

**REMOCIÓN DE NITRÓGENO Y FÓSFORO DE UN EFLUENTE ANAEROBIO
MEDIANTE LA INMOVILIZACIÓN DE MICROALGAS NATIVAS**

**YOHANA CASTRO HERNÁNDEZ
PAOLA ANDREA REYES ZAMBRANO**

**UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA SECCIONAL BUCARAMANGA
ESCUELA DE INGENIERIA
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL
BUCARAMANGA
SEPTIEMBRE DE 2016**

**REMOCIÓN DE NITRÓGENO Y FÓSFORO DE UN EFLUENTE ANAEROBIO
MEDIANTE LA INMOVILIZACIÓN DE MICROALGAS NATIVAS**

**YOHANA CASTRO HERNÁNDEZ
PAOLA ANDREA REYES ZAMBRANO**

**Proyecto de grado como requisito para optar el título de Ingenieras
Ambientales**

**Directora:
PhD. ALEXANDRA CERÓN VIVAS**

**UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA SECCIONAL BUCARAMANGA
ESCUELA DE INGENIERIA
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL
BUCARAMANGA
SEPTIEMBRE DE 2016**

Nota de Aceptación

Presidente del Jurado

Jurado

Jurado

Bucaramanga, Septiembre de 2016

Dedicado al creador de todas las cosas, por permitirme venir a este mundo, brindarme su protección y mantener viva mi fe en él. A mis padre y hermanos porque a pesar de la distancia, siempre están apoyándome y aconsejándome y al amor de mi vida C.D. por su amor, comprensión y apoyo incondicional.

Yohana Castro Hernández

Dedicado a aquel Ser Supremo que me ha concedido la vida para poder realizar todos mis sueños. A mis padres y hermano, Angélica Zambrano, Ricardo Reyes y Jhoan R. Z, quienes son el motor de mi vida y a mi tío Miguel Reyes, quien ha sido aquel cómplice de sueños e ilusiones.

Paola Andrea Reyes Zambrano

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios, porque siempre su mano poderosa estuvo sobre nosotras bendiciéndonos y protegiéndonos.

Agradecemos a nuestros padres, porque día a día lucharon incansablemente para brindarnos lo necesario, permitiéndonos culminar de la mejor manera nuestro ciclo educativo y por forjar en nosotras principios intachables.

Agradecemos a nuestra directora de tesis, Alexandra Cerón Vivas, por ser ese apoyo incondicional, porque en cualquier momento y situación siempre estaba dispuesta a escucharnos, a dirigirnos, a aconsejarnos, le agradecemos por confiar en nosotras y tenernos en gran estima.

Agradecemos a Yolanda Gamarra, por ser la primera persona en darnos ese voto de confianza, aquel que necesita cualquier estudiante para iniciar su camino seguro de que con perseverancia y esfuerzo se puede lograr todo lo que se proponga.

Agradecemos a Claudia Santoyo, porque más que una docente es un ejemplo de vida. Su ternura, tranquilidad, dedicación y carisma, generaron huellas imborrables en nuestros corazones.

Agradecemos a María Natalia Chaparro, por ser ese ejemplo, de rectitud, responsabilidad y entrega al trabajo, por demostrarnos que con amor podemos lograr cosas magnificas, que con organización y dedicación podremos tener tiempo para todo. Por convertirse en más que una docente, por convertirse en una amiga.

Agradecemos a Ana María Ardila, por ser aquel apoyo moral incondicional y desinteresado, por estar siempre disponible a cualquier inquietud que tuviéramos,

por convertirse en una más de nosotras, por compartir aquellos momentos inolvidables fuera del ámbito académico.

Agradecemos a Álvaro Cajigas, por su apoyo incondicional, por tener siempre una respuesta ante cualquier inquietud, por sus miles de consejos sabios basados en las Sagradas Escrituras, por demostrarnos que creer en Cristo significa mucho más de lo que se profesa. Agradecemos por compartirnos sus historias de vida, las cuales alimentaron nuestro espíritu.

Agradecemos a aquellas personas, ahora amigos, que aunque dentro de sus labores no estaba el colaborararnos incondicionalmente, lo hicieron, agradecemos a Diego Blanco, Jonathan Duitama, Naidu Villamizar, a Doña Felicia y Don Alcides, quienes siempre, con un gesto de amabilidad, estuvieron dispuestos una y otra vez a colaborararnos en absolutamente todo lo que necesitáramos.

Agradecemos a nuestras compañeras de aventuras, luchas, lágrimas, alegrías, decepciones, confesiones, a aquellas que hicieron de nuestro paso por la UPB los mejores días nuestra vida, gracias a, Jenny Vargas, Medellín Herreño, María Angélica Epieyu, Stefany Basurto y Maira Quiroz, por convertirse en amigas incondicionales.

Agradecemos a todos nuestros compañeros, docentes y familiares, que de una u otra manera aportaron en nuestro crecimiento durante esta etapa tan bella, que marco nuestras vidas para siempre. A todos ellos infinitas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

1. OBJETIVOS	16
1.1. OBJETIVO GENERAL.....	16
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
2. MARCO TEÓRICO	17
2.1. ANTECEDENTES.....	17
2.2. AGUAS RESIDUALES	18
2.2.1. Tratamiento de las aguas residuales.....	19
2.3. MICROALGAS.....	21
2.3.1. Generalidades	21
2.3.2. Fotosíntesis	27
2.4. INMOVILIZACIÓN DE MICROALGAS.....	28
2.4.1. Etapas de la formación de biopelículas en la inmovilización	28
2.4.2. Tipos de inmovilización	29
2.4.3. Efecto de la inmovilización	30
2.4.4. Especies de microalgas inmovilizadas para remoción de contaminantes	31
2.5. CONDICIONES DE CULTIVO.....	34
2.5.1. Luz.....	34
2.5.2. Temperatura.....	36
2.5.3. Mezcla	36
2.5.4. pH.....	36
2.5.5. Nutrientes	36
3. MATERIALES Y MÉTODOS	38
3.1. Definición de la unidad experimental	38
3.1.1. Aislamiento y cultivo de microalgas.....	40
3.2. Factores de estudio	41
3.2.1. Combinación factorial.....	42
3.3. Variables de respuesta	43
3.4. Análisis estadísticos	44
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS	46

4.1. PROCESO DE INMOVILIZACIÓN.....	46
4.1.1. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE MICROALGAS NATIVAS	50
4.2. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE AMONIO Y LOS TIPOS DE MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA REMOCIÓN DE NUTRIENTES	52
4.2.1. Variación del pH	53
4.2.2. Remoción de nitrógeno (NH_4^+)	53
4.2.3. Remoción de Ortofosfatos - PO_4^{-3}	56
4.2.4. Generación de Nitratos (NO_3^-).....	58
4.3.5. Remoción de demanda química de oxígeno - DQO	60
4.2.6. Observaciones Microscópicas	62
5. CONCLUSIONES	64
6. RECOMENDACIONES.....	66
7. BIBLIOGRAFÍA	68
ANEXOS.....	74

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de aguas residuales.....	19
Tabla 2. Microalgas de agua dulce: apariencia microscópica..	22
Tabla 3. Microalgas inmovilizadas para la remoción de contaminantes	34
Tabla 4. Composición de diferentes tipos de aguas residuales utilizadas.....	43
Tabla 5. Nomenclatura. Tipos de agua residual y medios de cultivo.....	45
Tabla 6. Parámetros y métodos empleados	45
Tabla 7. Evolución microalgal durante el cultivo.....	54
Tabla 8. Porcentaje de remoción de Nitrogeno (NH_4^+)	55
Tabla 9. Porcentaje de remoción de Ortofosfatos (PO_4^{-3})	59
Tabla 10. Porcentaje de generación de Nitratos (NO_3^-).....	61
Tabla 11. Porcentaje de remoción de DQO.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación esquemática de los procesos para tratamientos de las aguas residuales.	20
Figura 2. Ejemplos de integración de trenes de tratamiento de aguas residuales.	21
Figura 3. <i>Diatomea Pennada</i> fresca en microcopio óptico.....	23
Figura 4. <i>Chorella</i> . Cultivo potencial de algas.....	25
Figura 5. Curva de fotosíntesis comparada con la intensidad luminosa	32
Figura 6. Esquema del Montaje de unidad experimental.	38
Figura 7. Esquema del montaje experimental del proceso de inmovilización	39
Figura 8. Esquema del montaje experimental del aislamiento y cultivo de microalgas en suspensión.....	41
Figura 9. Esquema del montaje experimental de la remoción de nutrientes.....	44
Figura 10. Fracción de poliuretano rígido en la muestra de biomasa nativa	48
Figura 11. Observaciones en el estereoscopio de los materiales de inmovilización.	50
Figura 12. Observación en el microscopio de las muestras.	51
Figura 13. Montaje de inmovilización para la determinación del material de inmovilización.....	52
Figura 14. Observaciones en el microscopio de los materiales de inmovilización	52
Figura 15. Montaje experimental de la remoción de nutrientes.....	64

LISTA DE GRAFICAS

Gráfica 1. Concentración de biomasa a través del tiempo en diferentes tipos de material de inmovilización y medios de cultivo.	50
Gráfica 2. Concentración de nitrógeno (NH_4^+) a diferentes tipos de agua residual sintética y medios de cultivo.	57
Gráfica 3. Resultados de pH y NH_4^+ a través del tiempo en los diferentes medios de cultivo.....	58
Gráfica 4. Resultados de pH y PO_4^{-3} a través del tiempo en los diferentes medios de cultivo.....	60
Gráfica 5. Concentración de Nitratos a diferentes tipos de agua residual sintética y medios de cultivo	62
Gráfica 6. Concentración de DQO a diferentes tipos de agua residual sintética y medios de cultivo.	63

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Composición del medio de crecimiento Bold Basal (BB)	747
Anexo 2. Composición del medio de crecimiento Bold Basal Modificado (BBM)	758
Anexo 3. Genero de microalgas: Identificación microscópica	769
Anexo 4. Progreso de la etapa de inmovilización para la selección de la material de soporte.....	81
Anexo 5. Resultados de ANOVA de la concentración de biomasa en la fase de inmovilización.....	792
Anexo 6. Fotografías microscópicas de la fase de inmovilización.....	803
Anexo 7. Resultados de ANOVA de la concentración de NH_4^+ en la fase de remoción.	814
Anexo 8. Resultados de ANOVA de la concentración de PO_4 en la fase de remoción.	825
Anexo 9. Resultados de ANOVA de la concentración de NO_3^- en la fase de remoción.	836
Anexo 10. Resultados de ANOVA de la concentración de DQO en la fase de remoción.	847
Anexo 11. Fotografías microscópicas de la fase inicial de la inmovilización para la remoción de los nutrientes.....	858
Anexo 12. Fotografías microscópicas de la fase final de la inmovilización para la remoción de los nutrientes.....	879

RESUMEN GENERAL DE TRABAJO DE GRADO

TITULO: REMOCIÓN DE NITRÓGENO Y FÓSFORO DE UN EFLUENTE ANAEROBIOMEDIANTE LA INMOVILIZACIÓN DE MICROALGAS NATIVAS

AUTOR(ES): YOHANA CASTRO HERNÁNDEZ
PAOLA ANDREA REYES ZAMBRANO

FACULTAD: Facultad de Ingeniería Ambiental

DIRECTOR(A): PhD ALEXANDRA CERÓN VIVAS

RESUMEN

La inmovilización de microalgas sobre polímeros o adheridas a un medio de soporte sólido, es una técnica que ha sido utilizada recientemente en el tratamiento de aguas residuales para la remoción de nutrientes, debido a las ventajas que presenta sobre los cultivos en medio suspendido. El objetivo de este estudio es determinar la eficiencia de remoción de nitrógeno y fósforo en un efluente anaerobio sintético, mediante microalgas nativas inmovilizadas en fotobiorreactores a escala laboratorio. Inicialmente se evaluaron dos materiales de inmovilización: polietileno de baja densidad y poliuretano rígido, con el fin de seleccionar el material con mejor desempeño. Para evaluar la remoción de los nutrientes se utilizó un diseño factorial con dos factores: concentración inicial de amonio en el agua residual sintética y medio de cultivo utilizado durante el proceso de inmovilización. Las concentraciones iniciales de amonio evaluadas fueron 40, 120 y 200 mg N-NH₄/L, en dos medios de cultivo: Bold Basal (BB) y Bold Basal Modificado (BBM). Como resultados se obtuvo que el polietileno de baja densidad fue el mejor medio de soporte para la inmovilización de las microalgas. En cuanto a la remoción de los nutrientes se obtuvo en promedio 26.5 %, para el NH₄⁺ sin mostrar diferencias significativas entre los tipos de agua residual sintética y para el PO₄-3 se registraron porcentajes de remoción hasta de 67,4 % en el agua residual sintética con concentración inicial de 40 mg/l NH₄⁺, reflejándose mejores porcentajes de remoción cuando la inmovilización se realizó con el medio de cultivo Bold Basal Modificado. En conclusión, el proceso de inmovilización por si misma posiblemente no afecta significativamente el metabolismo de las microalgas, sin embargo, si se adicionan factores externos, como el pH y la saturación de nutrientes, estos ocasionan bajos porcentajes de remoción de nutrientes.

PALABRAS CLAVES:

Remoción de nutrientes, inmovilización de microalgas.

GENERAL SUMMARY OF WORK OF GRADE

TITLE: NITROGEN AND PHOSPHORUS REMOVAL OF ANAEROBIC EFFLUENT THROUGH THE NATIVE IMMOBILIZED MICROALGAE

AUTHOR(S): YOHANA CASTRO HERNÁNDEZ
PAOLA ANDREA REYES ZAMBRANO

FACULTY: Facultad de Ingeniería Ambiental

DIRECTOR: PhD ALEXANDRA CERÓN VIVAS

ABSTRACT

Immobilization of microalgae on polymers or adhered to a solid support medium, is a technique that has been used recently in wastewater treatment for nutrient removal due to the advantages shown on the culture suspended medium. The aim of this study is to determine the nitrogen and phosphorus removal efficiency in an anaerobic synthetic effluent using natives immobilized microalgae into photo bioreactors at bench scale. Initially, two immobilizing materials were evaluated: low density polyethylene and rigid polyurethane in order to select the material with better performance. To assess the nutrients removal a factorial design was used with two factors: initial concentration of ammonium in the synthetic wastewater and culture medium used during the immobilization process. The initial concentrations of ammonium evaluated were 40, 120 y 200 mg N-NH₄/L in two culture medium: Bold Basal (BB) and modified Bold Basal (BBM). As a result it was found that low density polyethylene was the better support medium for the microalgae immobilization. For the nutrients removal, an average of 26.5 % for NH₄⁺ was obtained without showing significant differences between the types of synthetic wastewater and for the PO₄-3 removal, values of 67,4 % was recorded up in the synthetic wastewater with initial concentration of 40 mg/l NH₄⁺. The better removal percentages were reached when the immobilization was realized with modified Bold Basal. In conclusion, the immobilization process itself may not significantly affect the metabolism of microalgae, however, if external factors such as pH and nutrient saturation are included these cause low nutrients removal.

KEYWORDS:

Nutrient removal, Immobilization of microalgae.

INTRODUCCIÓN

La generación de aguas residuales en gran magnitud es un resultado inevitable de las actividades humanas, la composición de estas suele ser peligrosa para los seres vivos y el medio ambiente, por tal motivo debe ser tratado antes de ser vertidas a los cuerpos de agua. Actualmente existe una gran variedad de tratamientos para aguas residuales domésticas y agroindustriales. Sin embargo, estos todavía liberan grandes cantidades de fósforo y nitrógeno, convirtiéndose en la principal causa de la eutrofización en ríos, lagos y mares (Lau, Tam, & Wong, 1997; Trepanier, Parente, Comeau, & Bouvrette, 2002).

Los procesos de tratamiento de aguas residuales emplean varios métodos para eliminar el fósforo y nitrógeno, ya sea a gran escala o a escala laboratorio. Uno de los métodos utilizados para este tipo de contaminantes, son las microalgas cultivadas en estanques abiertos o en fotobiorreactores en suspensión, las cuales han demostrado ser potencialmente útiles como agentes para la remoción de nutrientes y otros contaminantes presentes.

Aunque las microalgas parecen ser una propuesta prometedora presentan algunas limitaciones para la puesta en marcha de estos sistemas, y es la recolección de biomasa producida que se debe realizar al agua tratada, esto mediante el uso de filtración, centrifugas industriales u otro sistema de eliminación, lo que representa costos adicionales, haciéndolo no rentable para el tratamiento de las aguas residuales (De Bashan & Bashan, 2010). Por tal motivo, la inmovilización de microalgas se ha convertido en uno de los métodos sugeridos para la solución de esta problemática, permitiendo además concentrar una elevada cantidad de biomasa que se utiliza en la producción de alimentos, cosméticos, acuicultura y farmacéuticos, obtención de electricidad e hidrogeno y eliminación de metales.

El presente trabajo tiene como objetivo determinar la eficiencia de remoción de nitrógeno y fósforo de un efluente anaerobio, mediante microalgas nativas inmovilizadas en fotobiorreactores a escala laboratorio.

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la eficiencia de la remoción de nitrógeno y fósforo de un efluente anaerobio, mediante microalgas nativas inmovilizadas en fotobiorreactores a escala laboratorio.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar el medio de soporte adecuado para la inmovilización de las microalgas.
- Evaluar la influencia de la concentración inicial de nitrógeno de un efluente anaerobio, sobre la capacidad de remoción de nutrientes de microalgas inmovilizadas
- Analizar la influencia del medio de cultivo utilizado durante la fase de inmovilización, sobre la remoción de nitrógeno y fósforo de un efluente anaerobio.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

El uso de algas inmovilizadas en los procesos de purificación de agua, se ha reportado como parte de los organismos fijados en los filtros percoladores de las plantas de tratamiento de aguas residuales (Robinson, Reeve, & Goulding, 1988). Sin embargo, a finales de los años sesenta del siglo pasado, novedosas técnicas para inmovilizar microalgas comenzaron a extenderse en la literatura (Papageorgiou, 1987). La alta capacidad de acumulación de sustancias peligrosas por algunos de estos organismos (Maeda & Sakaguchi, 1990) ha sido explorada como técnicas de biorremediación aplicadas en aguas contaminadas que implican especialmente metales (Greene & Bedell, 1990).

Uno de los estudios más recientes sobre descontaminación del agua residual es el reportado por Mallick (2002), centrado en el uso de algas inmovilizadas para la eliminación de nitrógeno, fósforo y metales. Sin embargo, con el tiempo se han registrado diferentes estudios en la misma área, inmovilizándose *P. laminosum* en poliuretano y espuma de polivinilo, usado en reactores de flujo continuo diseñados con el fin de eliminar nitrato del agua, mostrando una remoción de 90% durante 3 meses (Garbisu, Gil, Bazin, Hall, & Serra, 1991). Igualmente, se han aislado cepas de *Scenedesmus intermedius* y *Nannochloris sp.*, de diferentes fuentes de estiércol de cerdo, con el fin de diseñar un sistema de depuración para la eliminación de macronutrientes de aguas residuales provenientes de granjas (Jiménez, Sánchez, Romero, Fernandez, & Pérez, 2004), evidenciando ser ligeramente menor la captación de nitrógeno y fósforo para las células inmovilizadas que para las que se encuentran en suspensión. Sin embargo, la adsorción de nutrientes por especies nativas, fue superior a la alcanzada por las especies comerciales comunes, debido probablemente a una mejor adaptación a las altas concentraciones de nutrientes.

En Colombia, la búsqueda de una alternativa rentable para la remoción de nutrientes y materia orgánica de las aguas residuales, ha llevado a pensar en la inmovilización de microalgas, por ello se han realizado estudios de inmovilización de especies como *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus*, capaces de eliminar hasta el 55% de los fosfatos de las aguas residuales resultantes de la producción de lácteos e industrias agrícolas de cerdo (Gonzales, Canizares, & Baena, 1997). En otros estudios, se ha realizado la inmovilización de *Scenedesmus incrassatulus* en alginato de calcio reduciendo hasta el 60% de la cantidad inicial de nitritos y el 47 % de fósforo (Roa & Cañizares, 2012)

Regionalmente, en Santander se han llevado a cabo algunos estudios sobre temas de inmovilización de microalgas, en su mayoría enfocados a determinar las matrices más adecuadas para la inmovilización. Romero & Garcia (2010) determinaron que el polietileno de baja densidad resulta ser el mejor co-inmovilizante para la producción de biomasa algal. De la misma manera, Blanco & Villamizar (2014) coinciden que la mejor matriz inmovilizante es el polietileno de baja densidad, evaluando en este caso el efecto del glicerol residual en la deposición de lípidos y carbohidratos en *Chlorella vulgaris* utex 1803 como materia prima para la producción de biocombustibles de tercera generación.

2.2. AGUAS RESIDUALES

Una problemática que merece atención es el tema de las aguas residuales, debido a su impacto sobre los ecosistemas acuáticos, terrestres y localidades humanas al momento de su descarga, por ende la necesidad de avanzar en los procesos de tratamientos, parece ser un nuevo eje focal investigativo. Según Romero (2000) las aguas residuales se definen como las aguas usadas y los sólidos que por uno u otro medio se introducen en las cloacas y son transportadas mediante el sistema de alcantarillado.

