreactor en el tiempo y la fuente de inóculo utilizada.

**Fecha en la que toma la segunda prueba fue del 07 mayo del 2015.**

La hora en que se tomó la muestra fue a las 9:5 A.M.

Se tomaron tres L, se determinaron los parámetros de pH, C.E, peso de solidos totales y temperatura. Esto con la finalidad de estimar los coeficientes de variación en el manejo de los parámetros. Los límites de confianza se establecieron en un 7.5% de variación entre los datos.

Conductividad eléctrica (C.E.) = 1492 Scm-1

pH= 7.82 Temperatura = 25°C

## 4.2. Caracterización de aguas residuales de San Pedro Coahuila

En el tabla 8 se presentan las características del agua residual de la ciudad de San pedro, Coahuila. De los valores que se presentan en el tabla 8 se puede apreciar que el agua es ligeramente alcalina (pH 7.33) y con salinidad de media a alta (1.6 mS cm-1) y valores altos de coliformes fecales (1,100 NMP 100 mL-1), estos resultados concuerdan con lo que se espera de una agua residual doméstica (Rawat et al., 2011) y de reusó para riego agrícola (Tunc y Sahin, 2015).

Tabla 8 Características del agua residual de San Pedro

|  |  |
| --- | --- |
| Aguas Residuales | PROMEDIO |
| pH | 7.33 |
| C.E Scm-1 | 1600 |
| SST mgL-1 | 1786.6 |
| SSV mgL-1 | 9.4 |
| N total mgL-1 | >140 |
| P total mgL-1 | ND |
| Coliformes fecales | 1,100 NMP 100 mL-1 |
| DQO mgL-1 | 13 |

ND= no determinado

## 4.3. Estudios preliminares de floculación

En el cultivo de microalgas la cosecha es un elemento clave en los costos de producción, por lo que encontrar métodos económicos para ésta, es importante. La floculación empleando floculantes y aglutinantes de bajo costo es fundamental ([de Godos *et al.*, 2011](#_ENREF_5)).

En el presente estudio se realizaron determinaciones del porcentaje de floculación empleando AlSO4 a (0.1%). Se realizaron pruebas a diferentes concentraciones y con un volumen de jarras a 500 ml. Es mayor al porcentaje de floculación que se utilizaron para trabajar en los estudios posteriores y para la obtención de biomasa de microalgas (tabla 11).

Nuestros resultados, son superiores a los que se reportan en la literatura ([de Godos *et al.*, 2011](#_ENREF_5); [Vandamme *et al.*, 2012](#_ENREF_47)), tanto en el porcentaje, como en las concentraciones del floculante y aglutinante utilizados, en nuestro estudio fue de 10 mgL-1 contra 150-250 y 25 a 50 mgL-1  respectivamente.

Tabla 9 . Resultado de ensayos de pruebas de floculación con concentraciones previamente definidas

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Muestra  Tiempo | Concentración  (%) y Vol. Solución | % |
| T0 | AlSO4 (0.1%). 1.5. mL | 48.26 |
| Polimero (0.1%) 1.5. mL |  |
| T3h | AlSO4 (0.1%). 1.5. mL | 92.55 |
| Polimero (0.1%) 1.5. mL |  |
| T0 | AlSO4 (0.1%). 2.0. mL | 68.5 |
| Polimero (0.1%) 1.5. mL |  |
| T3h | AlSO4 (0.1%). 2.0. mL | 98.1 |
|  | Polimero (0.1%) 1.5. mL |  |

## 4.4. Contenido de aceite con un método de extracción con solvente

Los resultados expresan el porcentaje de lípidos presentes en las microalgas, la determinación química de los lípidos acumulados se realiza gravimétricamente, tomando como lípidos el remanente obtenido tras la evaporación del solvente utilizado.

Por cada ensayo realizado se presenta en cuadros con los resultados obtenidos, señalando el método aplicado. Los valores promedio se utilizan para determinar el rendimiento alcanzado por ensayo.

## 4.5. Extracción con hexano

### 4.5.1. Extracción con Soxhlet

Los resultados obtenidos bajo este método se presentan en la tabla 12 y 13. Los rendimientos obtenidos se tomaron como datos de control, es decir, se considerarán como punto de partida para comparar el desempeño obtenido con los demás métodos. Para este método sólo se realizaron dos pruebas por ensayo.

