

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE MICROALGAS Y
NUTRIENTES SOBRE LA REMOCIÓN DE NITRÓGENO, FÓSFORO Y
METABOLITOS PRODUCIDOS POR UN CULTIVO DE MICROALGAS NATIVAS

FERNANDO MARTÍNEZ ACOSTA
SEBASTIAN NAVARRETE LIZARAZO

UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
ESCUELA DE INGENIERIAS
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL
BUCARAMANGA

2016

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE MICROALGAS Y
NUTRIENTES SOBRE LA REMOCIÓN DE NITRÓGENO, FÓSFORO Y
METABOLITOS PRODUCIDOS POR UN CULTIVO DE MICROALGAS NATIVAS

FERNANDO MARTÍNEZ ACOSTA
SEBASTIÁN NAVARRETE LIZARAZO

Trabajo de grado como requisito para optar
Al título de Ingeniería Ambiental

DIRECTORA:

PhD. Alexandra Cerón Vivas

UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
ESCUELA DE INGENIERIAS
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL
BUCARAMANGA

2016

Nota de aceptación

Firma del presidente del jurado

Firma del Jurado

Firma del Jurado

Bucaramanga, 14 de marzo de 2016.

DEDICATORIA

A Dios por ser un gran pilar en mi vida y en la de mi familia, a mis padres Luis e Isabel porque sé que esta no es solo una etapa más de mi vida, sino también una de las metas que tenían planteadas para la suyas, a mi hermano para que sepa que con algo de esfuerzo y dedicación podemos cumplir nuestras metas, a Carolina por permitirme culminar esta nueva etapa junto a ella.

Fernando Martínez Acosta

Dedicada a mis padres, pilares fundamentales de mi vida, sin ellos, jamás hubiese podido conseguir lo que hasta ahora he conseguido, su tenacidad, entrega y lucha insaciable han hecho que sean el gran ejemplo a seguir y destacar.

Sebastián Navarrete Lizarazo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por toda la ayuda que me dio durante toda mi carrera, por la bendición de poder estudiar. A mis padres Luis A. Martínez e Isabel Acosta, quienes me han apoyado todo el tiempo sin importar las circunstancias, por todo el amor y paciencia que tienen durante el tiempo que duraron mis estudios. A mi hermano Marvin A. Martínez por ser mi compañero de vida.

A Carolina Pinto por ser esa persona especial que me ha dado mucha felicidad durante los últimos 4 años, por la oportunidad que me da de ser parte de su vida, por el apoyo y consejos que me ha dado. A Don Fernando, Doña Maruja y Doña Doris, por acogerme en su familia y ayudarme en todo lo que han podido.

A mi tía Lucila Acosta por abrirme las puertas de su hogar al comenzar mis estudios y a mi tía María del Carmen por su ayuda y los consejos que me brindo.

A Sebastián Navarrete por permitirme ser su compañero en este proyecto y por ser un excelente amigo y a la ingeniera Alexandra Cerón por darnos la oportunidad de ser parte de esta investigación y ser nuestra directora de tesis.

Al personal de Laboratorio, Ingeniero Diego Blanco, Jonathan Duitama, Alcides y Naydu, por el apoyo y la ayuda prestada durante todo el proceso de pruebas.

Por ultimo a todos mis compañeros Carla Pinto, Jennifer Chávez, Samuel Monclou, María Angélica, Lorraine Alvear, Paola Acosta y Andrea Paba, por ser parte de mí segunda familia durante los últimos 5 años. A todos los profesores con quienes tuve el honor y placer de ver clase, gracias por ayudarme durante el transcurso de sus materias.

Fernando Martínez Acosta

AGRADECIMIENTOS

La vida es hermosa, y una de las principales características de esta hermosura es que la podemos compartir y disfrutar con quienes amamos, podemos ayudar y guiar a muchas personas si ellas lo permiten, pero también podemos ser ayudados y guiados durante nuestra vida; por este motivo quiero agradecer en primera instancia a Dios por permitirme tener y disfrutar a mi familia, gracias a mi familia por apoyarme en cada decisión y proyecto, no ha sido sencillo el camino hasta ahora, pero gracias a sus aportes, a su amor, a su inmensa bondad y apoyo, lo complicado de lograr esta meta se ha notado menos. Les agradezco, y hago presente mi gran afecto hacia ustedes, mi hermosa familia.