Generalmente las aguas residuales son de dos tipos; aguas residuales domésticas y no domésticas. En la tabla 1, se presentan diferentes tipos de aguas residuales, de acuerdo a su procedencia.

Tabla 1. Tipos de Aguas Residuales

Tipo de agua	Definición	Características
Agua residual domestica	Son las procedentes de los hogares, así como de las instalaciones de las cuales se desarrollan actividades industriales comerciales o de servicios.	Los contaminantes están presentes en moderadas concentraciones. Contiene materia orgánica, nutrientes, patógenos, etc.
Aguas residual no domestica	Son procedentes de las actividades industriales, comerciales o de servicios distintas a las que constituyen aguas residuales domésticas.	Su contenido depende del tipo de industria y/o procesos industriales

Fuente: Adaptado de *resolución 631 (2015)*

Las aguas residuales domesticas están constituida por 99.9% de agua y un 0.1% de sólidos, de los cuales el 70% son orgánicos y el 30% son inorgánicos como arenas, sales y metales; siendo este 0,1% el que debe ser sometido al proceso en las plantas de tratamiento de aguas residuales - PTAR. La composición del agua residual está en función del uso, características sociales y económicas de la población, clima, cultura y uso del suelo entre otras (Suarez M., 2010).

2.2.1. Tratamiento de las aguas residuales

Generalmente las aguas residuales industriales y domesticas requieren tratamiento antes de ser descargadas en el sistema de alcantarillado municipal o en una corriente natural; como las características de estas aguas residuales cambian de una a otra, los procesos de tratamiento son también muy variables, existiendo gran diversidad de procesos que varían en los costos de adquisición, operación mantenimiento, así como en la eficiencia del tratamiento (Noyola, Morgan, & Güereca, 2013).

Los sistemas de tratamiento están divididos por cuatro niveles que se diferencian por el tipo de contaminantes que eliminan: el preliminar remueve material sólido grueso, arenas, aceites y grasas; el primario, una porción de sólidos y material orgánico suspendido; el secundario, materia orgánica biodegradable y un porcentaje de nutrientes (nitrógeno y fósforo) y el terciario, sólidos suspendidos, nutrientes y material orgánico remanente no biodegradable (Noyola, Morgan, & Güereca, 2013).

La depuración de aguas residuales se logra mediante la integración de operaciones físicas y procesos bioquímicos, los cuales se seleccionan en función de las características del agua residual a tratar y de la calidad deseada del agua tratada. Los procesos mencionados están registrados en la figura 1.

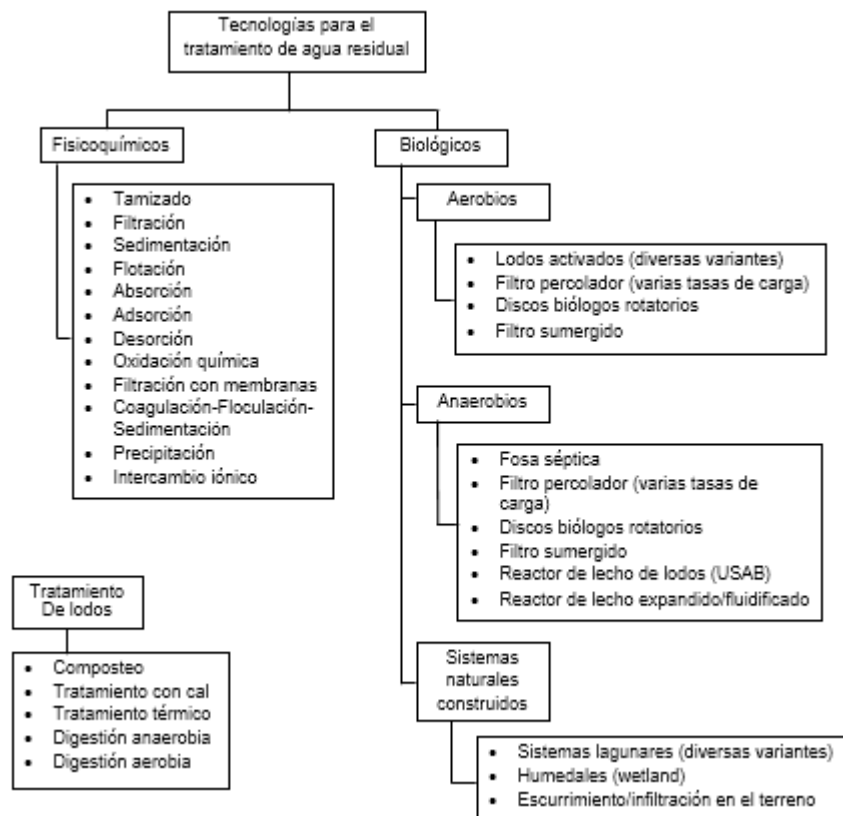


Figura 1. Clasificación esquemática de los procesos para tratamiento de las aguas residuales. Fuente: Noyola, Morgan, & Güereca (2013)

A la integración de los procesos unitarios se le denominan trenes o sistemas de tratamiento, los cuales son representados en la figura 2.

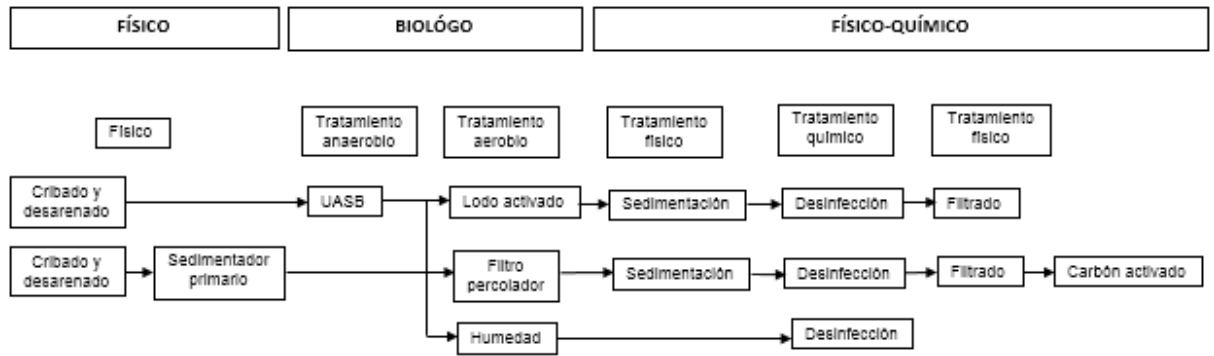


Figura 2. Ejemplos de integración de trenes de tratamiento de aguas residuales.
Fuente: Noyola, Morgan, & Güereca (2013)

2.3. MICROALGAS

2.3.1. Generalidades

Las microalgas son organismos unicelulares autótrofos (capacidad de sintetizar todas las sustancias esenciales para su metabolismo a partir del CO₂) y fotosintéticos, que generan compuestos complejos como carbono a partir del dióxido de carbono y la energía lumínica (Pfandl, Chatzinotas, Dyal, & Boeningk, 2009).

El término “microalga” no es estrictamente un término taxonómico, pero se utiliza como un número de etiqueta que incluye todos los diferentes phylum que se ajustan a la descripción amplia que se ha indicado anteriormente. Estos organismos incluyen tanto procariotas (células que carecen de un núcleo unido a la membrana) y eucariotas (células con núcleo típico unido a la membrana) (Bellinger & Sigee, 2010).

Las microalgas de agua dulce pueden ser agrupadas en diez divisiones principales (phylum), en relación a la apariencia microscópica y las características bioquímicas/citológicas, como se registra en la tabla 2.

Tabla 2. Microalgas de agua dulce: apariencia microscópica

Phylum	Color típico	Morfología típica	Motilidad (Las células vegetativas / Colonias)	Ejemplos
1. Algas verde azules <i>Cyanophyta</i>	Azul-verde	Microscopia o visible – Usualmente colonial	Tiene regulación de flotabilidad. Algunos pueden deslizarse	<i>Synechocystis</i> <i>Microcystis</i>
2. Algas verdes <i>Chlorophyta</i>	Verde-hierba	Microscopia o visible – Unicelular o colonias filamentosas	Algunos organismos unicelulares y colonias con flagelos	<i>Chlamydomonas</i> <i>Cladophora</i>
3. Euglenoids <i>Euglenophyta</i>	Varios colores	Microscopia – Unicelular	Sobre todo con flagelos	<i>Euglena</i> <i>Colaction</i>
4. Algas amarillas-verdes <i>Xanthophyta</i>	Amarillo-verde	Microscopia – Unicelular	zoosporas flageladas y gametos	<i>Ophiocytium</i> <i>Vaucheria</i>
5. Dinoflagelados <i>Dinophyta</i>	Rojo-pardo	Microscopia – Unicelular	Todos con flagelos	<i>Ceratium</i> <i>Peridinium</i>
6. Criptomonas <i>Cryptophyta</i>	Varios colores	Microscopia – Unicelular	Sobre todo con los flagelos	<i>Rhodomonas</i> <i>Cryptomonas</i>
7. crisofitas <i>Chrysophyta</i>	Marrón oro	Microscopia – Unicelular o colonial	Algunos con flagelos	<i>Mallomonas</i> <i>Dinobryon</i>
8. Diatomeas <i>Bacillariophyta</i>	Marrón oro	Microscopia – Unicelular o colonias filamentosas	Movimiento deslizante sobre el sustrato	<i>Stephanodiscus</i> <i>Aulacoseria</i>
9. Algas rojas <i>Rhodophyta</i>	Rojo	Microscopia – Unicelular o colonial	No móviles	<i>Batrachospermum</i> <i>Bangia</i>
10. Algas pardas <i>Phaeophyta</i>	Pardas-marrón	Visible – Multicelular amortiguadores y talo	No móviles	<i>Pleurocladia</i> <i>Heribaudiella</i>

Fuente: John, Whitton, & Brook (2002)

- **Bacillariophyta:**

Las diatomeas (Bacillariophyta) son un grupo muy distinto de las algas, identificable en el microscopio de luz por su coloración amarilla-marrón. En cuanto a las características citológicas, las diatomeas presentan plastos con retículo periplásmico, reserva de alimentos de lípidos fuera del plastido y una pared celular distintiva compuesto de dióxido de silicio opalino (sílice) con recubrimientos orgánicos (Bellinger & Sigeo, 2010). La pared celular de las diatomeas difiere de otras algas por ser casi totalmente inorgánico en la composición (Falkowski & Raven, 1997). Las diatomeas tienen una serie de desventajas potenciales, como: la alta densidad de la pared celular, lo que limita el desarrollo de extensas poblaciones en aguas no estratificadas, la formación de la pared celular depende de un suministro adecuado de sílice soluble y a diferencia de otros tipos de material de la pared celular, el sílice es rígido e incapaz de expandirse, por ello la reproducción de las diatomeas es asexual y sexual (Bellinger & Sigeo, 2010).

Morfológicamente, las diatomeas están separadas en dos grupos principales, diatomeas céntricas y diatomeas pennadas, basándose principalmente en la forma celular y la morfología de la pared celular. Las diatomeas céntricas suelen ser cilíndricas, con una simetría radial, en comparación con las diatomeas pennadas las cuales tienen ejes longitudinales y transversales, y tienen una simetría con el contorno de las válvulas presentes en el eje longitudinal, como se observa en la figura 3.



Figura 3. Diatomea Pennada fresca en microscopio óptico. (No fijada). Vista valva (B) y sección transversal (C).

Fuente: Bellinger & Sigeo (2010)

Su éxito en colonizar y dominar una amplia gama de hábitats acuáticos se debe a su diversidad genética - con un total mundial de 285 géneros registrados, que abarca 10.000-12.000 especies (Round, Crawford, & Mann, 1990; Norton, Melkonian, & Andersen, 1996). Las diatomeas son también muy abundantes en ambos ambientes de agua dulce: planctónicos y bentónicos, donde pueden formar una gran parte de la biomasa de algas y son un importante contribuyente a la productividad primaria.

Algunos de los géneros representativos de este phylum son (Bellinger & Sigee, 2010):

- ✓ *Navícula*: Tienen válvulas lanceoladas con una superficie axial estrecha flanqueada por estrías finas que se irradia ligeramente en el centro, pero en paralelo hacia los ápices de las células. Las células son a menudo muy móviles (movimiento navicular). Tienen cloroplasto en forma de H. Los ápices de las células pueden ser por poco redondeadas. Dos cloroplastos en forma de placa están presentes acostados cada lado del eje apical.
- ✓ *Nitzschia*: Sus células puede ser elíptica, lineal estrecha, en forma de huso o sigmoide en vista de válvula. En algunas especies el centro de la válvula puede estar ligeramente constreñido. No hay ninguna zona central clara en las estrías que puede ser finas o gruesas en apariencia. Dos grandes cloroplastos están presentes, cada uno en cualquiera de los extremos de la zona central. Las células tienen una longitud de 20 a 250 micras de y 4,5 a 16 micras de ancho.
- ✓ *Pinularia*: Las células son lineales, lanceoladas o incluso elípticas. Los polos son generalmente redondeados. Las estrías son generalmente gruesas (pero puede ser más finas en algunas especies). Hay un rafe central cuyo medio termina curva en la misma dirección. Por lo general hay dos cloroplastos en forma de placa, uno a cada lado de la línea media. Algunas especies pueden tener otros cloroplastos conformados. Las células tienen longitud de 13 a 120 micras de largo y de 4-16 micras de ancho.

- ✓ Stephanodiscus: Tienen ligeramente una forma de barril y en vista de cintura tienen forma de disco. La cara de la válvula es ondulada con el centro ya sea elevado o más bajo que el margen. El margen de la válvula tiene un anillo de espinas cortas y en algunas especies pequeñas roscas de quitinas largas y delicadas que permiten que las células se unan para formar cadenas sueltas. Numerosos cloroplastos discoides.
- ✓ Cocconeis: Las células son isopolar y isobilateral y de forma elíptica. Tiene estrías finas o gruesas las cuales pueden ser visibles en la superficie de la válvula que va desde el rafe al margen de la célula. La válvula de rafe-cojinete es ligeramente cóncava. Un único cloroplasto en forma de C está presente.

- **Chlorophyta:**

Las microalgas verdes (Chlorophyta) varían en tamaño desde organismos unicelulares microscópicos a grandes colonias globulares y extensos crecimientos filamentosos. Se caracterizan por una coloración verde fresca debido a la presencia de clorofila-a y -b, que no se oculta por pigmentos tales como β -caroteno y otros carotenoides (Ver figura 4). En casos excepcionales, los pigmentos carotenoides se pueden producir en grandes cantidades, oscureciendo las clorofilas y dando al alga un color rojo brillante. Además de su pigmentación característica las algas verdes tiene una serie de aspectos citológicos distintivos: presentan flagelos en pares y cloroplastos que varían en forma, tamaño y número (Bellinger & Sigeo, 2010).

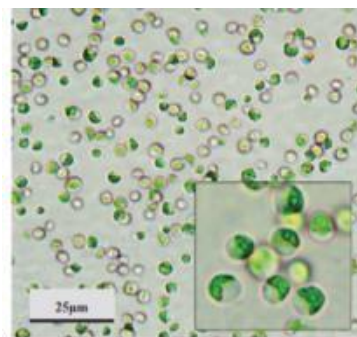


Figura 4. Chlorella. Cultivo potencial de algas. Inserción: detalle de la célula

Fuente: Bellinger & Sigeo (2010)

Este grupo es el más diverso de microalgas, con cerca de 17.000 especies conocidas (Graham & Wilcox, 2000). Esta diversidad se refleja en la variedad morfológica, con organismos que se agrupan en una serie de formas de crecimiento dependiendo si son unicelulares, coloniales o filamentosas (Bellinger & Sigeo, 2010).

Los géneros destacados de este phylum son (Bellinger & Sigeo, 2010):

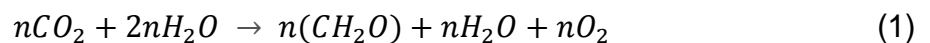
- ✓ *Chlorella*: Son células esféricas o subesféricas con un solo cloroplasto parietal, que llena casi toda la célula. Miden entre 2-10 micras de diámetro. Se encuentran comúnmente en aguas ricas en nutrientes, pero pasa por alto debido a su pequeño tamaño. Su pequeño tamaño también puede significar que puede pasar a través de filtros de arena tradicionales de tratamiento de agua que dan lugar a problemas de color en el agua tratada.
- ✓ *Ulothrix*: Las especies de este género se componen de filamentos no ramificados. Son células cilíndricas alargadas con cloroplastos en forma de silla. Las especies comunes incluyen *Zonata U.* (células de 11-37 micras de ancho y por lo general más cortas que ancho, con paredes bastante gruesas) y *U. Aequalis* (células de 13-15 micras de ancho y 18-30 micras de longitud). Comúnmente forma brillantes masas flotantes verdes en aguas poco profundas, sobre todo en los momentos más fríos del año, pero también pueden fijarse en piedras sumergidas o madera.
- ✓ *Haematococcus*: Las células de *Haematococcus* (a veces llamado *Sphaerella*) son de forma ovalada y entre 8-30 micras de diámetro. Hay una pared mucilaginosa de espesor. Los pigmentos verdes en el cloroplasto a menudo se enmascaran con haematochromo rojo para que las células aparezcan de color rojo. El cloroplasto es en forma de copa con uno a cuatro pirenoides. A menudo hay extensiones protoplásmicas en la pared celular de

ancho. Las células se notan a menudo en un estado enquistado dándoles un color rojo.

- ✓ Scenedesmus: Es un género muy común y a veces abundante. Se encuentra sobre todo en aguas eutróficas e hipertróficas. Algunas especies tienen espinas, otras crestas y las demás sin ornamentación. Los tamaños de celdas varían mucho de una especie a otra.
- ✓ Oocystis: Las células son solitarios o en pequeñas colonias de 2, 4, 8 o 16. Los cloroplastos son discoide o similar a una placa con uno a muchos por célula. Pirenoide pueden o no estar presente. El tamaño varía de 7-50 micras de largo y 6-12 micras de ancho. Generalizada en lagos y estanques. Hay hasta cuatro cloroplastos por célula.

2.3.2. Fotosíntesis

La fotosíntesis es uno de los procesos esenciales para el sostenimiento de la vida terrestre, en términos generales es la conversión de la energía lumínica y compuestos inorgánicos (H_2O Y CO_2) en hidratos de carbono que constituyen fuente de materia orgánica y energía para el metabolismo y el crecimiento de todo ser vivo. La reacción global de la fotosíntesis, se registra en la ecuación 1:



El término $n(CH_2O)$ es una manera abreviada de representar la fórmula empírica de almidones y carbohidratos. El almidón es el producto de la fotosíntesis más abundante. La fotosíntesis se ve afectada por diferentes factores medioambientales, como la intensidad y calidad de la luz (está relacionada con la distancia entre el objeto y la fuente de luz, y se clasifica en luz dura, suave y difusa), la humedad del aire, la temperatura, la disponibilidad de agua, de nutrientes minerales y de dióxido de carbono (Sáenz, 2012).

El proceso de la fotosíntesis se divide en dos etapas, las denominadas reacciones de luz y reacciones oscuras. La fase luminosa requiere necesariamente la presencia de luz. Los pigmentos fotosintéticos adsorben la radiación luminosa y esta es transformada y almacenada temporalmente como energía química (en forma de una molécula que se denomina ATP). En este proceso interviene el agua cuya molécula se descompone y libera oxígeno y protones (H⁺). En la fase oscura no es necesaria la presencia de luz. La energía obtenida en la fase anterior es utilizada para fijar, captar moléculas de dióxido de carbono (CO₂) atmosférico y unirlo para formar compuestos orgánicos (Masojídek, Koblížek, & Torzillo, 2004).

2.4. INMOVILIZACIÓN DE MICROALGAS

Una célula inmovilizada se define como una célula viva que, por medios naturales o artificiales, se evita que se mueva independientemente de su ubicación original a todas las partes de una fase acuosa de un sistema (Tampion & Tampion, 1987).

El método de inmovilización en general tiene algunas ventajas principales: primero concentra alta cantidad de biomasa que puede ser utilizada como subproducto; segundo, evita la filtración de las aguas residuales tratadas; tercero, tiene una alta resistencia a compuestos tóxicos presentes en las aguas residuales tratadas; cuarto, se puede inmovilizar más de un microorganismo y quinto es fácil de aplicar (De Bashan & Bashan, 2010). Hasta ahora, la inmovilización parece ser una técnica buena y rentable para la separación de microalgas de su medio de cultivo en el tratamiento terciario de aguas residuales (Olguín, 2003).

2.4.1. Etapas de la formación de biopelículas en la inmovilización

La formación de biopelículas en los materiales de inmovilización se da en cuatro pasos principalmente. En el primer paso las células perciben una superficie de adherencia formando uniones activas reversibles por medio de fimbrias, apéndices, pilis o proteínas extra celulares. En el segundo paso se produce un incremento de la biomasa celular, evidenciándose en el aumento de la intensidad de color en los

materiales de soporte y por consiguiente la disminución del mismo en el medio líquido circundante, debido a que crean microcolonias alrededor del área de adherencia, así como la formación de EPS (Sustancias poliméricas extracelulares), generando una unión irreversible. La composición del exopolisacárido puede variar según el tipo de microorganismos o las condiciones ambientales, los principales componentes son alginato, N-acetil-glucosamina, glucosa y galactosa (Garzón & Barragán, 2008). Y en la tercera fase, la biopelícula crece y madura, permitiendo la adhesión de nuevas colonias, entre ellas bacterianas y finalmente en el cuarto paso, las células individuales o conglomeradas se desprende de la biopelícula formada, ya sea por erosión, abrasión o separación para formar nuevos conglomerados generando una coloración verdosa en el medio líquido circundante (Nazar, 2007).