Tabla 10 Pesos constantes de matraces de grasas y aceites utilizados para las determinaciones de extracción de aceite de biomasa de microalga.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| identificación del matraz | PA (g) | PB (g) | Diferencia | PI |
| X | 111.2715 | 111.2715 | 0 | 111.2715 |
| 107 | 106.6309 | 106.6308 | 0.0001 | 106.6308 |
| S | 103.6746 | 103.6742 | 0.0004 | 106.6742 |
| 101 | 112.7649 | 112.7651 | 0.0002 | 112.7651 |
| T | 107.4815 | 107.4819 | 0.0004 | 107.4819 |
| 79 | 107.4911 | 107.4911 | 0 | 107.4911 |
| 112 | 107.4942 | 107.4938 | 0.0004 | 107.4938 |
| 77 | 109.7814 | 109.7818 | 0.0004 | 109.7818 |
| V | 108.3694 | 108.3989 | 0.0005 | 108.3989 |
| 104 | 108.0503 | 108.0502 | 0.0001 | 108.0502 |
| 3 | 107.9175 | 107.9170 | 0.0005 | 107.9170 |
| 202 | 111.5777 | 111.5776 | 0.0001 | 111.5776 |
| 201 | 107.3200 | 107.3196 | 0.0004 | 107.3196 |
| 9 | 100.8993 | 100.8990 | 0.0003 | 100.8990 |
| 20 | 96.7635 | 96.7639 | 0.0004 | 96.7639 |
| 208 | 111.5321 | 111.5321 | 0 | 111.5321 |
| VI | 109.2123 | 109.2127 | 0.0004 | 109.2127 |
| 122 | 107.7750 | 107.7755 | 0.0005 | 107.7755 |
| N | 108.3751 | 108.3755 | 0.0004 | 108.3755 |
| V | 110.1537 | 110.1540 | 0.0003 | 110.1540 |
| 80 | 105.4352 | 105.4357 | 0.0005 | 105.4357 |
| 119 | 106.1077 | 106.1073 | 0.0004 | 106.1073 |
| 31 | 103.8594 | 103.8589 | 0.0005 | 106.8589 |
| Q | 106.5028 | 106.5029 | 0.0001 | 106.5029 |

Para sacar los pesos constante utilizar los siguientes puntos:

1.- Estufa utilizada No 1 No de resguardo 1745.

2.- Balanza analítica No 2 Denver instrument.

3.- Desecador Fisher scientific.

4.- Margen de error de 0.0005 g.

Tabla 11 Resultados de biomasa (mg/L-1) de microalgas obtenidas del tratamiento del agua residual de San Pedro, Coah

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| FECHA | Ph | CE | No.  Filtro | Pi (g) | Pf (g) | Biomasa  (g L-1) | Promedio  (mgL-1) |
| 07-sep-15 | **8.42** | **1.84** | **1** | **1.1527** | **1.674** | **0.5213** | **526.50** |
|  |  |  | **2** | **1.174** | **1.7057** | **0.5317** |  |
| 08-sep-15 | **8.32** | **1.51** | **3** | **1.0396** | **1.5404** | **0.5008** | **500.55** |
|  |  |  | **4** | **1.0291** | **1.5294** | **0.5003** |  |
| 09-sep-15 | **7.55** | **1.83** | **5** | **1.1817** | **1.851** | **0.6693** | **671.55** |
|  |  |  | **6** | **1.0588** | **1.7326** | **0.6738** |  |
| 09-sep-15 | **8.71** | **1.4** | **7** | **1.1572** | **1.5004** | **0.3432** | **342.50** |
|  |  |  | **8** | **1.1694** | **1.5112** | **0.3418** |  |
| 10-sep-15 | **8.39** | **1.38** | **9** | **1.152** | **1.5218** | **0.3698** | **346.85** |
|  |  |  | **10** | **1.1531** | **1.477** | **0.3239** |  |
| 11-sep-15 | **8.3** | **1.3** | **11** | **1.1819** | **1.5812** | **0.3993** | **450.25** |
|  |  |  | **12** | **1.203** | **1.7042** | **0.5012** |  |
| 12-sep-15 | **7** | **1.21** | **13** | **1.1802** | **1.6137** | **0.4335** | **440.30** |
|  |  |  | **14** | **1.1703** | **1.6174** | **0.4471** |  |
| 13-sep-15 | **7.44** | **1.32** | **15** | **1.1673** | **1.5833** | **0.416** | **391.50** |
|  |  |  | **16** | **1.1947** | **1.5617** | **0.367** |  |
| 15-sep-15 | **7.62** | **1.3** | **17** | **1.1589** | **1.2847** | **0.1258** | **231.85** |
|  |  |  | **18** | **1.1809** | **1.5188** | **0.3379** |  |
| 16-sep-15 | **8.26** | **1.27** | **19** | **1.1705** | **1.492** | **0.3215** | **340.85** |
|  |  |  | **20** | **1.1676** | **1.5278** | **0.3602** |  |
| 17-sep-15 | **9.29** | **1.2** | **21** | **1.2073** | **1.2857** | **0.0784** | **124.90** |
|  |  |  | **22** | **1.1868** | **1.3582** | **0.1714** |  |
| 24/08/2015 | **7.5** | **1.38** | **23** | **1.0122** | **1.22** | **0.1039** | **97.20** |
|  |  |  | **24** | **1.058** | **1.239** | **0.0905** |  |
| 25/08/2015 | **7.1** | **1.44** | **25** | **1.051** | **1.666** | **0.3075** | **334.25** |
|  |  |  | **26** | **1.054** | **1.776** | **0.361** |  |
| 26/08/2015 | **7.36** | **1.3** | **27** | **1.159** | **1.805** | **0.323** | **317.60** |
|  |  |  | **28** | **1.146** | **1.7704** | **0.3122** |  |
| 27/08/2015 | **7.35** | **1.38** | **29** | **1.0458** | **1.6238** | **0.289** | **276.67** |
|  |  |  | **30** | **1.0391** | **1.5678** | **0.26435** |  |
| 30/08/2015 | **7** |  | **31** | **1.0303** | **1.654** | **0.31185** | **300.42** |
|  |  |  | **36** | **1.038** | **1.616** | **0.289** |  |
| 31/08/2015 | **7.07** | **1.6** | **38** | **1.013** | **1.592** | **0.2895** | **289.05** |
|  |  |  | **39** | **1.0148** | **1.592** | **0.2886** |  |