Gracias a mi Universidad por haberme permitido formarme y en ella, gracias a todas las personas que fueron participes de este proceso ya sea de manera directa o indirecta, de manera muy especial agradezco a mi directora de proyecto, Alexandra Cerón Vivas por guiarnos durante todo el proceso de realización del proyecto, gracias a todos ustedes, fueron ustedes los responsables de realizar su pequeño aporte, que el día de hoy se vería reflejado en la culminación de mi paso por la universidad.

Agradezco a mis amigos de carrera, ustedes son mi mano derecha, parte de mi familia, los considero hermanos. Han estado ahí presentes siempre y mucho más cuando les he necesitado. Quiero agradecer de manera muy especial a mi compañero de proyecto y amigo Fernando Martínez Acosta por haber sido parte de este proyecto, por su compromiso en la realización, pero sobre todo por su valiosa amistad durante todos estos años.

Finalmente agradezco a quien lee este apartado y más de mi proyecto de grado, por permitir a mis experiencias, investigaciones y conocimiento, incurrir dentro de su repertorio de información mental.

Sebastián Navarrete Lizarazo

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	16
1. OBJETIVOS	17
1.1 OBJETIVO GENERAL	17
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
2. JUSTIFICACIÓN	18
3. MARCO TEORICO	19
3.1 ANTECEDENTES	19
3.2 MICROALGAS	20
3.3 FOTOSÍNTESIS.....	24
3.3.1 Absorción de la luz	25
3.3.1.1 Pigmentos fotosintéticos	25
3.3.2 Reducción y fijación de CO ₂	25
3.3.3 Cloroplastos.....	26
3.4 PARAMETROS DE INFLUENCIA EN UN SISTEMA DE CULTIVO.....	26
3.4.1 pH.....	26
3.4.2 Temperatura	27
3.4.3 Luz.....	27
3.4.4 Nutrientes	28
3.5 METABOLITOS DE VALOR AGREGADO	29
3.6 TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL CON EL USO DE MICROALGAS	
32	

3.7	EFLUENTES ANAEROBIOS	34
3.8	FOTOBIOREACTORES.....	36
3.8.1	Tipos de fotobiorreactores	36
3.8.1.1	Fotobiorreactores de placa plana.....	36
3.8.1.2	Fotobiorreactores tubulares de columna inclinada.....	37
3.8.1.3	Fotobiorreactor tubular horizontal	38
4.	METODOLOGÍA	40
4.1	OBTENCIÓN Y PRESERVACIÓN DE LAS MICROALGAS.....	40
4.2	DESCRIPCION DEL DISEÑO EXPERIMENTAL	41
4.3	MONTAJE EXPERIMENTAL A ESCALA LABORATORIO	42
4.4	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	44
4.4.1	Parámetros de control	44
4.4.2	Parámetros de seguimiento	44
4.4.2.1	Peso seco	44
4.4.2.2	Preparación de la muestra	45
4.4.2.3	Nitrógeno.....	45
4.4.2.4	Nitratos.....	46
4.4.2.5	Ortofosfatos.....	46
4.4.2.6	Carbohidratos.....	46
4.4.2.7	Proteínas.....	47
4.4.2.8	Lípidos.....	47
4.4.2.9	Clorofila.....	48
5.	RESULTADOS y DISCUSIÓN	49
5.1	CURVA DE CORRELACIÓN PARA LA BIOMASA	49

5.2	PARÁMETROS DE CONTROL.....	50
5.3	INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE BIOMASA	50
5.3.1	Crecimiento de microalgas	50
5.3.2	Remoción de nitrógeno.....	52
5.3.3	Remoción de ortofosfatos PO ₄ -P	56
5.4	INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE NUTRIENTES.....	58
5.4.1	Crecimiento de microalgas	58
5.4.2	Remoción de nitrógeno.....	59
5.4.3	Remoción de ortofosfatos	62
5.5	PRODUCCIÓN DE METABOLITOS DE VALOR AGREGADO.....	65
5.5.1	Producción de Carbohidratos	65
5.5.2	Producción de Proteínas	67
5.5.3	Producción de Lípidos	69
5.5.4	Producción de Clorofila a y b.....	71
6.	CONCLUSIONES	74
7.	RECOMENDACIONES	76
	BIBLIOGRAFÍA	77
	ANEXOS	90