2.4.2. Tipos de inmovilización

Seis tipos diferentes de inmovilización han sido definidos: acoplamiento covalente, inmovilización de afinidad, adsorción, confinamiento en emulsión líquido-líquido, la captura tras de la membrana semipermeable y el atrapamiento en polímeros (Mallick N. , 2002). Estos tipos de inmovilización pueden agruparse como " pasiva", la cual utiliza la tendencia natural de los microorganismos para adherirse a las superficies (naturales o sintéticas) y crecer en ellas, y " activa" que utiliza agentes floculantes, unión química y la encapsulación de gel (Cohen, 2001; Moreno-Garrido, 2008).

- **Inmovilización pasiva**

Este tipo de inmovilización es fácilmente reversible y la contaminación de efluentes con células desprendidas de la matriz inmovilizante es inevitable. Los materiales adsorbentes (portadores) para la inmovilización pasiva pueden ser naturales o sintéticos (Moreno-Garrido, 2008).

Con respecto a los vectores naturales, la loofa es un soporte fibroso del fruto de diferentes especies del género lufa. Este soporte no es tóxico y no reactivo, barato y mecánicamente fuerte (Liu, Seki, Tanaka, & Furusaki, 1998), sin embargo, la

repetibilidad representa uno de los problemas de este soporte, debido a que la estructura del esqueleto de las frutas varía de una planta a otra en función de las condiciones del cultivo, adicionalmente el otro inconveniente es el alto índice de degradabilidad, inconvenientes que los materiales sintéticos no poseen. Se han utilizados diferentes tipos de espumas, vidrio, madera, plásticos, poli estireno, entre otros.

- **Inmovilización activa**

Dentro de este tipo de inmovilización se describen las siguientes técnicas:

- Agentes floculantes: se utilizan principalmente con el fin de evitar la centrifugación tediosa y costosa, cuando se espera eliminar las algas de un medio líquido. Entre los floculantes utilizados comúnmente, el quitosano ha sido el más ampliamente utilizado (Oungbho & Müller, 1997).
- Unión química: La atracción de iones no es tan perjudicial para los seres vivos, pero la eficacia de esta técnica depende del pH y la fuerza iónica del medio circundante (Codd, 1987).
- Atrapamiento en gel: Este método es la técnica más utilizada para la inmovilización de algas. El atrapamiento de gel se puede realizar mediante el uso de polímeros sintéticos (acrilamida, resinas fotorreticulables, poliuretanos), proteínas (gelatina, colágeno o clara de huevo) o polisacáridos naturales (agar, carragenina y alginatos) (Moreno-Garrido, 2008).

2.4.3. Efecto de la inmovilización

Aunque la inmovilización tiene diferentes ventajas, la encapsulación de microorganismos en polímeros ejerce una tensión significativa sobre los microorganismos a causa de las fuerzas químicas y las interacciones entre la matriz de inmovilización y la pared celular. El confinamiento en un espacio limitado también afecta el metabolismo de los microorganismos.

2.4.4 Especies de microalgas inmovilizadas para remoción de contaminantes

Existen numerosos ejemplos sobre la capacidad de remoción de las microalgas, sirviendo como base para estudios preliminares utilizadas en nuevas tecnologías de tratamientos terciarios de agua residual, como se observa en la tabla 3.

Tabla 3. Microalgas inmovilizada para la remoción de contaminantes

Contaminante	Material de inmovilización	Especies de microalgas	Referencias
Nitrógeno	Alginato	<i>Anabaena sp.</i> ; <i>Anabaena doliolum</i> ; <i>Clorella vulgaris</i> ; <i>C. sorokiniana</i> ; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; <i>Isochrysis galbana</i> ; <i>Scenedesmus obliquus</i>	(Chen, 2003), (Hernandez, de-Bashan, Rodriguez, Rodriguez, & Bashan, 2009), (Jeanfils & Thomas, 1986) y (Garbisu, Gil, Bazin, Hall, & Serra, 1991).
	Espuma de polivinilo	<i>Phormidium uncinatum</i>	(Gil & Serra, 1993)
	Poliuretano y espuma de polivinilo	<i>Phormidium laminosum</i> ; <i>S. obliquus</i>	(Garbisu, Gil, Bazin, Hall, & Serra, 1991; Urrutia, Serra, & Llama, 1995)
	Papel de filtro	<i>Trentepohlia aurea</i>	(Abe, Matsumura, Imamaki, & Hirano, 2003)
Fósforos	Alginato	<i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>C. sorokiniana</i> ; <i>C. emersonii</i>	(Hernandez, de-Bashan, Rodriguez, Rodriguez, & Bashan, 2009) y (Robinson, Reeve, & Goulding, 1989)
Nitrógeno y fosforo	Poliuretano	<i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>C. kessleri</i> ; <i>Scenedesmus quadricauda</i>	(Travieso, Benitez, Weiland, Sanchez, & Dupeyron, 1996), (Fierro, Sánchez, & Copalcúa, 2008) y (Mallick & Rai, 1994).
	Espuma de polivinilo y acetato de polivinilo-sulfato	<i>Chlorella pyrenoidosa</i> ; <i>Phormidium laminosum</i>	(Garbisu, Hall, & Serra, 1993) y (Huang, Huang, Wang, & Wang, 2003).

Contaminante	Material de inmovilización	Especies de microalgas	Referencias
Cadmio	Alginato	<i>Chlorella homosphaera</i> ; <i>C. vulgaris</i> ; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; <i>Oscillatoria sp.</i> ; <i>Tetraselmis chuii</i>	(Bayramoğlu, Tuzun, Celik, Yilmaz, & Arica, 2006) y (Moreno, Campana, Lubián, & Blasco, 2005).
	Espuma de poliuretano	<i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>Scenedesmus acutus</i>	(Travieso, y otros, 1999)
	Esponja Luffa cylindrica	<i>Chlorella sorokiniana</i> ; <i>Synechococcus sp.</i>	(Akhtar, Saeed, & Iqbal, 2003) y (Saeed & Iqbal, 2006).
Cadmio y plomo	Caseína de la leche y glutaraldehído	<i>Heterosigma akashiwo</i>	(Seki & Suzuki, 2002)
Cesio	Alginato	<i>Chlorella salina</i>	(Avery, Codd, & Gadd, 1993)
Oro	Alginato	<i>Chlorella homosphaera</i>	(da Costa & Leite, 1991)
Niquel	Alginato	<i>Anabaena doliolum</i> ; <i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>C. miniata</i> ; <i>Scenedesmus quadricauda</i>	(Bayramoğlu & Arica, 2009), (Mehta & Gaur, 2001) y (Tam, Wong, & Wong, 2009)
Hidrocarburos	Espuma de poliuretano	<i>Prototheca zopfii</i>	(Ueno, Wada, & Urano, 2008)
	Alginato	<i>Selenastrum capricornutum</i>	(Tam, Wong, & Wong, 2009)
compuestos orgánicos de estaño (biocidas)	Alginato	<i>Chlorella emersonii</i> ; <i>C. vulgaris</i>	(Luan, Jin, Chan, Wong, & Tam, 2006) y (Tam, Wong, & Wong, 2009)

Fuente: De Bashan & Bashan (2010)

2.5. CONDICIONES DE CULTIVO

Según Parson, Strephens, & Strickland (1961), la composición de la célula en un cultivo con diferentes especies es generalmente similar a las condiciones físicas y químicas del medio en que se siembran. Sin embargo, estudios recientes demuestran que la composición bioquímica de una microalgas varía notoriamente en condiciones desfavorables, por ejemplo, *Clorella sp*, *Botryococcus braunii* y *Dunaliella salina*, típicamente se componen de 20-50% de proteína, 20-40% de hidratos de carbono y 8-15% de lípidos en condiciones favorables, pero al estar en condiciones desfavorables puede acumular hasta 80% de ácidos grasos, 80% de hidrocarburos y 40% de glicerol (Qiang, 2004). De acuerdo con lo anterior, los factores ambientales como la luz, temperatura, el pH, los nutrientes, la mezcla y la salinidad, no solo afectan la fotosíntesis y la productividad de biomasa, sino que también influyen en el patrón, la vía y la actividad del metabolismo y composición celular. A continuación, se describen los factores que influyen sobre el cultivo.

2.5.1. Luz

La disponibilidad de luz es el principal factor limitante de los cultivos fotoautótrofos de microalgas. Este factor tiene la imposibilidad de definirlo como un único parámetro, ya que entra en juego las intensidades, los fotoperiodos, la duración de los ciclos, las fuentes de luz y la configuración de los estanques o reactores.

- **Intensidades de luz**

El crecimiento de los microorganismos fotosintéticos es proporcional a la intensidad de luz recibida siempre que esta se sitúe por debajo de un cierto valor máximo. A partir de este valor máximo el crecimiento se ve fotolimitado, ya que los sistemas fotosintéticos receptores se ven dañados y la fotosíntesis por lo tanto, inhibida, como se evidencia en la figura 5. Cabe destacar que las microalgas se adaptan a los cambios de luz variando el contenido de clorofila a de sus células. (AST Ingeniería S.L., 2013).

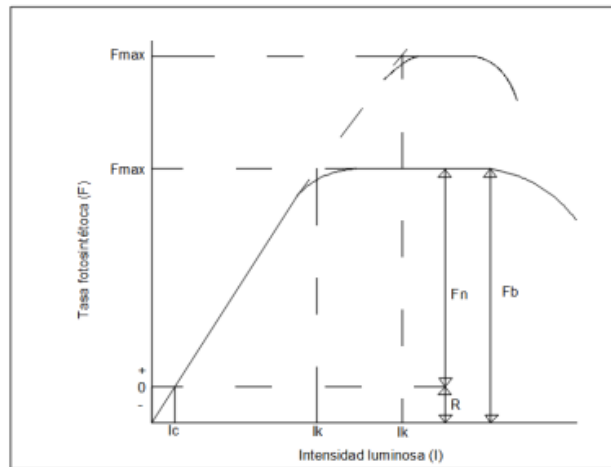


Figura 5. Curva de fotosíntesis comparada con la intensidad luminosa. F_{max} = Tasa máxima de fotosíntesis; I_c = Intensidad luminosa de compensación; I_s =Intensidad a la cual ocurre la “saturación”; R = Respiración; F_n = Fotosíntesis neta; y F_b = Fotosíntesis bruta. La curva superior indica la respuesta a una temperatura mayor.
Fuente: Marsshall, (1991)

- **Fotoperiodos**

Muchos aspectos de la fisiología microalgal fluctúan en un ciclo de 24 horas, según Gonzales (2000), se observa que la división celular se realiza en un momento determinado del día o de la noche, la tasa máxima fotosintética se produce en la mañana y la absorción de N y P son mayores durante el día que durante la noche. Barsanti & Gualtiere (2006), recomienda utilizar ciclos de luz/oscuridad máximo 16:8, 14:10 o 12:12.

- **Fuentes de luz**

La fuente de luz para el cultivo de microalgas puede ser natural o artificial. La ventaja de la luz natural es no suponer un gasto energético, pero tiene el inconveniente de no poder controlar los fotoperiodos y la intensidad, produciendo variaciones diarias en función del tiempo atmosférico. En contraste, las lámparas fluorescentes (luz artificial) son las preferías para la iluminación de cultivos interiores, dan menos calor que otros tipos de luz artificial y son eficientes en promover tasas de división y crecimientos máximos (2000).

2.5.2. Temperatura

La temperatura tiene efectos sobre la densidad del agua y sobre las reacciones bioquímicas, los requerimientos nutricionales y la composición de la biomasa. El rango óptimo para el crecimiento de la mayoría de las microalgas se sitúa entre 18 y 25°C, sin embargo, la tolerancia depende de cada especie (Gonzales A. M., 2000).

2.5.3. Mezcla

La agitación crea un flujo turbulento que mejora la tasa de intercambio de nutrientes y metabolitos entre las células en cultivo y su medio de crecimiento (Grobbelaar, 1994). Además, según Richmond & Becker (1986) aumenta la distribución de la luz a las células asegurando que permanezcan fotosintéticamente activas, evita que las células se sedimenten en el fondo del recipiente de cultivo, previene una estratificación termal y disminuye las restricciones a la tasa de crecimiento de un cultivo, por los gradientes gaseosos que se forman alrededor de las células microalgales en el curso de su actividad metabólica.

2.5.4. pH

Las microalgas muestran una clara dependencia respecto al pH del medio de cultivo y diferentes especies varían ampliamente en su respuesta al mismo. Cada microalga presenta un pH óptimo para su crecimiento (7 - 8), un descenso del pH suele ser letal, en cambio suelen soportar mejor los incrementos del pH, hasta cierto límite (Abalde, Cid, Fidalgo, Torres, & Herrero, 1995). El pH del medio de cultivo determina la solubilidad del CO₂ y de los minerales, así como la distribución relativa de las formas inorgánicas de carbono (CO₂, H₂CO₃, HCO₃⁻, CO₃⁻²) e influyen directa e indirectamente en el metabolismo de las microalgas (Abalde, Cid, Fidalgo, Torres, & Herrero, 1995).

2.5.5. Nutrientes

Además del carbono, hidrogeno y oxígeno, las algas requieren de 13 a 15 elementos adicionales para crecer y reproducirse, algunos se describen a continuación.

- **Carbono**

Contrariamente a las plantas terrestres, el CO₂ atmosférico no puede satisfacer los requisitos de carbono de los sistemas de producción de algas de alto rendimiento. El sistema CO₂-H₂CO₃-HCO₃⁻-CO₃²⁻ es el más importante para la amortiguación en las aguas dulces y es el mejor medio disponible para controlar y mantener los niveles de pH específicos que son óptimas para las especies cultivadas en masa (Lee, 2004). El consumo normal de las microalgas se sitúa entre 200 y 600 mg CO₂/L·d (Ruiz, 2011).

- **Nitrógeno**

Es un constituyente esencial de todas las proteínas estructurales y funcionales en las células de las microalgas. El contenido de nitrógeno de la biomasa puede variar de 1 a 10%. El nitrógeno se suministra principalmente como nitrato (NO₃⁻), pero a menudo el amonio (NH₄⁺) y la urea también se utilizan, con tasas de crecimiento similares (Kaplan, Richmond, Dubinsky, & Aaronson, 1986). El amonio es la fuente de nitrógeno preferida por los microorganismos y la asimilación de este aumenta el pH del medio de cultivo (Lee, 2004).

- **Fósforo**

El fósforo es esencial para el crecimiento y muchos procesos celulares, tales como transferencia de energía, la biosíntesis de ácidos nucleicos, ADN, etc. La forma preferida en la que se suministra a las microalgas es como ortofosfato (PO₄²⁻) y su absorción es dependiente de la energía. Aunque la biomasa de algas contiene menos de 1% de P, es uno de los más importantes factores de crecimiento que limita a las microalgas en la biotecnología (Borowitzka, 1988).

El N, P y C en concentraciones mínimas o de exceso, representan problemas a la célula, debido a que puede conducir a estrés y la reducción del crecimiento (Rhee & Gotham, 1980).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Definición de la unidad experimental

La definición de la unidad experimental tiene por objetivo la selección del material de inmovilización más adecuado para dar inicio al proceso de remoción de nutrientes, con las diferentes variables, que constituyen los factores de estudio.

Los materiales de inmovilización seleccionados fueron: polietileno de baja densidad y poliuretano rígido, los cuales según el estudio realizado por Romero & Garcia (2010) presentan resultados óptimos en cuanto a adherencia. El procedimiento de la inmovilización fue una adaptación de Urrutia, Serra, & Llana (1995). El material se cortó en cubos con las dimensiones que se muestran en la figura 6, se estimaron aproximadamente 150 cubos por fotobiorreactor, los cuales fueron lavados alrededor de 5 veces con agua destilada en ebullición y luego secada en el horno a una temperatura de 105 °C. Pasado este tiempo se fijaron en soportes de acero inoxidable en forma de espiral, con un diámetro de 7 cm y 10 vueltas cada uno, lo que garantizó que estuvieran sumergidos en su totalidad en los fotobiorreactores. Posteriormente, se llevaron al proceso de esterilización en la autoclave.

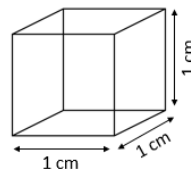


Figura 6. Dimensiones del material de inmovilización

Fuente: Autores

Otra variable evaluada fue el medio de cultivo empleado durante este procedimiento. Se utilizaron dos medios de cultivo: Bold Basal y Bold Basal Modificado, diferenciados por la ausencia de nitrógeno y fosforo.

El soporte con el material de inmovilización fueron sumergidos en fotobiorreactores cilíndricos de vidrio traslucido de 10x25 cm, que contenían biomasa algal (1.4 g/l) y medio de cultivo en relación 1:1. En los fotobiorreactores se tenía un sistema de aireación conectado a filtros de aire, para evitar la entrada de material particulado al sistema y en la parte inferior de los fotobiorreactores se ubicó un difusor plástico que permitía la salida de las burbujas. Los fotobiorreactores estaban ubicados en módulos con iluminación de 4700 lux con lámparas fluorescentes de luz blanca, aproximadamente de 50 cm de alto por un 1 metro de ancho con fotoperiodos de 12h: 12h y temperatura ambiente. El esquema de lo descrito en la unidad experimental, se visualiza en la figura 7.

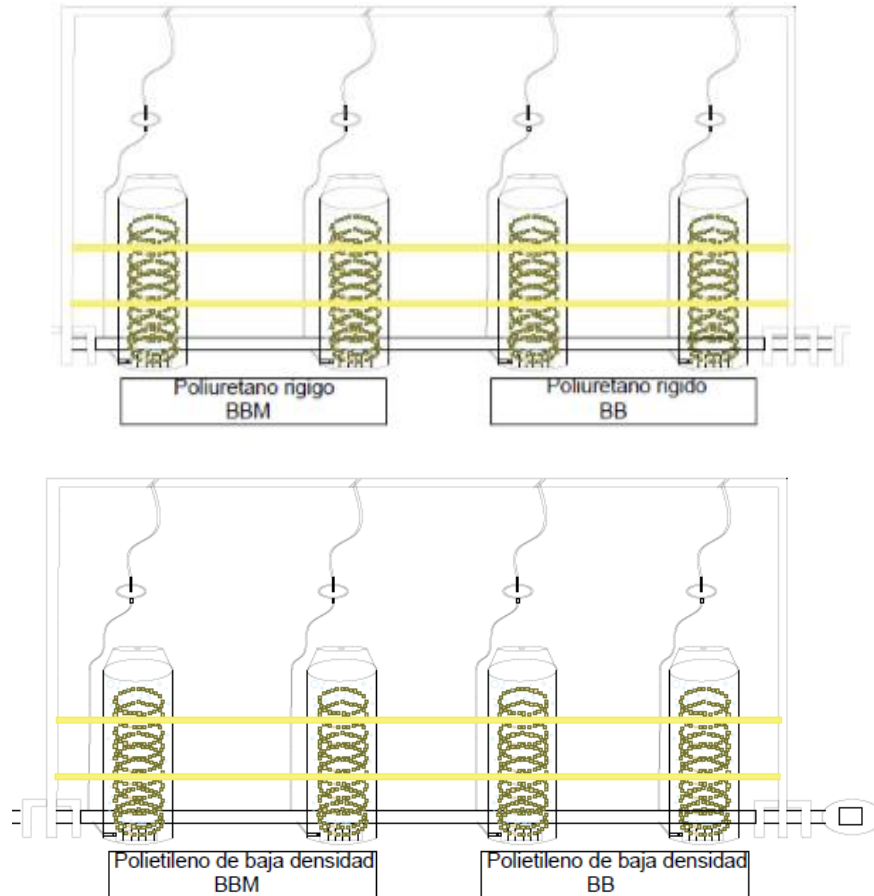


Figura 7. Esquema del montaje experimental del proceso de inmovilización. BB: Medio de cultivo Bold Basal, BBM: Medio de cultivo Bold Basal modificado.

Fuente: Autores

Para la determinación del material más adecuado para la inmovilización, se tuvieron en cuenta parámetros tanto cuantitativos como de observación, de los cuales se determinó el porcentaje de cumplimiento, basados en criterios que se reportan en la literatura. Cuantitativamente se evaluó la concentración de biomasa adsorbida, realizando pruebas de peso seco de acuerdo con el método de Moheimani (2013) y mediante observación se evaluó la desintegración, tamaño del poro (mediante observaciones en el microscopio y estereoscopio), crecimiento, proceso de inmovilización y costos de los materiales de inmovilización. Adicionalmente se midió oxígeno disuelto, temperatura y pH, controlando este último en un rango de 7 a 7.5 unidades, durante 21 días.

3.1.1. Aislamiento y cultivo de microalgas

Se colectaron muestras de agua residual y raspado de los canales de conducción del tratamiento secundario de la planta de tratamiento de agua residual de la Universidad Pontificia Bolivariana, Seccional Bucaramanga, de acuerdo a los Métodos Estándar (APHA, et al., 2012). Posteriormente, se llevaron las muestras al laboratorio de Agua Potable donde se acondicionaron en relación 1:1 con medio de cultivo bold basal en 5 reactores con un volumen útil de 3 litros, para iniciar el crecimiento de las microalgas.