Tabla 12 Primer reflujo inicio 08: 00, final 12:17. Resultados de la extracción de aceites (mg/L-1) de microalgas obtenidas del tratamiento del agua residual de San Pedro, Coahuila

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| No. De filtro | Identificación del matraz | matraz vacío p1 (g) | volumen mL | matraz + muestra p2 (g) | GYA mg/L | Bco. |
| BCO | X | 111.2715 | 1000 | 111.2730 | 1.5 | N.A |
| Filtro 1 | 107 | 106.6308 | 1000 | 106.9545 | 323.7 | 322.2 |
| Filtro 2 | S | 103.6742 | 1000 | 104.0086 | 334.4 | 332.9 |
| Filtro 5 | 101 | 112.7651 | 1000 | 113.0735 | 308.4 | 306.9 |
| Filtro 6 | T | 107.4819 | 1000 | 108.0457 | 563.8 | 562.3 |
| Filtro 7 | 79 | 107.4911 | 1000 | 107.8084 | 317.3 | 315.8 |
| Filtro 8 | 112 | 107.4938 | 1000 | 108.0284 | 534.6 | 533.1 |
| Filtro 9 | 77 | 109.7818 | 1000 | 110.2049 | 423.1 | 421.6 |
| Filtro 10 | V | 108.3689 | 1000 | 108.7951 | 426.2 | 424.7 |
| Filtro 3 | 104 | 108.0502 | 1000 | 108.4157 | 365.5 | 364 |
| Filtro 4 | 3 | 107.917 | 1000 | 108.3433 | 426.3 | 424.8 |
| Filtro 13 | 202 | 111.5776 | 1000 | 112.0302 | 452.6 | 451.1 |

Todo el proceso fue realizado en el laboratorio de (SIMAS) Sistema municipal de agua residual y saneamiento torreón Coahuila México. Para realizar la extracción de aceite se hizo conforme a la Norma Mexicana: NMX-AA-005-SCFI-2013. Análisis de agua –medición de grasas y aceites recuperables en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Los números de filtros se indicaron en el tabla 11. Que es como identificamos las muestras en el proceso. El blanco es para determinar el grado de error que traen los cartuchos de extracción.