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Concentración de CO ₂ asimilable por diversas especies de microalgas .	28
Tabla 2. Contenido de proteínas y carbohidratos para diferentes especies de microalgas.....	30
Tabla 3.Contenido de lípidos en distintas microalgas	30
Tabla 4. Microalgas empleadas en el tratamiento de aguas residuales	33
Tabla 5. Sistemas de tratamiento anaerobios	34
Tabla 6. Bold Basal Medium.....	40
Tabla 7. Tasa de crecimiento del cultivo a diferentes concentraciones iniciales de biomasa.....	51
Tabla 8. Remoción de NH ₄ ⁺ según la concentración inicial de biomasa	52
Tabla 9. Porcentaje de Remoción de ortofosfatos según la concentración inicial de biomasa.....	56
Tabla 10. Remoción de NH ₄ ⁺ de acuerdo a la concentración inicial de nutrientes	59
Tabla 11. Remoción de ortofosfatos según la concentración inicial de nutrientes	63

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. <i>Chlorella vulgaris</i>	22
Figura 2. División celular de la <i>Chlorella</i>	22
Figura 3. Bacillariophyceae	23
Figura 4. <i>Ulothrix sp</i>	24
Figura 5. Fotobiorreactor de placa plana.....	37
Figura 6. Fotobiorreactores de columna inclinada.....	38
Figura 7. Fotobiorreactor tubular	39
Figura 8. Microalgas identificadas. A: <i>Bacillariophyceae</i> , B: <i>Ulothrix sp.</i> , C: <i>Chlorella vulgaris</i>	41
Figura 9. Montaje en Funcionamiento	43
Figura 10. Curva correlación entre la concentración de biomasa y la absorbancia	49
Figura 12. Crecimiento de la microalgas a diferentes concentraciones iniciales de biomasa.....	51
Figura 13. Perfil de la concentración de NH_4^+ según la biomasa	54
Figura 14. Perfil de la concentración de nitratos según la biomasa	54
Figura 15. Perfil de concentración del P- PO_4 a diferentes concentraciones de biomasa.....	57
Figura 16. Perfil de la biomasa de acuerdo a la concentración inicial de nutrientes	59
Figura 17. Perfil del NH_4^+ teniendo en cuenta la concentración inicial de nutrientes	61
Figura 18. Concentración de nitratos a diferentes concentraciones iniciales de nutrientes.....	61
Figura 19. Perfil de concentración de ortofosfatos a diferentes concentraciones iniciales de nutrientes.....	63

Figura 20. Perfil de carbohidratos a diferentes concentraciones iniciales de biomasa.....	65
Figura 21. Perfil del carbohidrato a diferentes concentraciones iniciales de nutrientes.....	66
Figura 22. Perfil de las proteínas a diferentes concentraciones iniciales de biomasa	68
Figura 23. Perfil de las proteínas a diferentes concentraciones iniciales de nutrientes.....	68
Figura 24. Perfil del lípido a diferentes concentraciones iniciales de biomasa	70
Figura 25. Perfil de lípidos a diferentes concentraciones iniciales de nutrientes...	71
Figura 26. Perfil de clorofila a para diferentes concentraciones iniciales de biomasa	72
Figura 27. Perfil de clorofila b a diferentes concentraciones iniciales de biomasa	72

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexos A. Resultado ANOVA para concentración biomasa a través de los días..	90
Anexos B. Resultados ANOVA de la concentración de nitrógeno a través de los días	91
Anexos C. Resultados ANOVA de la concentración de ortofosfatos a través de los días	92
Anexos D. Resultados ANOVA de la concentración de nitratos a través de los días	93
Anexos E. Resultados ANOVA de la concentración de proteínas a través de los días	94
Anexos F. Parámetros de control	95