El periodo de incubación duró 21 días, tomándose registros microscópicos, desde el inicio de la incubación hasta su finalización, aproximadamente cada dos días, con el fin de evaluar cualitativamente su crecimiento e identificar los diferentes géneros de microalgas nativas, con ayuda de claves taxonómicas (Bellinger & Sigee, 2010). En la figura 8 se encuentra el esquema del montaje utilizado.

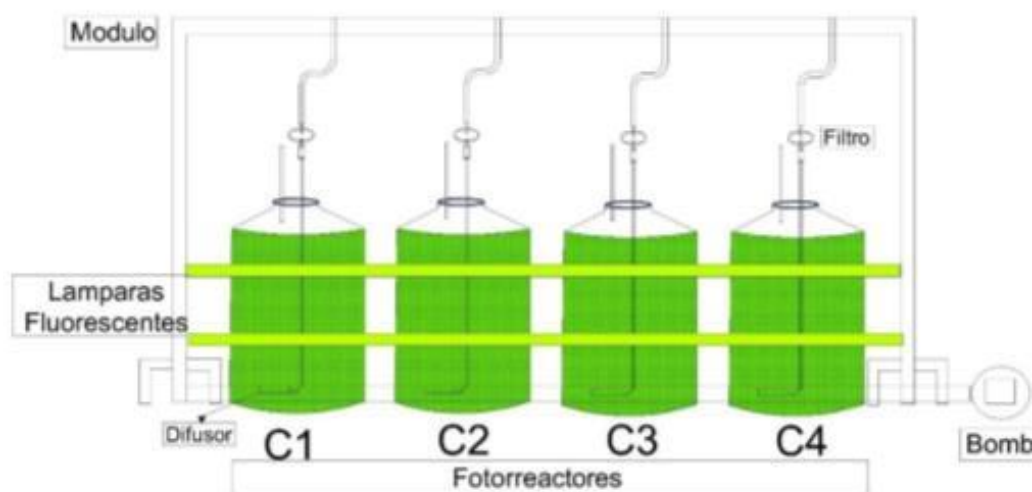


Figura 8. Esquema del montaje experimental del aislamiento y cultivo de microalgas en suspensión.
C: Cultivo de microalgas nativas.

Fuente: Autores

3.2. Factores de estudio

Para los factores de estudio se implementó un diseño factorial con dos factores, el primero correspondió a la concentración inicial de amonio en el agua residual sintética, este con tres niveles y el segundo factor fue el medio de cultivo utilizado durante el proceso de inmovilización, con dos niveles, cada uno por triplicado.

Las concentraciones iniciales de amonio en el agua residual sintética que se designaron fueron: 40, 120 y 200 mg/l NH_4^+ . Esta simuló las características de un efluente tratado anaeróbicamente a diferentes concentraciones de nitrógeno, manteniendo la relación de DQO, alcalinidad, amonio y ortofosfatos, 60/30/15/1, respectivamente. En la tabla 4, se presenta la composición del agua residual sintética.

Tabla 4. Composición de los diferentes tipos de aguas residuales utilizadas.

Clasificación	Compuesto/ Elemento	Reactivo utilizado	Concentración (mg/l) del compuesto/elemento en los diferentes tipos de agua residual sintética (ARS)		
			ARS I	ARS II	ARS III
Macronutrientes	Nitrógeno amoniacal	NH ₄ Cl	40	120	200
	Ortofósforo	KH ₂ PO ₄	2.6	8	13
	Azufre	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.781	0.781	0.781
	Potasio	KH ₂ PO ₄	0.747	2.298	3.735
	Calcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	9	9	9
	Magnesio	MgSO ₄ .7H ₂ O	6	6	6
Micronutrientes	Manganeso	MnCl ₂ .2H ₂ O	0.3	0.3	0.3
	Zinc	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.05	0.05	0.05
	Cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.026	0.026	0.026
	Molibdeno	MoO ₃	0.03	0.03	0.03
	Cobre	CuCl ₂ .2H ₂ O	0.0025	0.0025	0.0025
	Níquel	NiCl ₂ .6H ₂ O	0.007	0.007	0.007
Alcalinidad	Carbonatos	NaHCO ₃	160	480	800
Fuente de carbono	DQO	CH ₃ COONa.3H ₂ O	80	240	400

Fuente: Adaptado de Cerón-Vivas et al, 2012

Los tipos de medios de cultivo fueron: Bold Basal y Bold Basal Modificado, diferenciados por la ausencia de nitrógeno y fósforo, con el fin de evaluar la influencia que ejerce la inanición de estos nutrientes en etapas tempranas a la remoción de los mismos del agua residual sintética. Las composiciones de los medios de cultivo se encuentran en los anexos 1 y 2.

3.2.1. Combinación factorial

Los factores de estudio se evaluaron para cada una de las variables de respuesta, las interacciones y nomenclaturas que se designaron se mencionan a continuación en la tabla 5.

Tabla 5. Nomenclatura. Tipos de agua residual y medios de cultivo

NH₄⁺ inicial	40 mg/l	120 mg/l	200 mg/l
Medio de cultivo			
BBM	BBM40	BBM120	BBM200
BB	BB40	BB120	BB200

Fuente: Autores

3.3. Variables de respuesta

Las variables de respuesta en este proyecto fueron: la remoción de amonio, ortofosfatos, demanda química de oxígeno y la generación de nitratos. Adicionalmente se midieron cada 12 horas parámetros como temperatura, oxígeno disuelto y pH. Los métodos empleados para la medición de estos parámetros se encuentran registrados en la tabla 6.

Tabla 6. Parámetros y métodos empleados.

Parámetro	Método empleado
Nitrógeno amonio	Nessler, D1423-96 Wirth & Robinson (1933), mediante la utilización del equipo Grow Master para el análisis de nutrientes HI 83225 de HANNA Instruments, método.
Nitratos	Espectrofotométrica ultravioleta 4500-NO ₃ -B (APHA, 2012).
Ortofosfatos	Colorimétrico del Ácido Vanadomolibdofosfórico 4500-P C (APHA, 2012).
DQO	Titulométrico de Reflujo Cerrado 5220 – ROQ (APHA, 2012).
Temperatura	Medición con Multiparámetro
pH	
Oxígeno Disuelto	

Fuente: Autores

El montaje para la evaluación de la remoción de estos contaminantes se inició con la extracción del sobrenadante que contenía medio de cultivo y biomasa microalgal. Se realizó una limpieza con agua destilada de la superficie interna de cada reactor y luego se adicionó el agua residual sintética correspondiente a cada fotobiorreactor. Se realizó el montaje de 21 fotobiorreactores, de los cuales 3 eran blancos (sin

inoculo de microalgas), uno para cada concentración inicial de nitrógeno amonio. El montaje experimental se encuentra en la figura 9.

3.4. Análisis estadísticos

A nivel estadístico, se verificó la naturaleza gaussiana de los datos de las cuatro variables trabajadas (Nitrógeno, Fosforo, Nitratos y DQO), mediante pruebas de normalidad y homocedasticidad. Posteriormente se realizó un análisis de varianza lineal general univariado (ANOVA) con un nivel de significancia de 0.05 y un porcentaje de confianza del 95%. Finalmente se evaluó las diferencias significativas entre el tipo de agua residual sintética y el medio de cultivo utilizado en cada una de las variables dependientes, por medio de pruebas de análisis factorial (Efectos inter-sujetos).

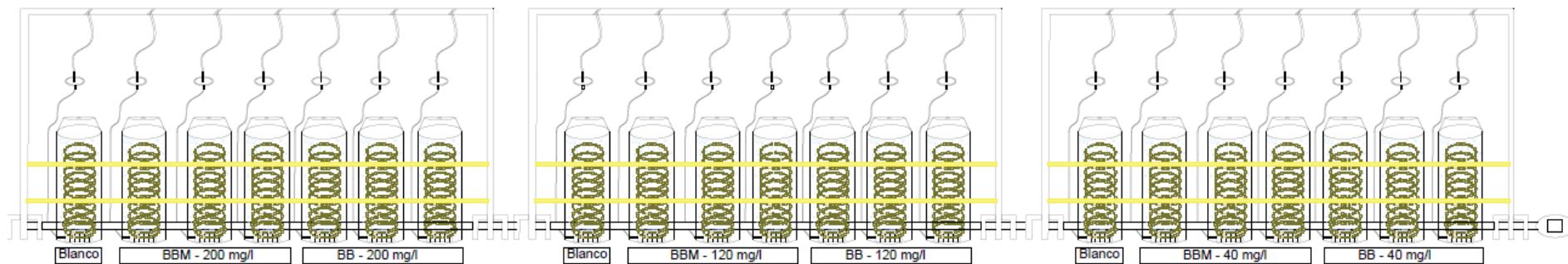


Figura 9. Esquema del montaje experimental de la remoción de nutrientes. 40-120-200 mg/l: Concentraciones de nitrógeno amonio en el agua residual sintética preparada.

Fuente: Autores

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1. PROCESO DE INMOVILIZACIÓN

Según la evaluación de los parámetros se obtuvo que el polietileno de baja densidad tuvo un porcentaje de cumplimiento del 100%, mientras que el poliuretano rígido obtuvo un 40%, este debido al incumplimiento de tres factores, desintegración, tamaño del poro y costos. La desintegración del poliuretano rígido se debe a la abrasión o destrucción del mismo en el momento de la extracción celular, por medio de la centrifugación de las espumas, como se puede evidenciar en la figura 10.



Figura 10. Fracción de poliuretano rígido en la muestra de biomasa nativa

Fuente: Autores

En cuanto al tamaño del poro, el poliuretano rígido presenta un menor tamaño en comparación con la del polietileno de baja densidad, lo que limita la formación de grandes colonias, así como la extracción de la biomasa celular. Las figuras 11 y 12 muestran una comparación de imágenes tomadas en el estereoscopio óptico y en el microscópico respectivamente. Finalmente, el costo del poliuretano rígido es aproximadamente el doble del polietileno de baja densidad, lo que hace una diferencia significativa a la hora de magnificar su escala.

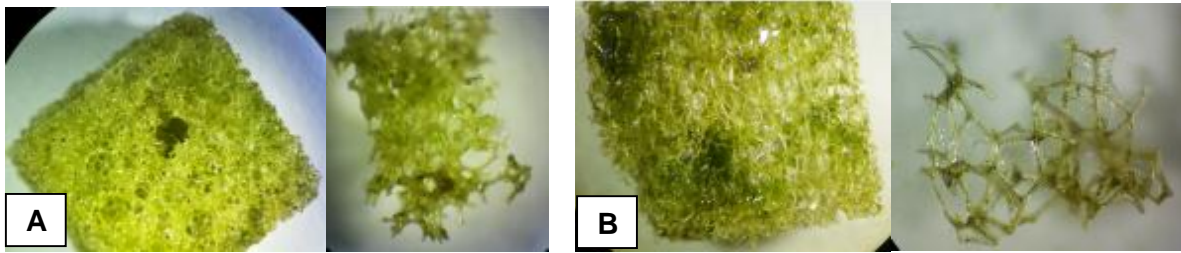


Figura 11. Observaciones en el estereoscopio de los materiales de inmovilización. A: poliuretano rígido, B: polietileno de baja densidad.

Fuente: Autores

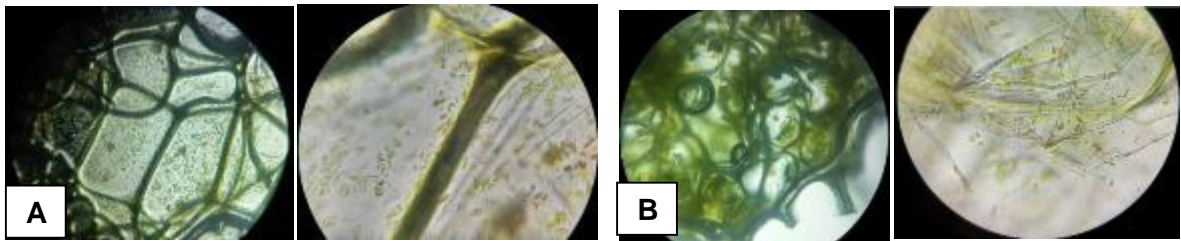


Figura 12.

Observaciones en el microscopio de los materiales de inmovilización. A: Polietileno de baja densidad, B: Poliuretano rígido

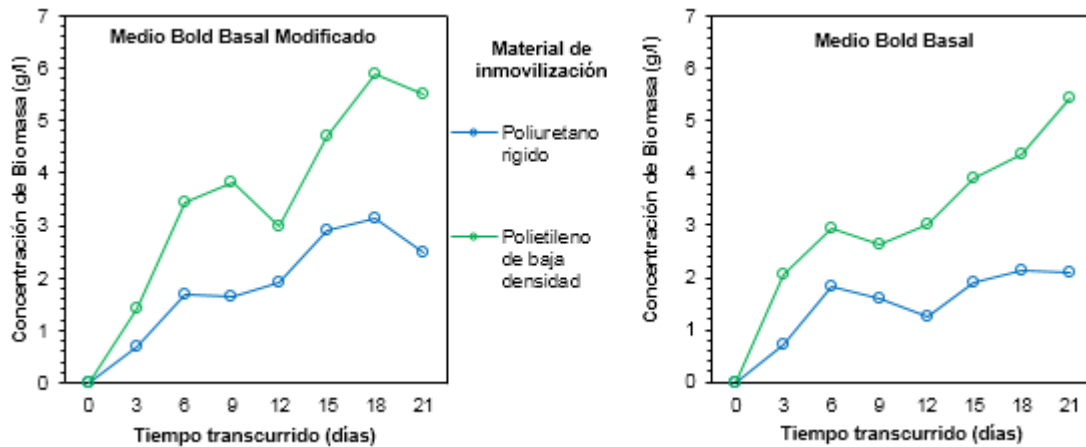
Fuente: Autores

Para la evaluación cuantitativa se tuvo en cuenta la curva de crecimiento arrojada en cada material de soporte, con los diferentes medios de cultivos utilizados (Bold Basal-BB y Bold Basal Modificado-BBM). En la gráfica 1 se observa la concentración de biomasa a través del tiempo para cada uno de los materiales de soporte utilizados para la inmovilización de microalgas y para cada medio de cultivo evaluado.

El polietileno de baja densidad adsorbió mayor cantidad de biomasa que el poliuretano rígido, con concentraciones de 5.7 y 2.7 g/l respectivamente, debido a que intervinieron factores físicos propios del material como el tamaño del poro, relacionados con las densidades de los materiales, 0.03-0.05 y 0.01-0.02 g/cm³ respectivamente, y la desintegración, los cuales influyeron en el crecimiento de las

microalgas. En el análisis estadístico se evidenció diferencias significativas entre los materiales de inmovilización ($p < 0.05$) (Ver anexo 5).

Grafica 1. Concentración de biomasa a través del tiempo en diferentes tipos de material de inmovilización y medios de cultivo.



Fuente: Autores

En los dos materiales de soporte se observó un ligero aumento en la concentración de biomasa en el medio BBM, lo que indicó que factores como la ausencia de nitrógeno y fósforo en el medio de cultivo, provoca un aumento en el metabolismo celular, estimulando mayores tasas de crecimiento (Rhee G. Y., 1978). Sin embargo, no arrojan diferencias significativas ($p > 0.05$) (Ver anexo 5), porque aunque el medio BBM fue preparado sin nutrientes, no hubo ausencia total de estos, debido a que el montaje se realizó con una relación 1:1 de medio de cultivo y biomasa algal, la cual fue cultivada con medio BB, que contenía un aporte significativo de nitrógeno y fósforo, adicional del aporte generado por el agua residual de la cual fueron aisladas.

Otras observaciones significativas durante la experimentación, fue el punto de saturación, el cual se evidencia solo en la gráfica con BBM, en donde a partir del día 19 se observó una disminución de la concentración de la biomasa en los dos materiales de inmovilización. Esto se atribuyó a la desorción de las microalgas,

debido al crecimiento en el medio circundante, lo que se evidencia en el anexo 4 en donde se muestra el seguimiento fotográfico. Adicionalmente, al culminar la fase de inmovilización las pruebas microscópicas mostraron que el proceso de inmovilización no afectó la existencia de ninguna de las microalgas, ya que no hubo ausencia de ninguno de los géneros que se identificaron en la primera fase. Sin embargo, se mostró una variación significativa en la distribución espacial, puesto que se observó gran formación de colonias, principalmente de los géneros de *Scenedesmus* y *Chlorellas*. En el anexo 6 se visualiza, las fotografías de la microscopia realizada.

Las variables como el pH, temperatura y oxígeno disuelto (OD), se midieron 2 veces al día, con el fin de mantener las condiciones óptimas de crecimiento. El pH se mantuvo a $7,0 \pm 0,3$, la temperatura a $26 \pm 1,5$ °C y OD a $7,0 \pm 0,2$ mg O₂/l. En la figura 13 se observa el montaje experimental realizado para el proceso de inmovilización de las microalgas.



Figura 13. Montaje de Inmovilización para la determinación del material de inmovilización.

Fuente: Autores

4.1.1. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE MICROALGAS NATIVAS

Mediante las observaciones microscópicas realizadas se destacó la existencia de dos divisiones de microalgas, *Chlorophyta* y *Bacillariophyta*, dentro de las cuales se destacan los géneros: *Chorella*, *Ulothrix*, *Haematococcus*, *Scenedesmus*, *Oocystis* y *Navicula*, *Pinnularia*, *Nitzschia*, *Stephanodiscus*, respectivamente. En el anexo 3 se muestran los registros microscópicos.

Los géneros que presentaron mayor cantidad en las muestras microscópicas que fueron obtenidas del efluente anaerobio de la PTAR UPB, son *Chollera*, *Scenedesmus* y *Navicula*. La presencia del genero *Chorella* puede deberse a que estas se desarrollan en medios ricos en nutrientes, como es el caso del agua residual doméstica, al igual que las *Scenedesmus* aunque estas presentan un limitante, puesto que se desarrollan solamente en medios eutróficos, es decir, en efluentes con altos niveles de nutrientes, principalmente de amonio; mientras que las *Chlorellas* tienen un rango más amplio de adaptación, por ello es una de las microalgas con más rápido crecimiento, según lo registrado por Ruiz, A (2011). En cuanto a la existencia representativa de las *Naviculas*, se atribuye a que en primera instancia, son una de las más representativas del phylum *Bacillariophyta*, siendo esta división capaz de crecer en agua salada y dulce, en rocas y suelo, aun bajo condiciones extremas de temperatura y salinidad (Scala, Carels, Falciatore, Chiusano, & Bowler, 2002). En segunda instancia, se caracterizan por tener polisacáridos heteroglucanos complejos como componentes extracelulares (Smestad, Haug, & Myklestad, 1975; Pereira, Leonard, Huang, Chuang, & Mukerji, 2004), que le confieren propiedades de agregación en diferentes sustratos como paredes, rocas y plantas superiores (Decho, 1990), relacionando esto con las posibles microalgas obtenidas de los raspados de las paredes de los canales de conducción. Adicionalmente se cree que algunos de los microorganismos presentes en las muestras, secretan complejos con sílice lo que les confieren a estas la seguridad de su supervivencia (Marsshall, 1991).

Adicional a las microalgas encontradas, se observó la presencia de rotíferos y protozoos flagelados, desempeñando estos últimos el papel de herbívoros, puesto que depredan algas, bacterias y microhongos, quienes a su vez son depredados por los rotíferos. En la figura 14, se muestran los protozoos y rotíferos encontrados, en las muestras de agua.