Tabla 13 Segundo reflujo inicio 12:17, final 16:17. Resultados de la extracción de aceites (mg/L-1) de microalgas obtenidas del tratamiento del agua residual de San Pedro, Coahuila

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| No. de filtro | Identificación del matraz | matraz vacío p1 (g) | volumen mL | matraz + muestra p2 (g) | GYA mg/L | % Rec. |
|  | 201 | 107.3196 | 1000 | 107.4188 | 99.2 | 97.70\* |
| Filtro 14 | 9 | 100.899 | 1000 | 100.9245 | 25.5 | 24 |
| Filtro 18 | 20 | 96.7639 | 1000 | 96.7843 | 20.4 | 18.9 |
| Filtro 19 | 208 | 111.5321 | 1000 | 111.5486 | 16.5 | 15 |
| Filtro 20 | VI | 109.2127 | 1000 | 109.2288 | 16.1 | 14.6 |
| Filtro 22 | 122 | 107.7755 | 1000 | 107.7905 | 15 | 13.5 |
| Filtro 23 | N | 108.3755 | 1000 | 108.4137 | 38.2 | 36.7 |
| Filtro 24 | v | 110.1540 | 1000 | 110.1858 | 31.8 | 30.3 |
| Filtro 30 | 80 | 105.4357 | 1000 | 105.4525 | 16.8 | 15.3 |
| Filtro 31 | 119 | 106.1073 | 1000 | 106.1198 | 12.5 | 11 |
| Filtro 38 | 31 | 103.8589 | 1000 | 103.8747 | 15.8 | 14.3 |
| Filtro 39 | Q | 106.5029 | 1000 | 106.5202 | 17.3 | 15.8 |

%rec = Porcentaje de recuperación el proceso. \* Indica el % de recuperación de la muestra. El resto de la columna so datos para la obtención de su valor.

Este fue el segundo reflujo con una recuperación 97.7 %. Con esa recuperación nos permite darnos cuenta las pérdidas al momento de analizar las muestras, ya sea por una mala filtración o al momento que está evaporando el hexano.

Tabla 14 . Contenido mgl-1 y productividad de aceite obtenido de la biomasa de microalga del fotobiorreactor

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Semana | día | mgL-1 | Contenido de aceite | Productividad  lípidos (mgL-1d-1 ) |
| Primera | **1** | 36.7 | 33.5 | **33.5** |
|  | **1** | 30.3 |  |  |
| Segunda | **1** | 11 | 11 | **11.0** |
|  | **2** | 15.8 | 15.05 | **7.5** |
|  | **2** | 14.3 |  |  |
| Tercera | **1** | 322.2 | 318.5 | **318.5** |
|  | **1** | 332.9 |  |  |
|  | **2** | 424.8 | 394.4 | **197.2** |
|  | **2** | 364.0 |  |  |
|  | **3\*** | 306.9 | 311.35 | **103.8** |
|  | **3\*** | 315.8 |  |  |
|  | **3** | 562.3 | 547.7 | **182.6** |
|  | **3** | 533.1 |  |  |
|  | **4** | 421.6 | 423.15 | **105.8** |
|  | **4** | 424.7 |  |  |

\*Comparación de la extracción de aceite con agua residual y mezcla.

El sistema de fotobiorreactores utilizado en el presente estudio, es eficiente para el tratamiento de agua residual y cumple con la NOM-001-SEMARNA-1996 Límites máximos permisibles  de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. En lo microbiológico no presentó coliforme fecales, ni huevos de helmintos y un pH entre 7 y 9.

Se generó una reducción de la conductividad eléctrica en un 30 % en el proceso del crecimiento de las microalgal en el biorreactor, lo que será benéfico al momento de reutilizar el agua con fines de irrigación.

La biomasa obtenida cada tercer día ver tabla 11. La mayor biomasa es cuando inoculamos con microalgas de la plata de agua residual de SIMAS. Las semanas posteriores (cuatro y cinco), se inoculó con microalgas del mismo sistema.

## 4.6. Desarrollo de métodos de extracción

En el marco de proyectos apoyados por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, la Corporación Instituto de Morrosquillo, el Instituto Colombiano del Petróleo ICPECOPETROL, la Universidad Industrial de Santander y el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo CYTED, los autores han desarrollado una metodología de extracción de aceite de diferentes especies de microalgas colombianas, enfocadas hacia la utilización de estos aceites en la producción de biodiesel, consistente en una etapa previa de prensado mecánico, con el fin de debilitar la pared celular de las microalgas, seguida de una extracción con solvente químico, en esta etapa se extraerá la mayor cantidad de lípidos posible mediante el método de Bligh & Dyer, aplicando variaciones en la proporción de solventes con el fin de determinar eficiencias globales y eficiencias de extracción de lípidos neutros, también se probaran diferentes velocidades de homogenización de la mezcla biomasa/solventes con el fin de hallar una velocidad ideal de homogenización y evitar gastos energéticos innecesarios, se harán experimentos a diferentes temperaturas para evaluar su efecto en la eficiencia de la extracción ([Manirakiza *et al.*, 2001](#_ENREF_26)).