RESUMEN GENERAL DE TRABAJO DE GRADO

TITULO: INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE MICROALGAS Y NUTRIENTES SOBRE LA REMOCIÓN DE NITRÓGENO, FÓSFORO Y METABOLITOS PRODUCIDOS POR UN CULTIVO DE MICROALGAS NATIVAS

AUTOR(ES): FERNANDO MARTÍNEZ ACOSTA
SEBASTIAN NAVARRETE LIZARAZO

FACULTAD: Facultad de Ingeniería Ambiental

DIRECTOR(A): ALEXANDRA CERÓN VIVAS

RESUMEN

La presencia de altas concentraciones de nutrientes en fuentes hídricas a causa de actividades antrópicas, genera impactos que afectan la estabilidad de los ecosistemas. Estas afectaciones también actúan en la salud humana, por lo que es importante la mitigación o eliminación de dichos nutrientes. El objetivo de este estudio fue evaluar la influencia de la concentración inicial de microalgas y nutrientes sobre los metabolitos producidos, el crecimiento de la biomasa algal y la remoción de nitrógeno y ortofosfatos. En el estudio se utilizó un cultivo de microalgas nativas de la planta tratamiento de aguas residuales de la Universidad Pontificia Bolivariana Seccional Bucaramanga. Se realizó un diseño factorial 32, cuyos factores fueron la concentración inicial de nutrientes y de biomasa. Los valores utilizados para la concentración inicial de nutrientes fueron: 89,0 mg/L, 58,6 mg/L y 83,3 mg/L de ortofosfatos y para la biomasa: 50 mg/L, 200 mg/L y 300 mg/L en peso seco. El crecimiento del cultivo de microalgas se comportó de manera lineal, mostrando un mayor crecimiento en la concentración de 50 mg/L de biomasa y de 89,0 mg/L de ortofosfatos. De igual manera, el estudio reportó valores de remoción de nitrógeno de $83,3 \pm 10,2\%$ de NH_4^+ y de ortofosfatos de $62,2 \pm 6,4\%$ de P-PO_4 , las máximas remociones se presentaron en las concentraciones iniciales de 300 mg/L y 50 mg/L de biomasa. Las remociones de nitrógeno y ortofosfatos, teniendo en cuenta la concentración inicial de nutrientes, fueron $87,3 \pm 5,6\%$ de NH_4^+ y $59,9 \pm 19\%$ de P-PO_4 respectivamente, siendo mejor la remoción en las concentraciones iniciales de 89,0 mg/L y 83,3 mg/L de nutrientes.

PALABRAS CLAVES:

Tratamiento de agua residual, microalgas, nutrientes, metabolitos.

V° B° DIRECTOR DE TRABAJO DE GRADO

GENERAL SUMMARY OF WORK OF GRADE

TITLE: INFLUENCE OF INCIPIENT CONCENTRATION OF MICROALGAE AND NUTRIENTS OVER NITROGEN, PHOSPHORUS AND METABOLITES REMOTION PRODUCED BY A NATIVE MICROALGAE CULTIVATION