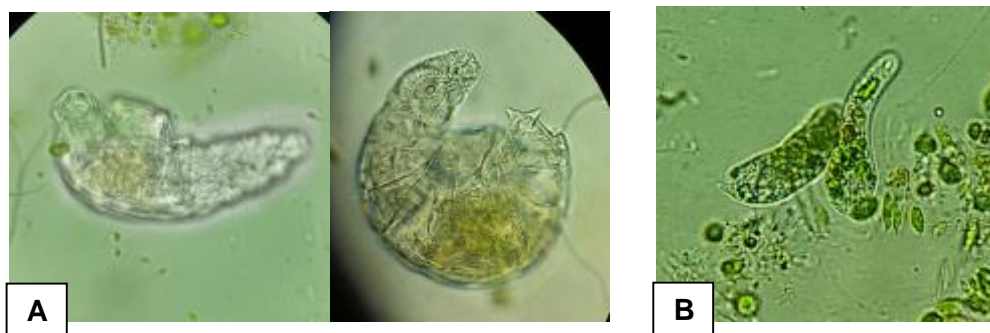
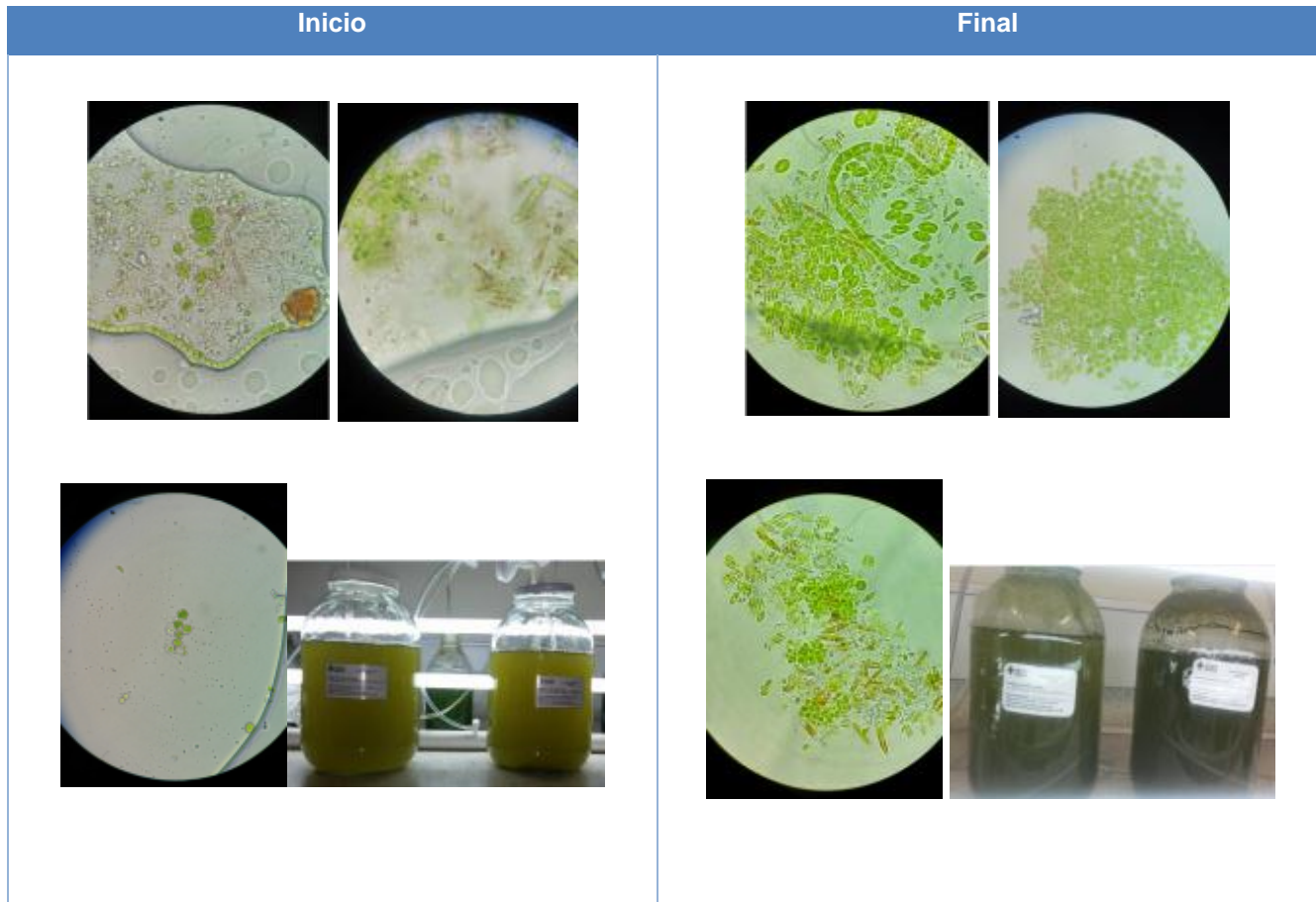


Figura 14. Observaciones en el microscopio de las muestras. A: Rotífero, B: Protozoo flagelado
Fuente: Autores

Una vez cultivadas las microalgas nativas, se observó un aumento en la densidad celular debido a la adición del medio de cultivo que acelera el crecimiento y la reproducción de algas de agua dulce. Esto se evidenció cualitativamente tanto microscópicamente, por el aumento del tamaño de las células, como macroscópicamente, por medio del cambio de la intensidad de color, el cual varió de un color verde oliva pálido a un verde hierba intenso, demostrando un ligero aumento de la división *Chlorophyta* sobre la *Bacillariophyta*. En la tabla 7, se visualiza las microalgas presentes al inicio y final de la fase de cultivo.

Las variables como el pH, temperatura y oxígeno disuelto (OD) se midieron frecuentemente, con el fin de mantener las condiciones óptimas de crecimiento. El pH se mantuvo entre un rango de $7,5 \pm 0,5$, la temperatura a 26 ± 1 °C y OD a $6,5 \pm 0,5$ mg O₂/l.

Tabla 7. Evolución microalgal durante el cultivo



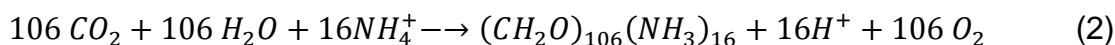
Fuente: Autores

4.2. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE AMONIO Y LOS TIPOS DE MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA REMOCIÓN DE NUTRIENTES

Las variables como pH, temperatura y oxígeno disuelto, se midieron cada 12 horas, con el fin de mantener las condiciones óptimas de crecimiento. El pH se mantuvo a $6,5 \pm 0,5$, debido a que en este rango se garantiza, que las remociones de amonio y ortofosfatos sean por la asimilación de las microalgas y no por factores adicionales como la conversión a nitratos en el caso del amonio y a la precipitación en los ortofosfatos, la temperatura a 24.8 ± 1.5 °C y OD a $8 \pm 0,5$ mg O₂/l.

4.2.1. Variación del pH

Durante el tiempo de experimentación se trató de controlar el pH, ya que este mostró tendencia al incremento durante los primeros días y a valores bajos en los últimos días. Esta tendencia fue igual en todos los reactores, pero con diferentes tiempos en la variación del pH, pues está relacionado con la cantidad de bicarbonato de sodio adicionado como fuente de alcalinidad. Es decir, los reactores con mayores concentraciones iniciales de nitrógeno, reportaron mayores pH iniciales, debido a una mayor cantidad de bicarbonato de sodio, de acuerdo a las relaciones establecidas para el agua residual sintética. Al transcurrir el tiempo se observó disminución de la concentración de alcalinidad a causa de su consumo por parte de las microalgas ya que, durante la fotosíntesis, los iones carbonato del agua proveen a los microorganismos el carbono necesario para su desarrollo, en forma de CO_2 (Ruiz, 2011). Adicionalmente, la degradación propia del reactivo provocó una disminución gradual del pH, según las características propias de cada reactor. Sin embargo, la disminución del pH también se atribuye al desequilibrio causado por la utilización de amonio como única fuente de nitrógeno, como se observa en la reacción de la Ecuación 2.



4.2.2. Remoción de nitrógeno (NH_4^+)

La remoción de NH_4^+ alcanzada durante los 15 días de experimentación para cada una de las combinaciones estudiadas se observa en la tabla 8.

Tabla 8. Porcentajes de remoción de nitrógeno (NH_4^+)

% Remoción Nitrógeno (NH_4^+)					
BB40	BBM 40	BB120	BBM120	BB200	BBM200
24,6	26,2	26,3	28,4	29,2	24,5

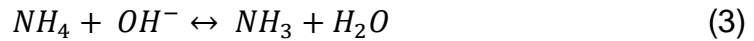
Fuente: Autores

Los porcentajes de remoción alcanzados con los tres tipos de agua residual sintética fueron similares, tanto en el medio cultivo BB como en BBM, encontrándose entre 24.5 y 29.2%, lo que demuestra que tanto el tipo de medio de cultivo como las concentraciones iniciales de nitrógeno del agua residual sintética no afectan significativamente la remoción de amonio. Los porcentajes obtenidos se debe a dos factores principalmente: primero, la agitación realizada en los reactores, debido a que la aireación utilizada fue baja para evitar la desorción de las microalgas de la matriz de inmovilización, sin embargo, esto provoca sedimentación, adherencia en las paredes del reactor, disminución de la tasa de intercambio de nutrientes y metabolitos, baja distribución de la luz en las células y variaciones drásticas de pH (Richmond & Becker, 1986); segundo, a los contenidos de nitrógeno, los cuales fueron posiblemente altos, lo que provoca limitación en la adsorción del mismo por las microalgas, ya que las tasas máximas de adsorción de nutrientes aumentan cuando la limitación de nitrógeno se vuelve más importante (Marsshall, 1991).

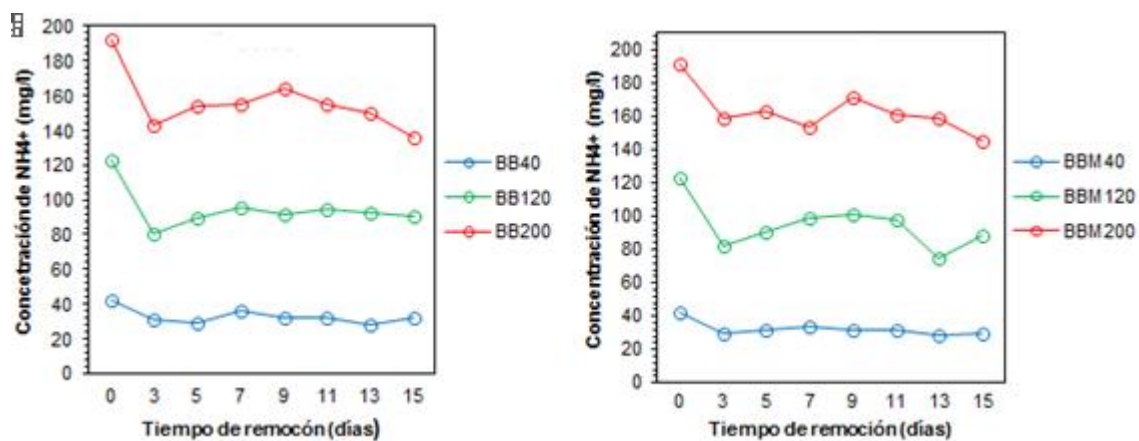
De acuerdo al análisis estadístico, no se presentaron diferencias significativas tanto para la concentración inicial de nitrógeno, como para los medios de cultivo ($p > 0.05$) (ver anexo 7). Esto debido a que otros factores fisicoquímicos y biológicos influyeron en las tasas de asimilación de manera específica, aislando los posibles efectos directos que hubieran podido tener las variables que se tuvieron en cuenta (medio de cultivo y concentración inicial de NH_4^+ en el agua residual).

La variación de la concentración de NH_4^+ en el tiempo, se muestra en la gráfica 2, donde se observa una disminución relevante de NH_4^+ en los primero días (hasta el día 3) en los dos tipos de medio de cultivo, debido posiblemente a cuatro factores: el aumento de la actividad metabólica de las células de microalgas, a las bacterias nitrificantes a causa de la afinidad específica por el sustrato (NH_4^+) como lo reporta Perez, (2009), a la oxidación del amonio debido a la aireación realizada y a la eliminación por la reacción del amonio a amoniaco, influenciada por el pH del medio de cultivo, ya que a valores de pH superiores a 7,0 la reacción de equilibrio

(Ecuación 3) se desplazada a la producción de NH_3 que es toxico para las microalgas (Ruiz, 2011).



Grafica 2. Concentración de nitrógeno (NH_4^+) a diferentes tipos de agua residual sintética y medios de cultivo.



Fuente: Autores

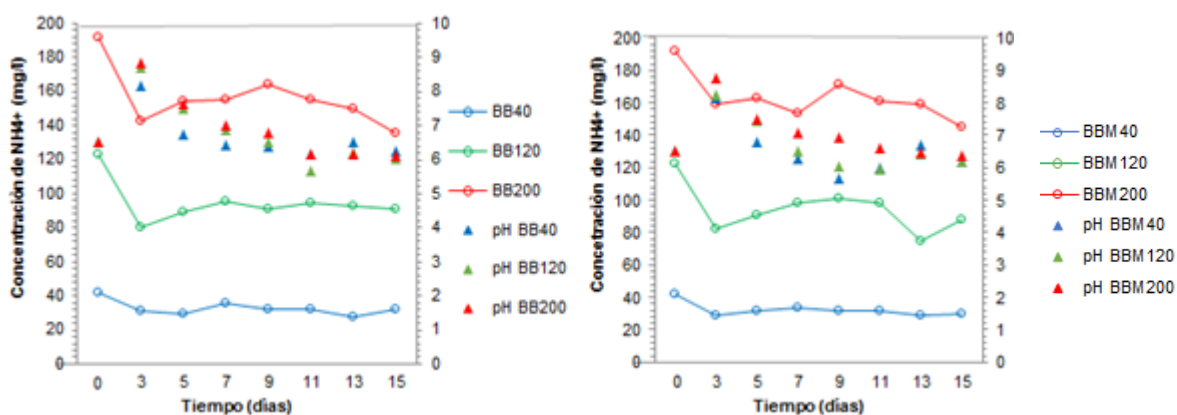
Durante la experimentación se observó la tendencia del aumento del pH, debido al continuo flujo de aire burbujeante (Martinez, Sanchez, Jimenez, El Yousfi, & Muñoz, 2000) y la adición de bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) como fuente de alcalinidad, lo que provoca la producción del OH^- (Ver ecuación 4).



Después del tercer día, se observó un aumento en la concentración de NH_4^+ , en BB-BBM 120 Y BB-BBM 200, debido posiblemente a que las microalgas secretan amonio al medio por un exceso de nitrógeno dentro de las rutas metabólicas, dado por el consumo de moléculas nitrogenadas (Perez, 2009). Posteriormente, la concentración de NH_4^+ , mostró una pequeña disminución, que se atribuye a la asimilación por parte de las microalgas, puesto que factores como el pH, que pueden afectar los porcentajes de remoción, se controlaron. Además, el

agotamiento de bicarbonato de sodio fue relevante. Para BB-BBM40, no se observan variaciones significativas de la remoción, a causa del posible estrés de las microalgas por la rápida disminución del pH. En la gráfica 3 se puede observar la tendencia del pH, a pesar del control manual del pH.

Grafica 3. Resultados de pH y NH_4^+ a través del tiempo en los diferentes medios de cultivo.



Fuente: Autores

4.2.3. Remoción de Ortofosfatos - PO_4^{3-}

La remoción de PO_4^{3-} durante los 15 días de experimentación en los diferentes tipos de aguas residuales sintéticas y medios de cultivo, se observa en la tabla 9. Se registra una mayor remoción, cuando se empleó medio de cultivo BBM, en todos los tipos de agua residual sintética, lo que indica que este tipo de medio de cultivo influye positivamente en la asimilación de ortofosfatos por parte de las microalgas, debido a su requerimiento en diferentes procesos metabólicos.

Tabla 9. Porcentaje de remoción de ortofosfatos (PO_4^{3-})

% Remoción Ortofosfatos					
BB40	BBM 40	BB120	BBM120	BB200	BBM200
33,9	67,4	20,4	34,1	36,2	41,5

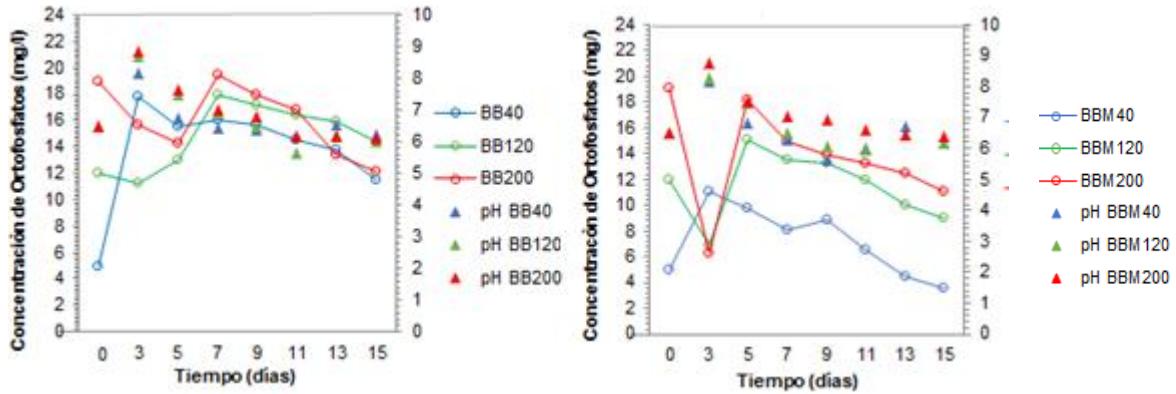
Fuente: Autores

De acuerdo al análisis estadístico, se presentaron diferencias significativas para los medios de cultivo ($p < 0.05$) en la eliminación de ortofosfatos, caso contrario ocurrió en las diferentes aguas residuales ($p > 0.05$) (ver anexo 8).

La mayor remoción fue registrada en el BBM40 (disminuyendo de 11 a 3,5 mg/l PO_4^{3-}), con un porcentaje de remoción de 67.4%, debido posiblemente a que las microalgas reportan mayores porcentajes de adsorción cuando la limitación del nutrimento aumenta, como se registró en la remoción de NH_4^+ (Marshall, 1991).

En la gráfica 4 se registra el comportamiento de la concentración de ortofosfatos en las diferentes aguas residuales sintéticas con los medios de cultivo respectivos. En esta se observa una disminución de la concentración durante los primeros días de experimentación en BB-BBM120 y BB-BBM200, debido a dos posibles razones: la primera al consumo por las microalgas y la segunda a la precipitación del fósforo, ya sea en forma de fosfato cálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), hidroxiapatita (fosfato de calcio cristalino: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) o estruvita, un cristal de magnesio, amonio y fosfato ($\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Esta precipitación de fosfato vendría asociada o determinada por el pH del medio, ya que a pH mayores (ver grafica 4), la eliminación por precipitación es mayor. Posteriormente, se observó un aumento drástico que se atribuye a la dilución de los ortofosfatos que se precipitaron previamente, debido a la disminución del pH y la posible desorción de ortofosfatos del material de inmovilización, puesto que, este no solo alberga gran cantidad de microalgas sino también soluciones líquidas de nutrientes de las fases anteriores. De ahí en adelante se observó una disminución de la concentración de ortofosfatos atribuida solo a la asimilación por parte de las microalgas, ya que el pH se mantuvo en un rango bajo (6.5 ± 0.3), evitando la formación de sales de fosfato.

Grafica 4. Resultados de pH y PO_4^{3-} a través del tiempo



Fuente: Autores

El comportamiento en la concentración de ortofosfatos en BB-BBM40 fue diferente, debido a que en los primeros días tuvo un aumento gradual, ya que las condiciones que presenta esta agua residual sintética no permitían la precipitación de los orfosfatos en forma de sal, puesto que el pH registraba valores más bajos, con respecto a las otras aguas residuales. Posteriormente su comportamiento fue similar a las demás.

4.2.4. Generación de Nitratos (NO_3^-)

La medición de nitratos es una medida indirecta para la confirmación de la existencia de bacterias nitrificantes y a la oxidación del amonio a causa de la aireación, justificando uno de los factores de la remoción de NH_4^+ . De acuerdo al análisis estadístico, tanto la concentración inicial de nitrógeno en el agua residual sintética, como el medio de cultivo empleado, muestran diferencias significativas con respecto a la generación de nitratos con ($p < 0.05$) (Ver anexo 9).

Como se evidencia en los porcentajes de generación registrados tabla 10, en donde la menor producción de nitratos, se muestra en BB-BBM200, debido posiblemente a que esta agua residual presenta grandes cantidad de nutrientes lo que inhibe el desarrollo metabólico de las bacterias y los mayores porcentajes de producción se reportan en BB-BBM40 y BB-BBM120. Lo que indica que las concentraciones

iniciales de amonio en el agua residual afectan la producción de nitratos, al igual que los tipos de medios de cultivo. La influencia más marcada en los medios de cultivo se evidencio en las concentraciones de 40 y 120 mg/l NH_4^+ , teniendo como resultados mayores porcentajes de generación en el medio de cultivo Bold Basal Modificado, evidenciando que la limitación de nitrógeno y fosforo en la fase de inmovilización aumenta la actividad metabólica de los microorganismo presentes en el sistema.

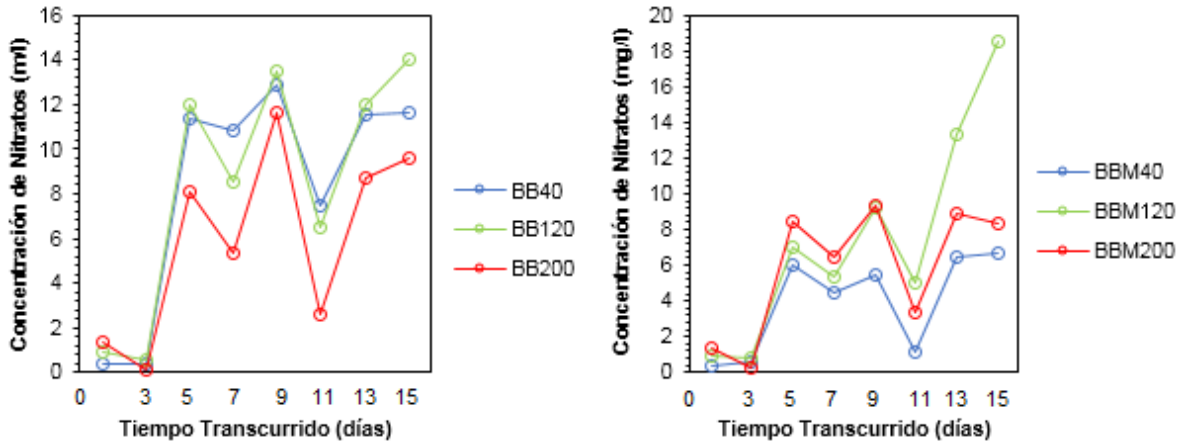
Tabla 10. Porcentaje de generación de Nitratos (NO_3^-)

% Generación Nitratos (mg/l)					
BB40	BBM 40	BB120	BBM120	BB200	BBM200
29,8	16,5	14,4	19,3	5,9	5,1

Fuente: Autores

Aunque las microalgas consumen tanto amonio como nitrato, estas prefieren más el amonio. Marshall (1991) reporta que a concentraciones de NH_4^+ por encima de $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, se inhibe la absorción de NO_3^- , por parte de las microalgas, debido a que estas conservan energía al utilizar el NH_4^+ ya que el NO_3^- debe ser reducido por la célula hasta NH_4^+ antes de incorporarla en los aminoácidos. Razón por la cual en la gráfica 5, tanto en BB como BBM se evidencia una tendencia de aumento, debido posiblemente a que no se logra un equilibrio entre la generación por parte de las bacterias y la asimilación por parte de las microalgas. Sin embargo, durante el proceso se evidencian picos que suben y bajan debido a la rápida transición del NO_2^- al NO_3^- .