Se evaluó el método soxhlet con diferentes solvente y mezclas de solventes para determinar la mezcla que permita una mayor extracción tanto global, como de lípidos apolares, también se determinara el tiempo óptimo de extracción. El solvente será separado del aceite mediante evaporación rotativa. Este desarrollo de los métodos de extracción se divide en dos partes, la primera, que es de estandarización, donde se analizarán todas las variables de operación con el fin de obtener las mejores para la extracción en especies promisorias, esto se realizará con una cepa estandarizada con un contenido de aceite definido. La siguiente etapa, consistente en la extracción de aceite en especies promisorias, se realizará con las variables de proceso definidas sobre especies nativas ([González *et al.*, 2009](#_ENREF_17)).

## 4.7. pH

El pH del medio influye tanto en la proporción de las especies del equilibrio químico del CO2, y por tanto, en la alcalinidad del medio, como en la forma química en que se encuentran algunos nutrientes y micronutrientes necesarios. Cada especie de microalga tiene un rango de pH en el cual su crecimiento es óptimo, dependiendo de qué especies químicas este más habituada asimilar. El pH en la mayoría de cultivos de microalgas se encuentra entre 7 y 9, con un óptimo entre 8.2-8.7 ([Malgas, 2013](#_ENREF_25)).

## 4.8. Conductividad Eléctrica

Los datos obtenidos mostraron un importante incremento en las concentraciones de algunos parámetros físicos y químicos para las estaciones E2 y E3, con respecto a la estación. La temperatura fluctuó entre 13° y 27,5°C; la DB05 entre 1,9 y 4,0 mg L-1; el fósforo entre 0,2 y 2,4 mg L-1 y la conductividad eléctrica entre 240 y 630 µs cm-1.

## 4.9. Temperatura

En el caso de la temperatura, las microalgas en las que está interesado generalmente para su cultivo, son las consideraciones como especies tropicales, debido a que su crecimiento no sufre alteraciones en un intervalo de 16 a 27 °C presentando un óptimo de 24°C. Bajas temperaturas en referencia con el intervalo anterior no matan a la microalga, sin embargo, puede provocar una disminución de crecimiento, temperaturas arriba de 35°C provocaría que la mayoría de las microalgas colapsaran (Hoff. y Snell., 2001).

## 4.10. Producción de biomasa (mgL-1)

Las producciones y productividad de biomasa en el fotobiorreactor en un sistema cerrado obtuvimos un promedio más alto de biomasa fue de 673.8 mgL-1 (Cuadro 11). Pérez et al. (2012), indican que en un sistema abierto en promedio la biomasa fue de 1000 mgL-1 y productividad 10-25 g/m2/d; dice que este promedio aún son bajos y costoso; por tanto sugieren un sistema cerrado a pesar de que los promedios de biomasa fueron bajos.

Se obtuvo biodiesel en un fotobiorreactor vertical utilizando *Botryococcus braunii* burbujeando dióxido de carbono en condiciones naturales de irradiación solar. Se aplica la técnica de control metabólico a través del crecimiento de las microalgas generando biomas de 14 gL-1 y 29% de lípidos de biomasa seca. El aceite se extrae con n-hexano y luego por transesterificación se obtiene el biodiesel cuyo valor calorífico es de 40 MJ/Kg, una densidad de 0.86 kg/L y una viscosidad de 5.2X10-4 Pas (a 40 °C) ([Erazo *et al.*, 2010](#_ENREF_14)).

Se utilizaron cultivos discontinuos en tanques a cielo abierto con 150L, aireación constante y en condiciones no controladas de fotoperiodo y temperatura. Se evaluó el crecimiento de la microalga mediante recuento celular, peso seco y contenido de pigmentos, realizando la recolección de la misma en fase estacionaria mediante sedimentación natural, y efectuando análisis fisicoquímicos a la biomasa secada al sol. La microalga creció en agua residual a cielo abierto, reportando eficiencias de remoción de 94,44% (23,80mg/L) para nitrógeno amoniacal, de 77,54% (7,04mg/L) para fosfatos y de 35,59% (26,09mg/L) para materia orgánica. La biomasa seca resultó ser un componente de alto contenido proteico (24,41%), fibroso (10,04%), con niveles de grasa (2,47%) y minerales (23,52%) adecuados para complementar la nutrición animal. Estos resultados demostraron que *Scenedesmus* puede ser utilizada para el tratamiento de aguas residuales con la producción de una biomasa de valor agregado (Charity *et al.*, 2009).