AUTHOR(S): FERNANDO MARTÍNEZ ACOSTA
SEBASTIAN NAVARRETE LIZARAZO

FACULTY: Facultad de Ingeniería Ambiental

DIRECTOR: ALEXANDRA CERÓN VIVAS

ABSTRACT

The presence of high concentrations of nutrients in water sources due to human activities, generates impacts that affect the stability of ecosystems. These effects also act on human health, so it is important mitigation or elimination of these nutrients. The main objective of this study was to evaluate the influence of initial concentration of microalgae and nutrients on produced metabolites, algal biomass growth and nitrogen and orthophosphates removal. In this study, a native microalgae culture from wastewater treatment plant at Universidad Pontificia Bolivariana Seccional Bucaramanga, was used. A factorial design 32 was used, whose factors were initial concentration of nutrients and biomass. The used values for initial concentration of nutrients were: 89, 0 mg/L, 58, 6 mg/L y 83, 3 mg/L orthophosphates and for biomass: 50 mg/L, 200 mg/L y 300 mg/L dry weight. The microalgae growth had a lineal behavior showing further growth for the biomass concentration of 50 mg/L and orthophosphates concentration of 89, 0 mg/L. Similarly the study reported nitrogen removal of $83, 3 \pm 10, 2\%$ de NH_4^+ and orthophosphates of $62,2 \pm 6,4\%$ P- PO_4 , maxim removal were obtained with the initial concentrations of 300 mg/L and 50 mg/L biomass. Nitrogen and orthophosphates removal, taking in account the initial concentration of nutrients, were $87,3 \pm 5,6\%$ to NH_4^+ and $59, 9 \pm 19\%$ to P- PO_4 , respectively, being better the removal to initial concentrations of nutrients de 89,0 mg/L and 83,3 mg/L.

KEYWORDS:

Metabolites, microalgae, nutrients, waste water treatment.

V° B° DIRECTOR OF GRADUATE WORK

INTRODUCCIÓN

La presencia de altas concentraciones de nutrientes en fuentes hídricas a causa de actividades antrópicas, genera impactos que afectan la estabilidad de los ecosistemas. Estas afectaciones también actúan en la salud humana, por lo que es importante la mitigación o eliminación de dichos nutrientes.

En la naturaleza existen microorganismos que cuentan con la capacidad de captar nutrientes, las microalgas son organismos fotosintéticos que se han destacado por sus capacidades de remoción de nutrientes como el nitrógeno y el fósforo, además cuentan con la ventaja de crecer en medios contaminados, alta tasa de crecimiento y con la capacidad de realizar sus procesos metabólicos con una fuente de energía natural o artificial.

En los últimos años, la Universidad Pontificia Bolivariana ha aumentado su planta física al igual que el número de personas que ingresan a ella, provocando un aumento en la generación de las aguas residuales que llegan a su planta de tratamiento. La planta de tratamiento cuenta con un sistema de tratamiento terciario que busca la remoción de nutrientes con ayuda del buchón de agua, pero este presenta poca eficiencia. Por lo anterior, es importante evaluar la capacidad de las microalgas para la eliminación de nutrientes presentes en las aguas residuales.

Este trabajo se centra en el uso de un cultivo de microalgas nativas de la planta de tratamiento de la Universidad Pontificia Bolivariana Seccional Bucaramanga, para evaluar su eficiencia en la remoción de nutrientes presentes en el efluente anaerobio y la producción de metabolitos de valor agregados.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la influencia de la concentración inicial de microalgas y nutrientes sobre la remoción de nitrógeno, fósforo y metabolitos producidos por un cultivo de microalgas nativas de la planta tratamiento UPB.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar la influencia de la concentración inicial de microalgas sobre su crecimiento y remoción de nitrógeno y fósforo de un efluente anaerobio.
- ✓ Establecer la influencia de la concentración inicial de nutrientes en un efluente anaerobio sobre el crecimiento de una cepa de microalgas nativas y la remoción de nitrógeno y fósforo.
- ✓ Evaluar los metabolitos de valor agregado producidos por las microalgas.

2. JUSTIFICACIÓN

La presencia de compuestos nitrogenados en los cuerpos de agua genera un impacto negativo en los acuíferos debido a que comprometen la calidad del efluente, no solo en el punto de vertimiento, sino también aguas abajo, es decir, en toda la cuenca hidrográfica. Además de ello se generan otros problemas ambientales como son el aumento de acidez, la eutrofización y el aumento en la toxicidad tanto en aguas superficiales como subterráneas.

Existen microorganismos que se encargan de captar nutrientes como el nitrógeno y fósforo, entre los que se destacan las microalgas, la ventaja de trabajar con ellas es su capacidad de crecimiento en aguas contaminadas y el bajo costo energético que presentan en su proceso metabólico.

Por tal razón es importante realizar estudios, utilizando microalgas, donde se evalúen su capacidad para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con nutrientes.