Grafica 5. Concentración de Nitrato en diferentes tipos de agua residual sintética y medios de cultivo



Fuente: Autores

4.3.5. Remoción de demanda química de oxígeno - DQO

Las microalgas pueden emplear como fuente de carbono el CO₂ presente en la atmósfera, así como los iones bicarbonato (HCO₃⁻) con la ayuda de la enzima anhidrasa carbónica y los iones de acetato. En la tabla 11 se presentan los porcentajes de remoción de DQO, alcanzándose valores que van desde el 89% hasta el 100%, de acuerdo a la adición de acetato de sodio en el agua residual sintética, por lo que se afirma que la concentración inicial de amonio del agua residual sintética influyo en la remoción de DQO, no por la concentración misma sino por la relación que se mantuvo entre reactivos, teniendo como base las concentraciones iniciales de amonio, en el caso de los tipos de medio de cultivo estos no mostraron afectación alguno en las remociones de DQO.

La remoción no solo se atribuye a la asimilación por parte de las microalgas, sino a la degradación propia del acetato de sodio debido a la oxidación por parte de las bacterias presentes en los reactores, ya que estos no fueron esterilizados previamente. De acuerdo al análisis estadístico, se presentaron diferencias significas para la concentración inicial de nitrógeno ($p < 0.05$) al momento de la

eliminación de DQO, caso contrario ocurrió con el medio de cultivo ($p > 0.05$) (ver anexo 10).

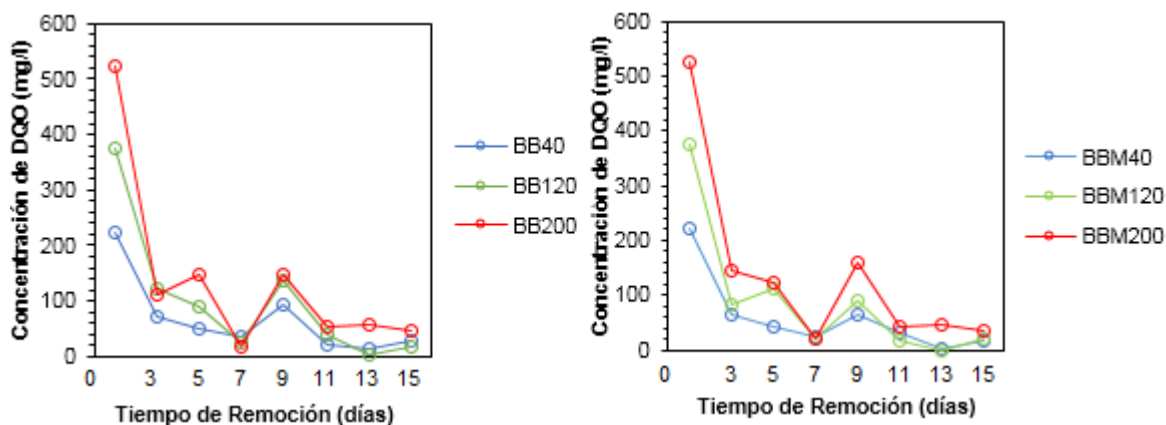
Tabla 11. Porcentaje de remoción de DQO

% Remoción DQO (mg O ₂ /l)					
BB40	BBM 40	BB120	BBM120	BB200	BBM200
94,4	99,4	98,9	100	89,4	90,9

Fuente: Autores

En la gráfica 6 se registran la variación de la concentración de DQO en el tiempo mostrando que al tercer día se obtuvo aproximadamente un 73% de remoción en todos los tipos de agua residual sintética con los diferentes medios de cultivo, debido a la oxidación del reactivo utilizado y al consumo por parte de los microorganismos. Después de este tiempo la disminución de la concentración de DQO no mostró variaciones significativas, mostrando algunos picos de aumento causados posiblemente por la muerte celular, incrementado esta concentración.

Grafica 6. Concentración de DQO a diferentes tipos de agua residual sintética y medios de cultivo.



Fuente: Autores

4.2.6. Observaciones Microscópicas

Al inicio y final de la tercera fase se tomaron pruebas microscópicas, las evidencias fotográficas se encuentran en los anexos 11 y 12, respectivamente. Al inicio de la fase de remoción (final de la fase de inmovilización) se registró la existencia de todos los grupos de microalgas identificadas en la fase I, no obstante, se observó en mayor cantidad los géneros *Scenedesmus*, *Chlorellas* y *Oocystis*, en orden decreciente. Sin embargo, el cambio de hábitat provocó que los resultados microscópicos finales arrojaran una diferencia marcada entre los tipos de agua residual sintética utilizada, en BB-BBM40 se observó mayor cantidad de *Navicula* y *Pinnularia*, en BB-BBM120 se observó una distribución equitativa de *Navicula*, *Pinnularia* y *Chlorella*, mientras que en BB-BBM200 la mayor cantidad era de *Chlorellas*. La presencia del phylum *Bacillariophyta* en BB-BBM40 se debe a su capacidad de resistir las alteraciones físico-químicas extremas, que en este caso fue principalmente la variación del pH hasta niveles muy bajos (Morales, y otros, 2006), puesto que en esta agua residual el agotamiento del bicarbonato de sodio fue muy rápido. En BB-BBM120 se observó el punto de equilibrio dinámico en el cual se logró la supervivencia tanto de la *Navicula*, *Pinnularia* como de las *Chlorellas*, puesto que esta agua residual no sufrió cambios drásticos de pH durante el tiempo de experimentación. Finalmente, la presencia de las *Chlorellas* en BB-BBM200 se debe a la afinidad que presentan a las altas concentraciones de nutrientes.

Lo anteriormente descrito también se evidenció macroscópicamente, mediante la coloración de la estructura de inmovilización. Los montajes (BB-BBM40 y BB-BBM120) con presencia significativa del phylum *Bacillariophyta* se tornaron de un color verde pasto a un marrón caqui y aquellos donde las *Chlorellas* fueron las protagonistas, el soporte solo intensificó su color inicial sin presentar variaciones (Ver figura 15).



Figura 15. Montaje experimental de la remoción de nutrientes
Fuente: Autores

5. CONCLUSIONES

- La muestra de microalgas tomada del efluente anaerobio de la planta de tratamiento de la Universidad Pontificia Bolivariana Seccional Bucaramanga, fue apta para su cultivo en el laboratorio bajo condiciones controladas de luz, temperatura, pH y aireación. Se identificaron dos divisiones taxonómicas de microalgas, *Chlorophyta* y *Bacillariophyta*, dentro de los cuales se destacan los géneros: *Chorella*, *Ulothrix*, *Haematococcus*, *Scenesdesmus*, *Oocystis* y *Navicula*, *Pinnularia*, *Nitzschia*, *Stephanodiscus*, respectivamente. Presentando mayor cantidad los géneros *Chorella*, *Scenesdesmus* y *Navicula*.
- El material que presentó un mejor desempeño en la inmovilización de microalgas fue el polietileno de baja densidad, con un cumplimiento del 100% de los criterios de elección planteados. Se obtuvo mayor concentración de biomasa para el medio de cultivo Bold Basal Modificado que para el Bold Basal, con 5.9 y 5,5 g/l, respectivamente.
- El porcentaje de remoción en promedio registrado para NH_4^+ fue de 26.5%, sin mostrar diferencias significativas entre los tipos de agua residual sintética utilizados. Los bajos porcentajes de remoción se atribuyen posiblemente a la saturación de nutrientes y a que la inmovilización limita en cierta forma la transferencia de masa, luz, intercambio gaseoso y homogenización del pH, por la baja agitación a la que se mantuvo.
- Los porcentajes de remoción obtenidos para los PO_4^{3-} fueron mayores, registrándose porcentajes de remoción hasta de un 67,4%, correspondiente al agua residual sintética con concentración inicial de 40 mg/l NH_4^+ . Las remociones de estos dos nutrientes presentaron mayores porcentajes cuando la inmovilización se realizó con el medio de cultivo Bold Basal

Modificado, indicando que la ausencia de nitrógeno y fosforo en etapas tempranas aumentan los niveles de adsorción cuando entran en contacto con estos nutrientes.

- Los resultados de NO_3^- revelaron la presencia de bacterias nitrificantes y a la oxidación de amonio causada por la aireación, factores que contribuyeron a la remoción de NH_4^+ . En cuanto a los resultados de DQO, la remoción fue aproximadamente de 73% al tercer día en todos los tipos de aguas residuales sintéticas con los diferentes medios de cultivo, debido a la asimilación por los microorganismos y la oxidación propia del acetato de sodio.
- La variación de los géneros de microalgas durante la fase de remoción se debe principalmente a los cambio de pH y a la cantidad de nutrientes, siendo las células más resistentes a estos cambios *Navicula*, *Pinnularia* y *Chlorella*. respectivamente.
- Según los registros microscópicos de la segunda fase, se logró inmovilizar con éxito por adsorción todos los géneros de microalgas identificadas, además de bacterias, protozoos y rotíferos.
- Con este estudio se concluye que el proceso de inmovilización por si misma posiblemente no afecta significativamente el metabolismo de las microalgas, sin embargo, si se adicionan factores externos, como el pH y la saturación de nutrientes, ocasionan en las células un grado de estrés alto, provocando disminución en su actividad metabólica que se ve reflejada en los bajos porcentajes de remoción de nutrientes.

6. RECOMENDACIONES

- Se aconseja implementar como material de inmovilización en futuros estudios, el polietileno de baja densidad, ya que por sus propiedades intrínsecas permiten tener un alto grado de adherencia de las microalgas, concentrando mayores cantidades de biomasa, además de ser un material económico y asequible en el mercado. Así mismo se sugiere, utilizar un menor grosor del mismo, con el fin de evitar el efecto de auto-sombreado, en donde las microalgas adheridas a la superficie del material restringen la transferencia de masa, luz e intercambio gaseoso para las microalgas internas.
- Se recomienda fijar concentraciones iniciales de nitrógeno inferiores a las utilizadas en este proyecto y establecer concentraciones iniciales de biomasa.
- Es necesario tener un control exhaustivo de variables fisicoquímicas o biológicas en el cultivo, principalmente el pH y la agitación, si el propósito del estudio es determinar con mayor precisión los porcentajes de remoción de nutrientes por parte de las microalgas.
- Para el tratamiento de las aguas residuales con inmovilización de microalgas se sugiere realizar estudios con reactores semicontinuos y continuos, puesto que son los más usados en estos procesos. Esto implica un mayor nivel de complejidad en el montaje experimental, sin embargo, es muy importante observar el comportamiento de las microalgas bajo dichas condiciones si se pretende escalar el tratamiento.

- En este tipo de proyectos es necesario tener un reactor de control con microalgas suspendidas en cada tipo de agua residual sintética, puesto que es de gran importancia establecer relaciones entre las dos formas de cultivo (suspendido e inmovilizado). Lo anterior permitiría establecer los factores que afectan tanto al crecimiento de las microalgas y la adsorción de los nutrientes.
- Por otro lado, sería útil determinar las condiciones en las que queda el material de soporte después del proceso de inmovilización, para definir la reutilización del soporte.
- Finalmente, se recomienda realizar estudios metabólicos de las microalgas aisladas del efluente anaerobio de la PTAR UPB, con el objetivo de establecer los posibles subproductos a obtener de la biomasa producida en dichas aguas mediante inmovilización.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abalde, A., Cid, A., Fidalgo, P., Torres, E., & Herrero, C. (1995). *Microalgas: Cultivos y Aplicaciones*. La Coruña, España.
- Abe, K., Matsumura, I., Imamaki, A., & Hirano, M. (2003). Removal of inorganic nitrogen sources from water by the algal biofilm of the aerial microalga *Trentepohlia aurea*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, *19*, 325–328.
- Akhtar, N., Saeed, A., & Iqbal, M. (2003). *Chlorella sorokiniana* immobilized on the biomatrix of vegetable sponge of *Luffa cylindrica*: a new system to remove cadmium from contaminated aqueous medium. *Bioresour. Technol.*, *88*, 163-165.
- APHA, A. (2012). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 22 th Edition*. Washington, DC: American Public Health Association.
- AST Ingeniería S.L. (2013). En *Aplicaciones de las microalgas: Estado de la tecnica* (págs. 9-10). Gijón, España: Malgas.
- Avery, S., Codd, G., & Gadd, G. (1993). Salt-stimulation of caesium accumulation in the euryhaline microalga *Chlorella salina*: potential relevance to the development of a biological Cs-removal process. *J. Gen. Microbiol.*, *139*, 2239–2244.
- Barsanti, L., & Gualtiere, P. (2006). *Algae, Anatomy, biochemistry & Biotechnology*. New York: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Bayramoğlu, G., & Arica, M. (2009). Construction a hybrid biosorbent using *Scenedesmus quadricauda* and Ca-alginate for biosorption of Cu(II), Zn(II) and Ni(II): kinetics and equilibrium studies. *Bioresour. Technol.*, *100*, 186–193.
- Bayramoğlu, G., Tuzun, I., Celik, G., Yilmaz, M., & Arica, M. (2006). Biosorption of mercury(II), cadmium(II) and lead(II) ions from aqueous system by microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* immobilized in alginate beads. *Int. J. Miner. Process*, *81*, 35–43.
- Bellinger, E. G., & Sigeo, D. C. (2010). *Freshwater Algae. Identification and Use as Bioindicatoris*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
- Bischoff, H. W., & Bold, H. C. (1963). *Bischoff, H. Phycological Studies. IV. Some Algae from Enchanted Rock and Related Algae Species*. Texas, USA: Bischoff, H. W., & Bold, H. C. (1963). Phycological Studies. IV. Some AlgUniversity of Texas Publications number 6318.
- Blanco, A., Sanz, B., Llama, M., & Serra, J. (1999). Biosorption of heavy metals to immobilized *Phormidium laminosum* biomass. *J. Biotechnol.*, *69*, 227–240.
- Blanco, V., & Villamizar, S. (2014). *Efecto del glicerol residual en la deposición de lípidos y carbonhidratos en Chlorella Vulgaris UTEX 1803 como materia prima para la producción de biocombustibles de tercera generación. (Tesis de grado)* . Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.
- Borowitzka, M. (1988). Fats, oils and carbohydrates. In: *Microalgal biotechnology*. Press Cambridge University, 57–87.

- Chen, Y. (2003). Immobilized *Isochrysis galbana* (Haptophyta) for long-term storage and applications for feed and water quality control in clam (*Meretrix lusoria*) cultures. *J. Appl. Phycol.*, *15*, 439–444.
- Codd, G. (1987). Immobilized micro-algae and cyanobacteria. *Br. Phycol. Soc. Newslett.*, *24*, 1–5.
- Cohen, Y. (2001). Biofiltration – the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. *Bioresour. Technol.*, *77*, 257-274.
- da Costa, A., & Leite, S. (1991). Metals biosorption by sodium alginate immobilized *Chlorella homosphaera* cells. *Biotechnol. Lett.*, *13*, 559–562.
- Danilov, R., & Ekelund, N. (2001). Comparison of usefulness of three types of artificial substrata (glass, wood and plastic) when studying settlement patterns of periphyton in lakes of different trophic status. *J. Microbiol. Methods*, *45*, 167–170.
- De Bashan, L., & Bashan, Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource Technology*, *101*, 1611-1627.
- Decho, A. W. (1990). Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev.*, *28*, 73-153.
- Falkowski, P., & Raven, J. (1997). *Aquatic Photosynthesis*. Malden, USA: Blackwell Science.
- Fierro, S., Sánchez, M., & Copalcúa, C. (2008). Nitrate and phosphate removal by chitosan immobilized *Scenedesmus*. *Bioresour. Technol.*, *99*, 1274-1279.
- Garbisu, C., Gil, J., Bazin, M., Hall, D., & Serra, J. (1991). Removal of nitrate from water by foam-immobilized *Phormidium laminosum* in batch and continuous flow bioreactors. *J. Appl. Phycol.*, *3*, 221–234.
- Garbisu, C., Gil, J., Bazin, M., Hall, D., & Serra, J. (1991). Removal of nitrate from water by foam-immobilized *Phormidium laminosum* in batch and continuous-flow bioreactors. *J. Appl. Phycol.*, *3*, 221–234.
- Garbisu, C., Hall, D., & Serra, J. (1993). Removal of phosphate by foam-immobilized *Phormidium laminosum*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, *57*, 181–189.
- Garzón, C., & Barragán, B. E. (2008). Inmovilización microbiana: Técnicas y usos en el tratamiento de residuos tóxicos. *Sistemas Ambientales*, *2*, 23-34.
- Gil, J., & Serra, J. (1993). Nitrate removal by immobilized cells of *Phormidium uncinatum* in batch culture and a continuous-flow photobioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, *39*, 782–787.
- Gonzales, A. M. (2000). *Alternativas en el cultivo de Microalgas (Tesis de pregrado)*. Guayaquil, Ecuador.
- Gonzales, L., Canizares, R., & Baena, S. (1997). Efficiency of ammonia and phosphorus removal from Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresource Technology*, *60*, 259-262.
- Graham, L., & Wilcox, L. W. (2000). *Algae Upper Saddle River*. USA: Prentice Hall.

- Greene, B., & Bedell, G. (1990). *Algal gels or immobilized algae for metal recovery*. In: Akatsuka, I. (Ed.), *Introduction to Applied Phycology*. The Hague, The Netherlands: SPB Academic Publishing BV.
- Grobbelaar, J. (1994). Turbulence in mass algal cultures and the role of light/dark. *J. Appl. Phycol.*, 6, 331–35.
- Hernandez, J., de-Bashan, L., Rodriguez, D., Rodriguez, Y., & Bashan, Y. (2009). Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils. *Eur. J. Soil Biol.*, 45, 88-93.
- Huang, G., Huang, G., Wang, Y., & Wang, Y. (2003). Nitrate and phosphate removal by co-immobilized *Chlorella pyrenoidosa* and activated sludge at different pH values. *Water Qual. Res. J. Can.*, 38, 541-551.
- Jeanfils, J., & Thomas, D. (1986). Culture and nitrite uptake in immobilized *Scenedesmus obliquus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 417-422.
- Jiménez, M., Sánchez, P., Romero, O., Fernandez, D., & Pérez, C. (2004). Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure. *Enzyme Microb. Tech.*, 34, 392-398.
- John, D., Whitton, B., & Brook, A. (2002). *The Fresh water Algal Flora of the British Isles*. Cambridge, UK.: Cambridge University Press.
- Kaplan, D., Richmond, A., Dubinsky, Z., & Aaronson, A. (1986). Algal nutrition. En e. A. Richmond (Ed.), *Handbook of Microalgal Mass Culture* (págs. 147-98). CRC Press, Boca Raton.
- Lau, P., Tam, N., & Wong, Y. (1997). Wastewater nutrients (N and P) removal by carrageenan and alginate immobilized *Chlorella vulgaris*. *Environ Technol*, 18, 945-951.
- Lee, Y. K. (2004). Algal Nutrition. Heterotrophic Carbon Nutrition. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, 116-124.
- Leenen, E., dos Santos, V., Grolle, K., Tramper, J., & Wijffels, R. (1996). Characteristics of and selection criteria for support materials for cell immobilization in wastewater treatment. *Water Research*, 30, 2985-2996.
- Liu, Y., Seki, M., Tanaka, H., & Furusaki, S. (1998). Characteristics of loofa (*Luffa cylindrica*) sponge as a carrier for plant cell immobilization. *J. Ferment. Bioeng.*, 85, 416–421.
- Luan, T., Jin, J., Chan, S., Wong, Y., & Tam, N. (2006). Biosorption and biodegradation of tributyltin (TBT) by alginate immobilized *Chlorella vulgaris* beads in several treatment cycles. *Process Biochem*, 41, 1560–1565.
- Maeda, S., & Sakaguchi, T. (1990). *Accumulation and detoxification of toxic elements by algae*. In: Akatsuka, I. (Ed.), *Introduction to Applied Phycology*. The Hague, Netherlands: SPB Academic Publishing BV.
- Mallick, N. (2002). Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review. *BioMetals*, 15, 377-390.
- Mallick, N., & Rai, L. (1994). Removal of inorganic ions from wastewaters by immobilized microalgae. *World J. Microb. Biotechnol.*, 10, 439-443.