## 4.11. Extracción de lípidos método soxhlet

Los resultados arrojados en la extracción de aceite por el método soxhlet oscilaron entre 11-562.3 mgL-1 (tabla 14). En comparación a lo reportado por literatura internacional; ([Pacheco Vega Juan Manuel *et al.*, 2010](#_ENREF_32)), ([Soto León *et al.*, 2014](#_ENREF_45)), ([Pérez, 2012](#_ENREF_37)); ([Peñaranda Rincón Laura Antonia *et al.*, 2011](#_ENREF_35)), se observó mayor productividad del aceite generado (mgL-1día-1).

En este trabajo se ha analizado la alternativa de utilizar fuente de aguas residuales para los crecimientos de microalgas para la producción de biodiesel, con el objetivo de verificar la posibilidad del reusó y producción de compuestos de valor comercial. El aceite obtenido de las microalga tiene un contenido de energético aproximado de 35,800 kg-1, cerca del 80% de la energía contenida del petróleo.

Con base en lo anterior, la viabilidad económica de la producción biodiesel de tratamiento de aguas residuales a base de algas es excepcional. El total del costo se estima entre US $ 19.30 y US $ 25.30 al año por habitante con corrientes de US $ 28.12 al año por habitante, generando un margen de beneficio de al menos del 10%.

Tratamiento terciario de algas puede reemplazar tratamiento terciario convencional, que se ha informado que cuesta US $ 4,4 kg-1de N y US $ 3,05 kg-1 de P eliminadas. Como resultado, la producción de 70 a 100 ton/ha-1/año-1 de microalgas puede resultar en un ahorro de US $ 48.400 por Estados Unidos $ 74,800 ha-1/año-1 y para la eliminación de nitrógeno y US $ 4575 por Estados Unidos $ 7,625 ha-1 /año-1 para la eliminación de fósforo (Debora CynamonKligerman y EdwardJ.Bouwer., 2015).

# 

# CONCLUSIONES

1. De acuerdo con los resultados obtenidos, se acepta la hipótesis, el aceite extraído de microalgas es adecuado para la producción de biodiesel (la productividad de aceite extraído (mgL-1día-1), es superior a casos reportados en la literatura Internacional.
2. El método de extracción Soxhlet es adecuado a las condiciones del manejo del sistema de fotobiorreactores, con un 97.7 % de recuperación.
3. El precio del L de aceite de microalgas es $4.96 a precio actual del barril de petróleo ($43.38 dólares) (Cynamon Kligerman y Bouwer, 2015).

## REFERENCIAS.

Bajpai, R., Zappi, M., Dufreche, S., Subramaniam, R. y Prokop, A. 2014. Status of algae as vehicles for commercial production of fuels and chemicals, In: Bajpai, R., Zappi, M., Prokop, A. (Eds.) Algal Biorefineries. Volume 1: Cultivation of Cells and Products. Springer, New York. USA, 3-24.

Callejón., M.J.J., Medina., A.R., Sánchez., M.D.M., Peña., E.H., Cerdán., L.E., Moreno., P.A.G., Grima., E.M., 2014, Extraction of saponifiable lipids from wet microalgal biomass for biodiesel production. Bioresource Technology169, 198-205.

Caroline Souza Pamplona Silva, Maria Estela Silva-Stenico, Marli Fátima Fiore, Heizir Ferreira de Castro, Rós., P.C.M.D., 2014, Optimization of the cultivation conditions for S*ynechococcus sp*. PCC7942 (cyanobacterium) to be used as feedstock for biodiesel production. Algal Research3, 1-7.

Cynamon Kligerman, D., Bouwer, E.J., 2015, Prospects for biodiesel production from algae -based wastewater treatment in Brazil: A review. Renewable Sustain. Energy Rev.52, 1834-1846.

Charity, E.A.R., B., A.L.V., L., C.H.C., A., E.D.M., 2009, Biomass production of microalga *Scenedesmus sp.* with wastewater from fishery. Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia32, 126 - 134.