- Marshall, W. (1991). *Biología de las Algas, Enfoque fisiológico*. Ciudad de México, México: LIMUSA, S.A.
- Martinez, M., Sanchez, S., Jimenez, J., El Yousfi, F., & Muñoz, L. (2000). Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 73, 263-272.
- Masojídek, J., Koblížek, M., & Torzillo, G. (2004). Photosynthesis in Microalgae. (E. b. Richmond, Ed.) *Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology*, 20-39.
- Mehta, S., & Gaur, J. (2001). Removal of Ni and Cu from single and binary metal solutions by free and immobilized *Chlorella vulgaris*. *Eur. J. Protistol.*, 37, 261-271.
- Moheimani, & R, N. (2013). Standard Methods for Measuring Growth of Algae and Their Composition . *Australia: Springe Science+Business Media Dordrecht*, 265-284.
- Morales, N., Arévalo, K., Ortega, J., Briceño, B., Andrade, C., & Morales, E. (2006). El pH y la fuente nitrogenada como moduladores del crecimiento de la macrófita *Lemna sp.* *Fac. Agron.*, 23, 70-83.
- Moreno, I., Campana, O., Lubián, L., & Blasco, J. (2005). Calcium alginate immobilized marine microalgae: experiments on growth and short-term heavy metal accumulation. *Mar. Pollut. Bull.*, 51, 823–929.
- Moreno, I., Lubián, L., & Blasco, J. (2007). Sediment toxicity tests involving immobilized microalgae *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *Environ. Int.*, 33, 481-485.
- Moreno-Garrido, I. (2008). Microalgae immobilization: current techniques and uses. *Bioresour. Technol.*, 99, 3949-3964.
- Nazar, J. (2007). Biofilms bacterianos. *Revista de otorrinolaringología*, 67, 61-72.
- Norton, T., Melkonian, M., & Andersen, R. (1996). Algal biodiversity. *Phycologia*, 35 (50), 308–326.
- Noyola, A., Morgan, J. M., & Güereca, L. P. (2013). *Selección de tecnologías para el tratamiento de aguas residuales municipales*. Ciudad de Mexico.
- Olguín, E. (2003). Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnol. Adv.*, 22, 81–91.
- Oungbho, K., & Müller, B. (1997). Chitosan sponges as sustain release drug carriers. *Int. J. Pharm.*, 156, 229–237.
- Papageorgiou, G. (1987). Immobilized photosynthetic microorganisms. *Photosynthetica*, 21, 367-383.
- Parson, T., Strepheps, K., & Strickland, J. (1961). On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. *J. Fish. Res. Bd Can* , 18, 1001-16.
- Pereira, S. L., Leonard, A. E., Huang, Y. S., Chuang, L. T., & Mukerji, P. (2004). Identification of two novel microalgal enzymes involved in the conversion of the omega3-fatty acid, eicosapentaenoic acid, into docosahexaenoic acid. *The Biochemical journal*, 384, 357-366.
- Perez, R. O. (2009). *Eliminación de nutrientes para el tratamiento biológico de agua residual usando un sistema inmovilizado microalgal- bacteria en crecimiento autotrofo, heterotrofo y mixotrofico (Tesis de maestría)*. La Paz, B.C.S.

- Pfandl, K., Chatzinotas, A., Dyal, P., & Boeningk, J. (2009). SSU rRNA gene variation resolves population heterogeneity and ecophysiological differentiation within a morphospecies (Stramenopiles, Chrysophyceae). *Limnology and Oceanography*, *54*, 171–181.
- Qiang, H. (2004). Environmental Effects on Cell Composition. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, 83-93.
- Resolución 631. (diario Oficial No. 49.486 de 18 de abril de 2015). *Por la cual se establecen los parámetros y los valores límites máximos permisibles en los vertimientos puntuales a cuerpos de aguas superficiales y a los sistemas de alcantarillado público y se dictan otras disposiciones. Publicidad en la Gaceta*, . Colombia.
- Rhee, G. Y. (1978). Effects of N:P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition, and nitrate uptake. *Limnol. Oceanogr.*, *23*, 10-25.
- Rhee, G., & Gotham, I. (1980). Optimum N:P ratios and coexistence of planktonic algae. *J. Phycol.*, *16*, 486–89.
- Richmond, A., & Becker, E. W. (1986). Technological aspects of mass cultivation, a general outline.
- Roa, A., & Cañizares, R. (2012). Bioremediación de aguas con fosfatos y nitratos utilizando *Scenedesmus*. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, *10(1)*, 71-79.
- Robinson, P., Reeve, J., & Goulding, K. (1988). Kinetics of phosphorus uptake by immobilized *Chlorella*. *Biotechnol. Lett.*, *10*, 17–20.
- Robinson, P., Reeve, J., & Goulding, K. (1989). Phosphorus uptake kinetics of immobilized *Chlorella* in batch and continuous-flow culture. *Enzyme Microb. Technol.*, *11*, 590–596.
- Romero, J. A. (2000). *Tratamiento de aguas residuales. Teoría y principios de diseño*. Bogotá, Colombia: Escuela Colombiana de Ingeniería.
- Romero, M. A., & Garcia, J. A. (2010). *Selección de materiales coimmobilizantes para la producción de biomasa a escala de laboratorio (Tesis de Pregrado)*. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.
- Round, F., Crawford, R., & Mann, D. (1990). *The Diatoms – Biology and Morphology of the Genera*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Ruiz, A. (2011). *Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente (tesis de Maestría)*. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.
- Saeed, A., & Iqbal, M. (2006). Immobilization of blue green microalgae on loofa sponge to biosorb cadmium in repeated shake flask batch and continuous flow fixed bed column reactor system. *World J. Microb. Biotechnol.*, *22*, 775–782.
- Sáenz, J. E. (2012). *La fotosíntesis, concepciones, ideas alternativas y analogías. Unidad didáctica dirigida a estudiantes de los ciclos 3 y 4 de educación básica del colegio José María Carbonell (Tesis de Maestría)*. Bogotá, Colombia, Universidad Nacional.
- Safonova, E., Kvitko, K., Iankevitch, M., Surgko, L., Afti, I., & Reisser, W. (2004). Biotreatment of industrial wastewater by selected algal–bacterial consortia. *Eng. Life Sci.*, *4*, 347-353.

- Scala, S., Carels, N., Falciatore, A., Chiusano, M. L., & Bowler, C. (2002). Genome properties of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant physiology*, 129, 993-1002.
- Seki, H., & Suzuki, A. (2002). Adsorption of heavy metal ions to floc-type biosorbents. *J. Colloid Interface Sci.*(249), 295–300.
- Smestad, B., Haug, A., & Myklestad, S. (1975). Structural studies of the extracellular polysaccharide produced by the diatom *Chaetoceros curvisetus* Cleve. *Acta Chem Scand B*, 29, 337-340.
- Suarez M., C. (2010). *Tratamiento de aguas residuales en el Valle del Cauca*. Santiago de Cali.
- Tam, N., Wong, Y., & Wong, M. (2009). Novel technology in pollutant removal at source and bioremediation. *Ocean Coast. Manage.*, 7, 368–373.
- Tampion, J., & Tampion, M. (1987). *Immobilized Cells: Principles and Applications*. Cambridge University Press., pág. 257.
- Thepenier, C., Gudin, C., & Thomas, D. (1985). Immobilization of *Porphyridium cruentum* in polyurethane foams for the production of polysaccharide. *Biomass*, 7, 225–240.
- Travieso, L., Benitez, F., Weiland, P., Sanchez, E., & Dupeyron, R. D. (1996). Experiments on immobilization of microalgae for nutrient removal in wastewater treatments. *Bioresour. Technol*, 55, 181–186.
- Travieso, L., Cañizares, R., Borja, R., Benítez, F., Domínguez, A., Dupeyrón, R., & Valiente, V. (1999). Heavy metal removal by microalgae. *Bull. Environ. Contam Toxicol*, 62, 144–151.
- Trepanier, C., Parente, S., Comeau, Y., & Bouvrette, J. (2002). Phosphorus budget as a water quality management tool for closed aquatic mesocosms. *Water Res*, 36, 1007-1017.
- Ueno, R., Wada, S., & Urano, N. (2008). Repeated batch cultivation of the hydrocarbon degrading, micro-algal strain *Prototheca zopfii* RND16 immobilized in polyurethane foam. *Can. J. Microbiol.*, 54, 66-70.
- Urrutia, I., Serra, J., & Llama, M. (1995). Nitrate removal from water by *Scenedesmus obliquus* immobilized in polymeric foams. *Enzyme Microb. Technol*, 17, 200-205.
- Viveros, J. (2014). *Evaluación de las aguas residuales domésticas de la Universidad Autónoma de Occidente como medio de cultivo natural para la microalga nativa *Chlorella* sp y simultáneamente su capacidad para remover nitratos y DQO de dichas aguas (Tesis de Pregrado)*. Santiago de Cali, Cali.

ANEXOS

Anexo 1. Composición del medio de crecimiento Bold Basal (BB)

Componente	Solución Stock (g/L dH ₂ O)	Cantidad Usada (ml)	Concentración en Medio Final (M)
Macronutrientes		10	
NaNO ₃	25.00		2.94 × 10 ⁻³
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.50		1.70 × 10 ⁻⁴
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7.50		3.04 × 10 ⁻⁴
K ₂ HPO ₄	7.50		4.31 × 10 ⁻⁴
KH ₂ PO ₄	17.50		1.29 × 10 ⁻³
NaCl	2.50		4.31 × 10 ⁻⁴
Solución EDTA Alcalina		1	17.1 × 10 ⁻³
EDTA	50.00		55.3 × 10 ⁻³
KOH	31.00		
Solución de Métodos Acidificada		1	1.79 × 10 ⁻⁴
FeSO ₄ ·7H ₂ O	4.98		
H ₂ SO ₄			
Solución de Boro		1	18.5 × 10 ⁻³
H ₃ BO ₃	11.42		
Solución de Metales Traza		1	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.82		3.07 × 10 ⁻⁵
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.44		7.28 × 10 ⁻⁶
MoO ₃	0.71		4.93 × 10 ⁻⁶
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.57		6.29 × 10 ⁻⁶
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.49		1.68 × 10 ⁻⁶


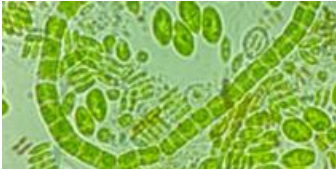
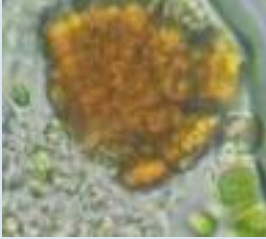


Función: Bischoff & Bold (1963)


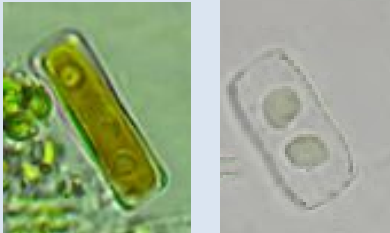
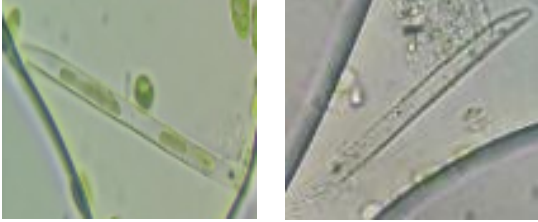

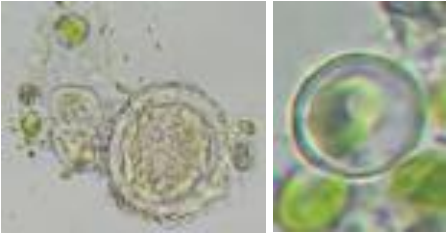
Anexo 2. Composición del medio de crecimiento Bold Basal Modificado (BBM)

Componente	Solución Stock (g/L dH ₂ O)	Cantidad Usada (ml)	Concentración en Medio Final (M)
Macronutrientes		10	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.50		1.70 × 10 ⁻⁴
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7.50		3.04 × 10 ⁻⁴
NaCl	2.50		4.31 × 10 ⁻⁴
KOH	9.63	20	1.7 × 10 ¹
Solución EDTA Alcalina		1	17.1 × 10 ⁻³
EDTA	50.00		55.3 × 10 ⁻³
KOH	31.00		
Solución de Métodos Acidificada		1	1.79 × 10 ⁻⁴
FeSO ₄ ·7H ₂ O	4.98		
H ₂ SO ₄			
Solución de Boro		1	18.5 × 10 ⁻³
H ₃ BO ₃	11.42		
Solución de Metales Traza		1	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.82		3.07 × 10 ⁻⁵
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.44		7.28 × 10 ⁻⁶
MoO ₃	0.71		4.93 × 10 ⁻⁶
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.57		6.29 × 10 ⁻⁶
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.49		1.68 × 10 ⁻⁶

Fuente: Adaptado de Bischoff & Bold (1963)






Anexo 3. Genero de microalgas: Identificación microscópica

División	Genero	Registro fotográfico
Chlorophyta	<i>Chorella</i>	
	<i>Ulothrix</i>	
	<i>Haematococcus</i>	
	<i>Scenedesmus</i>	
	<i>Oocystis</i>	

División	Genero	Registro fotográfico
Bacillariophyta	<i>Navicula</i>	
	<i>Pinnularia</i>	
	<i>Nitzschia</i>	
	<i>Stephanodiscus</i>	
	<i>Cocconeis</i>	

Fuente: Bellinger & Sigeo (2010)

Anexo 4. Progreso de la etapa de inmovilización para la selección de la material de soporte.

Tiempo Días	Medio Bold Basal Modificado				Medio Bold Basal			
	1D	1L	General	3D	4L	General		
1								
4								
7								
13								
21								

Anexo 5. Resultados de ANOVA de la concentración de biomasa en la fase de inmovilización.

Pruebas de efectos inter-sujetos

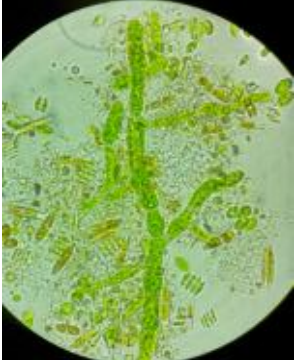
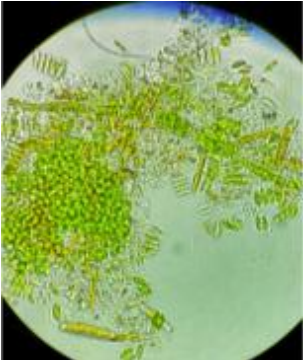
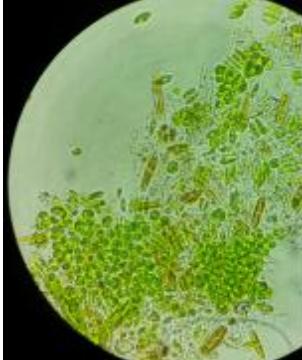

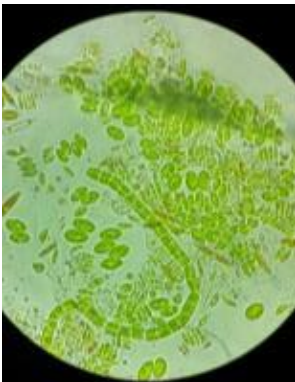
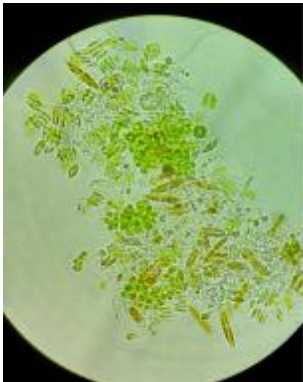

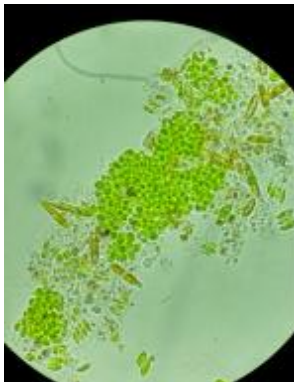
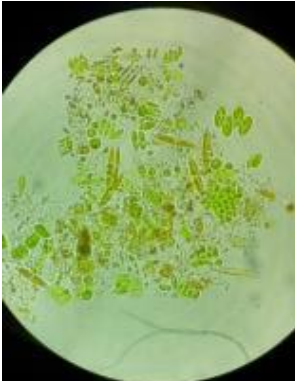
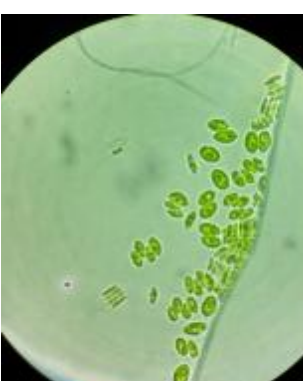
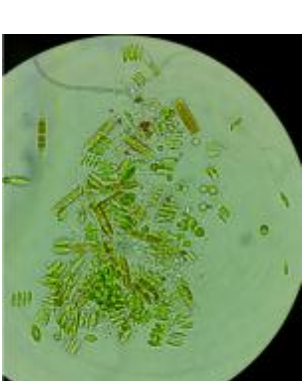

Variable dependiente: Concentración de biomasa (g/l)

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1,233E-5 ^a	3	4,112E-6	2,253	,224
Intersección	,000	1	,000	62,468	,001
Medio de cultivo	2,205E-6	1	2,205E-6	1,208	,333
Material de inmovilización	1,013E-5	1	1,013E-5	5,548	,048
Medio * Material	5,000E-9	1	5,000E-9	,003	,961
Error	7,300E-6	4	1,825E-6		
Total	,000	8			
Total corregido	1,964E-5	7			

a. R al cuadrado = ,628 (R al cuadrado ajustada = ,349)

Fuente: Autores

Anexo 6. Fotografías microscópicas de la fase de inmovilización.

Inmovilización			
Poliuretano rígido con BBM	Poliuretano rígido con BB	Polietileno de baja densidad BBM	Polietileno de baja densidad BB
			
			
			

Fuente: Autores

Anexo 7.Resultados de ANOVA de la concentración de NH₄⁺ en la fase de remoción.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Nitrógeno NH₄⁺

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	74,976 ^a	5	14,995	,315	,895
Intersección	13179,838	1	13179,838	276,564	,000
Concentración de nitrógeno-ARS	,953	2	,477	,010	,990
Medio de cultivo	2,514	1	2,514	,053	,822
Concentración de nitrógeno-ARS * Medio de cultivo	71,509	2	35,754	,750	,493
Error	571,868	12	47,656		
Total	13826,682	18			
Total corregido	646,844	17			

a. R al cuadrado = ,116 (R al cuadrado ajustada = -,252)

Fuente: Autores

Anexo 8.Resultados de ANOVA de la concentración de PO4 en la fase de remoción.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Fósforo

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	3971,887 ^a	5	794,377	2,682	,075
Intersección	17480,380	1	17480,380	59,012	,000
Medio de cultivo	2017,050	1	2017,050	6,809	,023
Concentración de nitrógeno-ARS	1700,842	2	850,421	2,871	,096
Medio de cultivo * Concentración de nitrógeno-ARS	253,995	2	126,998	,429	,661
Error	3554,631	12	296,219		
Total	25006,899	18			
Total corregido	7526,519	17			

a. R al cuadrado = ,528 (R al cuadrado ajustada = ,331)

Fuente: Autores

Anexo 9.Resultados de ANOVA de la concentración de NO₃⁻ en la fase de remoción.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Nitratos

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1215,878 ^a	5	243,176	60,472	,000
Intersección	4097,484	1	4097,484	1018,950	,000
Concentración de nitrógeno-ARS	932,291	2	466,146	115,920	,000
Medio de cultivo	39,292	1	39,292	9,771	,009
Concentración de nitrógeno-ARS * Medio de cultivo	244,295	2	122,147	30,375	,000
Error	48,255	12	4,021		
Total	5361,618	18			
Total corregido	1264,133	17			

a. R al cuadrado = ,962 (R al cuadrado ajustada = ,946)

Fuente: Autores

Anexo 10.Resultados de ANOVA de la concentración de DQO en la fase de remoción.