Cheng., J., Huang., R., Li., T., Zhou., J., Cen., K., 2014, Biodiesel from wet microalgae: Extraction with hexane after the microwave-assisted transesterification of lipids. Bioresource Technology170, 69-75.

de Godos, I., Guzman, H.O., Soto, R., Garcia-Encina, P.A., Becares, E., Munoz, R., Vargas, V.A., 2011, Coagulation/flocculation-based removal of algal-bacterial biomass from piggery wastewater treatment. Bioresource technology102, 923-927.

Debora CynamonKligerman, EdwardJ.Bouwer., 2015, Prospects for biodiesel production from algae-based wastewater treatment in Brazil: A review Renewable and Sustainable Energy Reviews 52, 1834-1846.

Demirbas., A., Demirbas., M.F., 2011, Importance of algae oil as a source of biodiesel. Energy Conversion and Management52, 163-170.

DOF 2000. NMX-AA-093-SCFI-2000. Análisis de agua - determinación de la conductividad electrolítica - método de prueba. (México, D.F., Diario Oficial de la Federación).

DOF 2001a. NMX-AA-026-SCFI-2001. Análisis de agua - determinación de nitrógeno total kjeldahl en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. (México, D.F., Diario Oficial de la Federación).

DOF 2001b. NMX-AA-028-SCFI-2001. Análisis de agua - determinación de la demanda bioquímica de oxígeno en aguas naturales, residuales (dbo5) y residuales tratadas (México, D.F., Diario Oficial de la Federación).

DOF 2001c. NMX-AA-029-SCFI-2001. Análisis de aguas - determinación de fósforo total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - método de prueba. (México, D.F., Diario Oficial de la Federación).

DOF 2001d. NMX-AA-030-SCFI-2001. Análisis de agua - determinación de la demanda química de oxígeno en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - método de prueba (México, D.F., Diario Oficial de la Federación).

DOF 2012. PROY-NMX-AA-034-SCFI-2012. Análisis de agua - Medición de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales y residuales tratadas (México. D.F, Diario Oficial de la Federación), p. 23.

Erazo, R.E., J. C. Woolcott H, F. Anaya M, H. Gómez R, E. Calvo B, G., M.C., 2010, Producción de biodiesel en un fotobiorreactor a partir de biomasa de microalgas utilizando emisiones industriales de dióxido de carbono. Rev. Per. Quím. Ing. Quím13 57-63.

Evelyn Faife Pérez , Miguel A. Otero Rambla, Amaury Alvarez Delgado, 2012, Producción de biodiesel a partir de microorganismos oleaginosos. Una fuente de energía renovable (Parte II: Microalgas). Sistema de Información Científica Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal46, 26-35.

Flores Torres, C.A., 2006. Filtración combinada anaerobia. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

González, I.A.D., Kafarov., D.V., Monsalve., D.A.G., 2009, Desarrollo de métodos de extracción de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas. Prospect7, 53-60.

Halfhide., T., Åkerstrom., A., Lekang., O.I., Gislerod., H.R., Ergas., S.J., 2014, Production of algal biomass, chlorophyll, starch and lipids using aquaculture wastewater under axenic and non-axenic conditions. Algal Research6, 152-159.

Halim, R., Danquah, M.K., Webley, P.A., 2012, Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. Biotechnology advances30, 709-732.

Halim., R., Danquah., M.K., Webley., P.A., 2012, Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. Biotechnology Advances30, 709-732.

Hernández., A.G., Vázquez-Duhalt., R., Saavedra., M.d.P.S., Carreón., L.S., Jiménez., A.M., 2009, Biodiesel a Partir de Microalgas BioTecnología13, 1-24.

Hoff., F., Snell., T., 2001, Plankton cuHure manual Florida Agua. Farm Inc E UA, 162.

Iqbal., J., Theegala., C., 2013, Microwave assisted lipid extraction from microalgae using biodiesel as co-solvent. Algal Research2, 34-42.

Malgas, 2013, Aplicaciones de las microalgas: estado de la tecnica. ingenieria, 1-72.

Manirakiza, P., A., C., P., S., 2001, Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. . Journal of food composition and analysis.

Markou., G., Nerantzis., E., 2013, Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions. Biotechnology Advances31, 1532-1542.

Mata., T.M., Martins., A.A., Caetano., N.S., 2010, Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews14, 217-232.

Meza Bazán, P., 2013. Remoción de coliformes y metales en aguas residuales mediante diatomeas. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ingeniería, México, D.F.

Mubarak., M., Shaija., A., Suchithra., T.V., 2014, A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. Algal Research7, 117-123.