Pruebas de efectos inter-sujetos

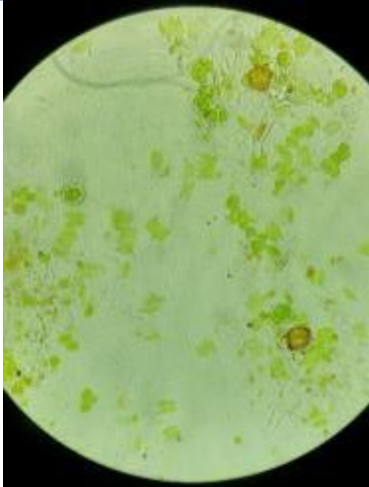
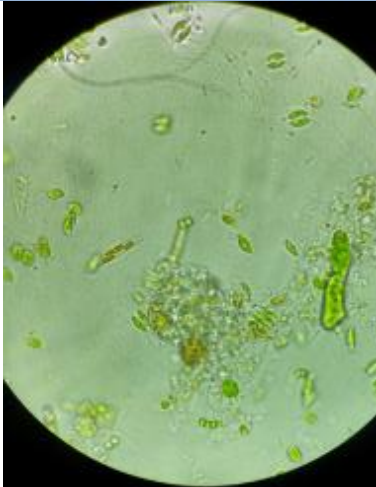
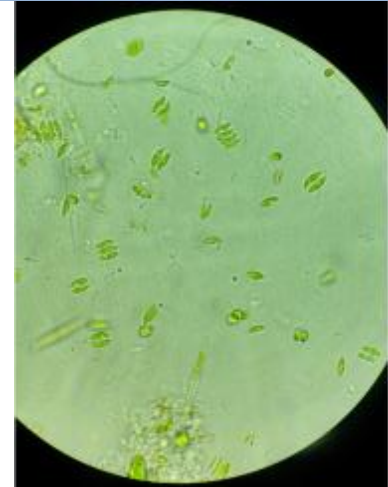
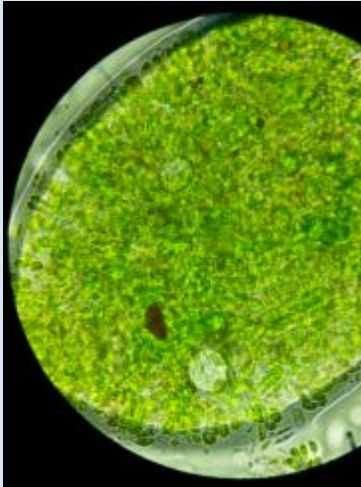
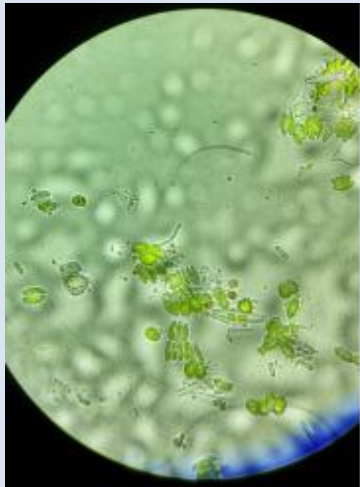
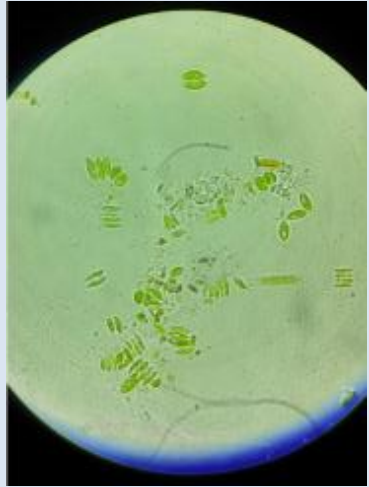
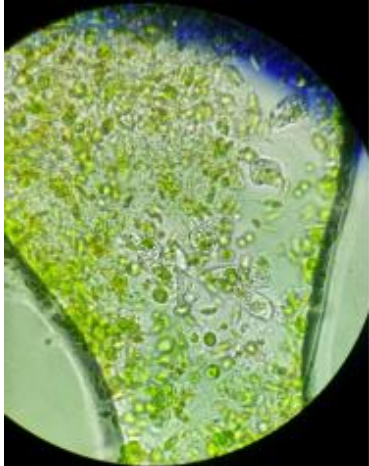
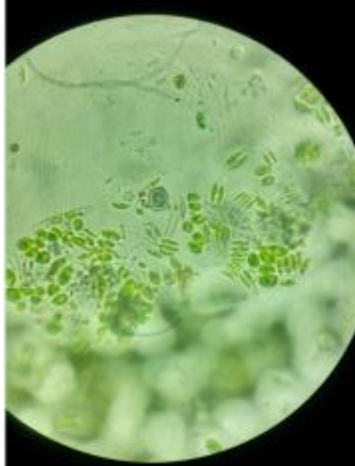
Variable dependiente: DQO

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	315,966 ^a	5	63,193	6,047	,005
Intersección	164200,983	1	164200,983	15711,890	,000
Medio de cultivo	29,544	1	29,544	2,827	,119
Concentración de nitrógeno-ARS	273,062	2	136,531	13,064	,001
Medio de cultivo * Concentración de nitrógeno-ARS	13,360	2	6,680	,639	,545
Error	125,409	12	10,451		
Total	164642,358	18			
Total corregido	441,375	17			

a. R al cuadrado = ,716 (R al cuadrado ajustada = ,597)

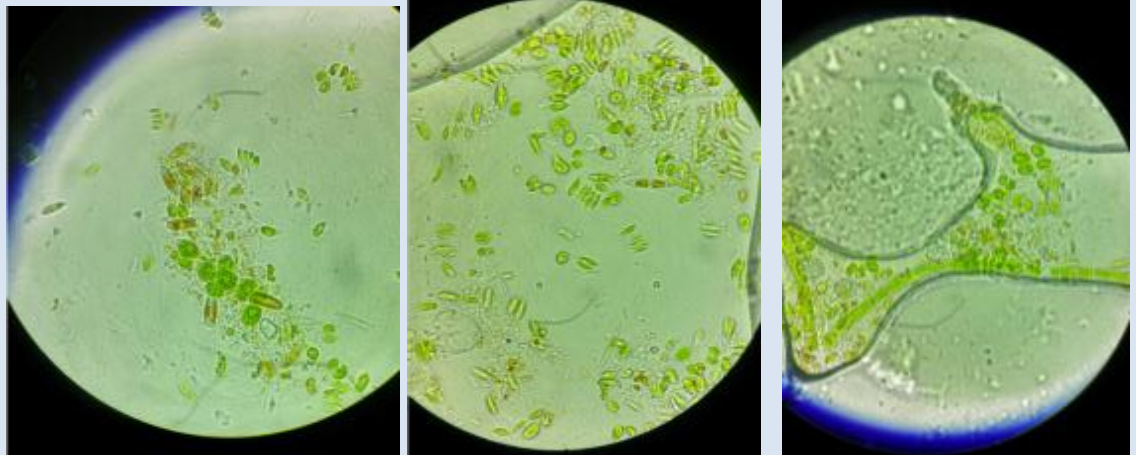
Fuente: Autores

Anexo 11. Fotografías microscópicas de la fase inicial de la inmovilización para la remoción de los nutrientes.

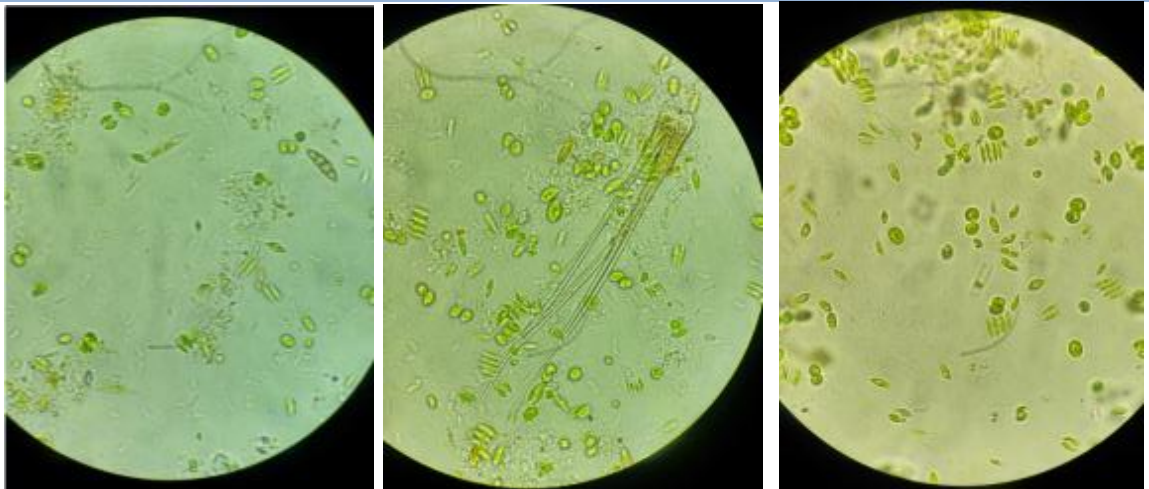
INICIO DE LA INMOVLIZACIÓN PARA LA REMOCIÓN			
Muestra	Microscopia		
ARS- 40 mg/l BB			
ARS-40 mg/l BBM			
ARS-120 mg/l BB			

INICIO DE LA INMOVLIZACIÓN PARA LA REMOCIÓN

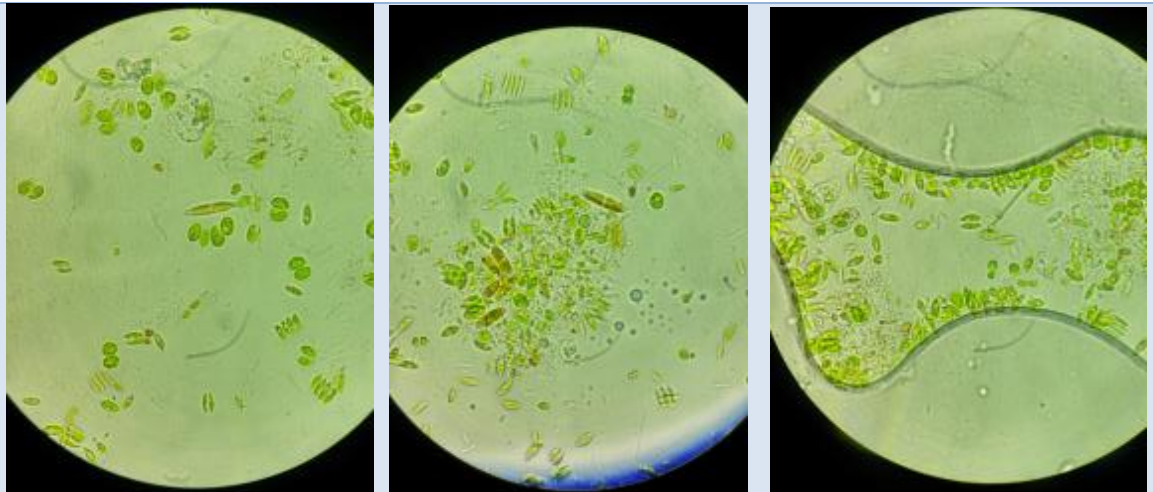
ARS-120
mg/l BBM



ARS-200
mg/l BB

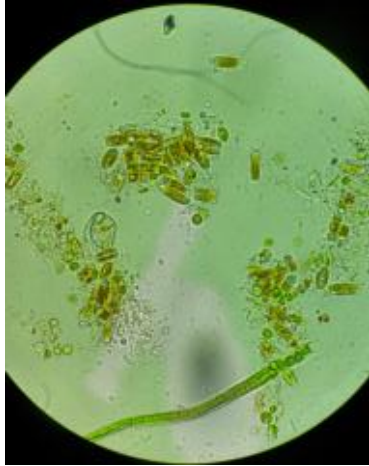
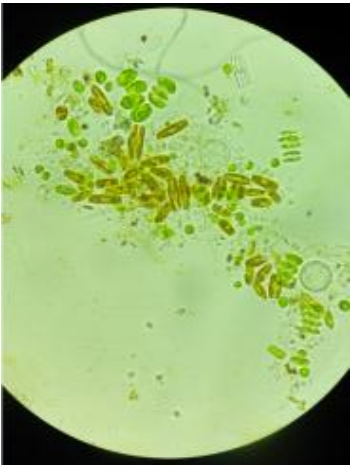
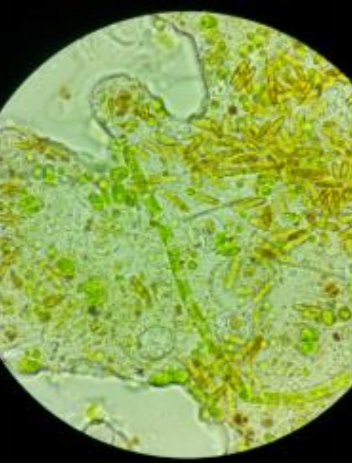
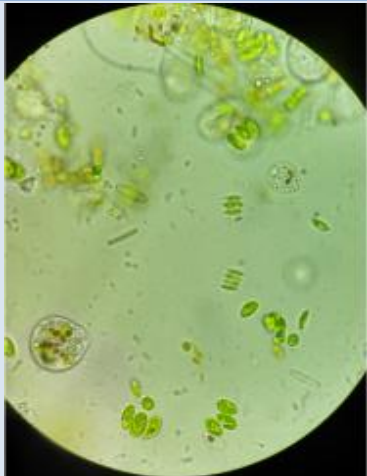
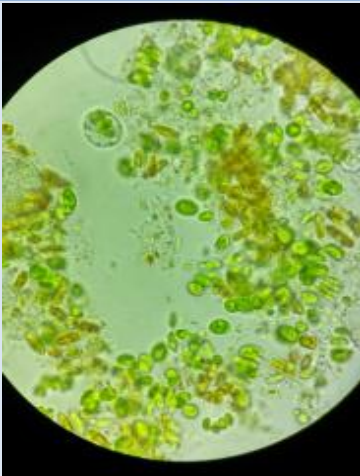
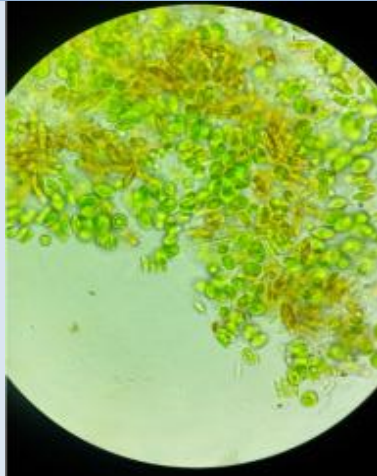
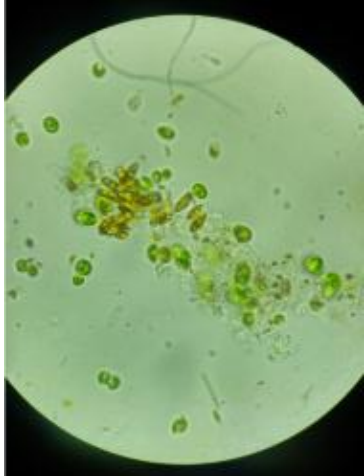
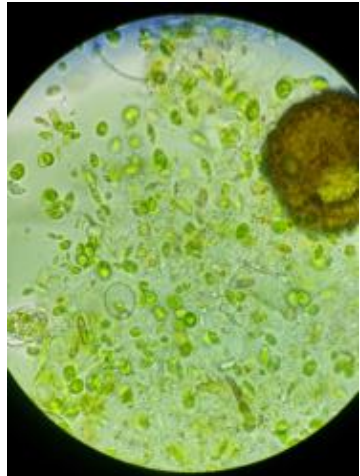
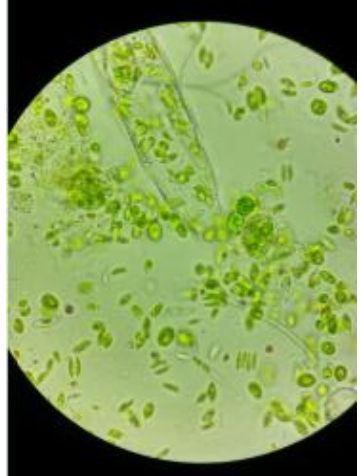


ARS-200
mg/l BBM



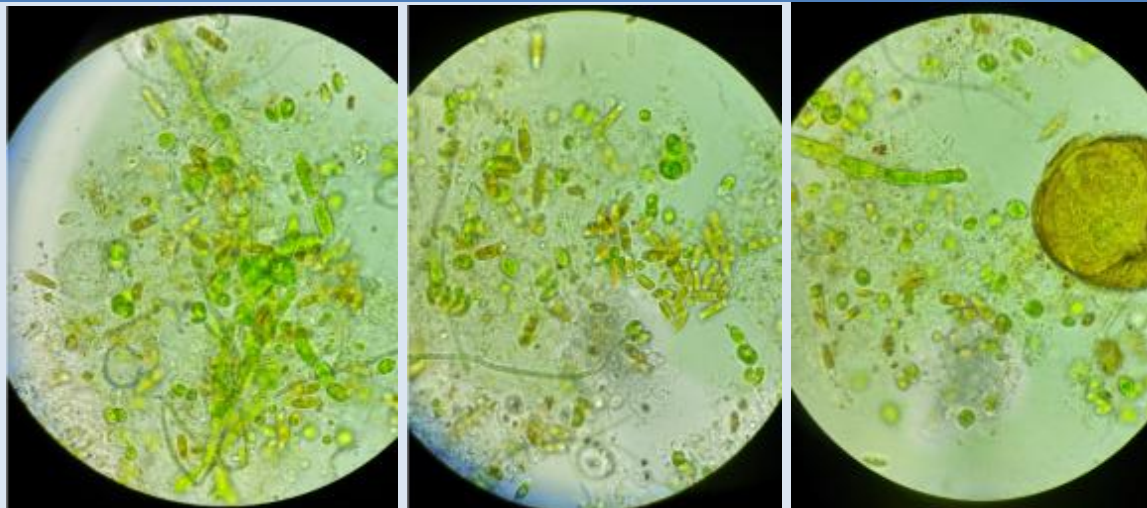
Fuente: Autores

Anexo 12. Fotografías microscópicas de la fase final de la inmovilización para la remoción de los nutrientes.

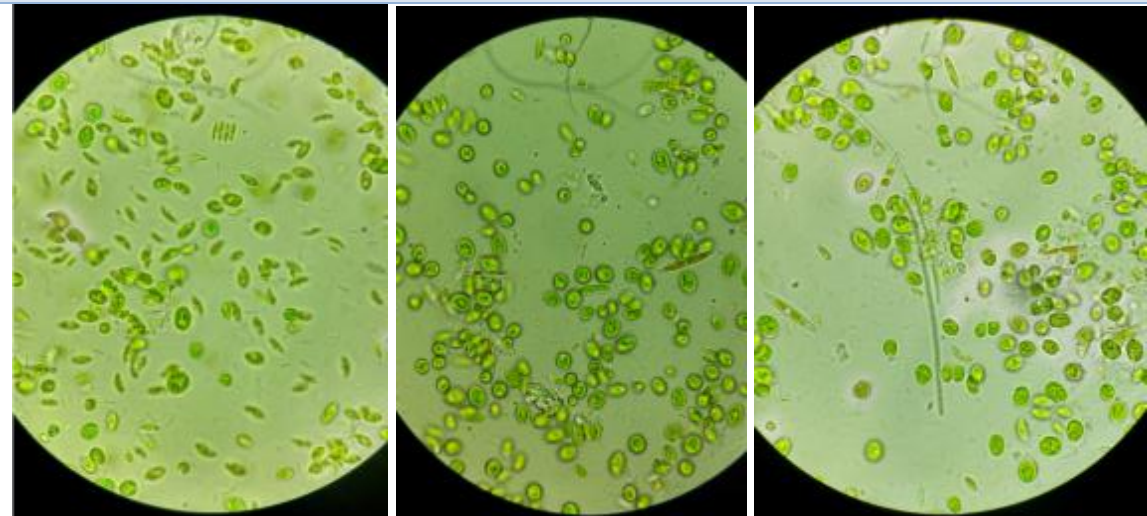
FINAL DE LA INMOVLIZACIÓN PARA LA REMOCIÓN			
Muestra	Imagen		
ARS- 40 mg/l BB			
ARS- 40 mg/l BBM			
ARS- 120 mg/l BB			

FINAL DE LA INMOVLIZACIÓN PARA LA REMOCIÓN

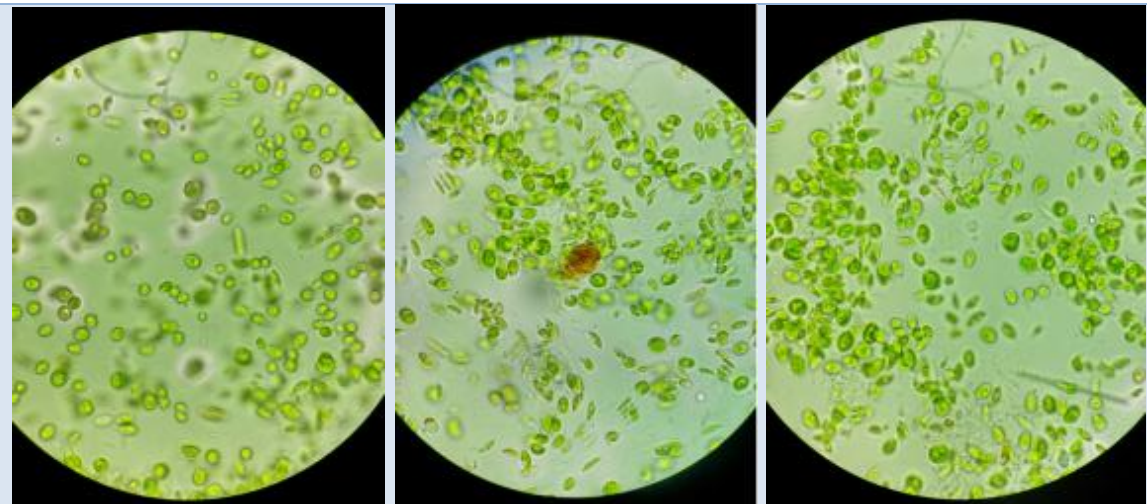
ARS- 120
mg/l BBM



ARS- 200
mg/l BB



ARS- 200
mg/l BBM



Fuente: Autores