Nobre., B.P., Villalobos., F., Barragán., B.E., Oliveira., A.C., Batista., A.P., Marques., P.A.S.S., Mendes., R.L., Sovová., H., Palavra., A.F., Gouveia., L., 2013, A biorefinery from Nannochloropsis sp. microalga – Extraction of oils and pigments. Production of biohydrogen from the leftover biomass. Bioresource Technology135, 128-136.

Pacheco Vega Juan Manuel, Cadena Roa Marco Antonio, Sánchez Saavedra Maria del Pilar, Tovar Ramírez Dariel, Rangel Dávalos Carlos, 2010, Effect of culture medium and nutrient concentration on fatty acid content of Chaetoceros muelleri. Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal1, 6-15.

Park., J.-Y., Lee., K., Choi., S.-A., Jeong., M.-J., Kim., B., Lee., J.-S., Oh., Y.-K., 2014, Sonication-assisted homogenization system for improved lipid extraction from Chlorella vulgaris. Renewable Energy79, 1-6.

Paudel., A., Jessop., M.J., Stubbins., S.H., Champagne., P., Jessop., P.G., 2014, Extraction of Lipids from Microalgae using CO2-expanded methanol and Liquid CO2. Bioresource Technology184, 286-290.

Peñaranda Rincón Laura Antonia, Sepúlveda Ortíz Karen Johanna, Álvarez Pacheco Yury Elena, González Delgado Ángel Darío, Viatcheslav., K., 2011, Evaluación de rutas de obtención de lípidos y monosacáridos de biomasa de microalgas bajo el concepto de biorefinería. Revista ION4, 13-21.

Peralta-Ruiz., Y., González-Delgado., A.-D., Kafarov., V., 2013, Evaluation of alternatives for microalgae oil extraction based on exergy analysis. Applied Energy101, 226-236.

Pérez, L.E.S., 2012, Evaluación de métodos de extracción de aceite de microalgas para la producción de biodiesel

PIRHUA, 1-145.

Quinn., J.C., Hanif., A., Sharvelle., S., Bradley., T.H., 2014, Microalgae to biofuels: Life cycle impacts of methane production of anaerobically digested lipid extracted algae. Bioresource Technology171, 37-43.

Ramaraj., R., Tsai., D.D.-W., Chen., P.H., 2015, Biomass of algae growth on natural water medium. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology142, 124–128.

Ribeiro., L.A., Silva., P.P.d., Mata., T.M., Martins., A.A., 2015, Prospects of using microalgae for biofuels production: Results of a Delphi study. Renewable Energy75, 799-804.

Santos., R.R.d., Moreira., D.M., Kunigami., C.N., Aranda., D.A.G., Teixeira., C.M.L.L., 2015, Comparison between several methods of total lipid extraction from *Chlorella vulgaris* biomass. 22, 95-99.

Silva., C.S.P., Silva-Stenico., M.E., Fiore., M.F., Castro., H.F.d., Rós., P.C.M.D., 2014, Optimization of the cultivation conditions for *Synechococcus sp.* PCC7942 (cyanobacterium) to be used as feedstock for biodiesel production. Algal Research3, 1-7.

Soares., F.R., Martins., G., Seo., E.S.M., 2013, An assessment of the economic aspects of CO2 sequestration in a route for biodiesel production from microalgae. Environmental Technolo34, 13-14.

Soto León, S., Zazueta Patrón I. E, Piña Valdez P, Nieves Soto, M., Reyes Moreno C, I., C.A., 2014, Extracción de lípidos de tetraselmis suecica: proceso asistido por ultrasonido y solventes

Revista Mexicana de Ingeniería Química13, 723-737.

Tunc, T., Sahin, U., 2015, The changes in the physical and hydraulic properties of a loamy soil under irrigation with simpler-reclaimed wastewaters. Agric. Water Manag.158, 213-224.

Vandamme, D., Foubert, I., Fraeye, I., Meesschaert, B., Muylaert, K., 2012, Flocculation of Chlorella vulgaris induced by high pH: role of magnesium and calcium and practical implications. Bioresource technology105, 114-119.

Widjaja., A., Chien., C.-C., Ju., Y.-H., 2009, Study of increasing lipid production from fresh water microalgae Chlorella vulgaris. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers40, 13-20.

Yap., B.H.J., Crawford., S.A., Dumsday., G.J., Scales., P.J., Martin., G.J.O., 2014, Amechanistic study of algal cell disruption and its effect on lipid recovery by solvent extraction. Algal Research5, 112-120.