3. MARCO TEORICO

3.1 ANTECEDENTES

El empleo de las microalgas para el tratamiento de aguas residuales ha sido estudiado desde los años 40 por Caldwell (1940), quien plateaba el uso de microalgas como purificadores del agua residual. Por otro lado, Oswald et al. (1852), propusieron el tratamiento de aguas residuales con el uso de microalgas a nivel industrial. Posteriormente, en Estados Unidos, Cerniglia et al., (1979) examinaron dieciocho cultivos de microalgas para determinar su capacidad de metabolizar naftaleno en condiciones fotoautótroficas.

Vargas et al.(1987) estudiaron el efecto que ejercen las microalgas que predominan en la laguna facultativa de la planta de tratamiento de Maracaibo, en la remoción de nitrógeno presente en dicha laguna. Conforme avanzaban las décadas, nuevas especies de microalgas comenzaron a ser utilizadas en la remoción de nutrientes y la degradación de hidrocarburos (Rawat, et al. 2011).

Las microalgas son empleadas hoy en día en diversas poblaciones en el mundo para el tratamiento de aguas residuales. El uso de las microalgas en los sistemas de tratamiento de aguas residuales brinda una posibilidad real para la eliminación de nutrientes, siendo más eficiente que otros tratamientos convencionales (Hoffman, 1998). Jeanfils & Thomas (1986) evaluaron el efecto de la concentración de amoníaco en el crecimiento y fisiología de las *Chlorella vulgaris*, donde evidenciaron el crecimiento de las algas y a su vez la disminución de la concentración de nitrógeno, e indicaron que la eliminación de nitrógeno se debió a la absorción de las algas.

En el presente, han llevado a cabo diversos estudios a nivel mundial que tienen como objetivo la evaluación de la eficacia en remoción de nutrientes del agua residual con la utilización de microalgas (Choi & Lee, 2012; Luna, Álvarez, & Rivero, 2011; Serrano, 2015). Beuckels et al., (2015) estudiaron la influencia de la

disponibilidad de nitrógeno en la eliminación de fósforo en el tratamiento de aguas residuales con el uso de microalgas.

En Colombia se han realizado investigaciones a escala de laboratorio en universidades por todo el país. En la Universidad de Pamplona se efectuó el estudio de la remoción de nitratos y fosfatos con ayuda de la *Scenedesmus incrassatulus* como una nueva alternativa de tratamiento, mostrando resultados en un agua residual doméstica (Parra & Villanueva, 2012). Por otra parte, se realizó un estudio de eliminación de amonio y fosfatos en muestras de aguas residuales procedente de Puerto Colombia, utilizando una cepa inmovilizada de *Chlorella sp*, con la cual se obtuvieron remociones de 68% de amonio y 65% de fosfatos, a las 32 horas de iniciado el experimento (Infante et al., 2013). En Bucaramanga, en la Universidad Pontificia Bolivariana, se realizó un estudio en el cual se evaluó la eficiencia de remoción de nutrientes de un efluente anaerobio mediante una cepa de *Chlorella vulgaris*, con el cual se obtuvieron remociones de nitrógeno mayores al 70% y de 33% para ortofosfatos (Serrano, 2015).

3.2 MICROALGAS

Las algas pueden categorizarse según su tamaño en macroalgas y microalgas, las microalgas son microorganismos unicelulares que forman parte de los organismos más antiguos del planeta y cuentan con la capacidad de llevar a cabo la fotosíntesis. Generalmente son organismos fotoautótrofos, que obtienen su energía de la luz que proviene del sol y usan la materia inorgánica para su desarrollo. Algunas especies son capaces de utilizar la materia orgánica como fuente de energía y de carbono (Pérez, 2010). Las microalgas se encuentran en diversos ambientes, tales como aguas dulces, marinas, salobres o residuales (Garibay-Hernández, 2009) y a diferencia de las macroalgas tienen una gran velocidad de reproducción (D'Andrea, 2006).

En la actualidad se conoce que existen más de 40.000 especies, de las cuales en su mayoría se desconoce su composición bioquímica y metabolismo. Las especies

más estudiadas son las correspondientes a algas verdes y diatomeas (Arredondo et. al, 1991).

Las microalgas se dividen según su producción de la siguiente manera:

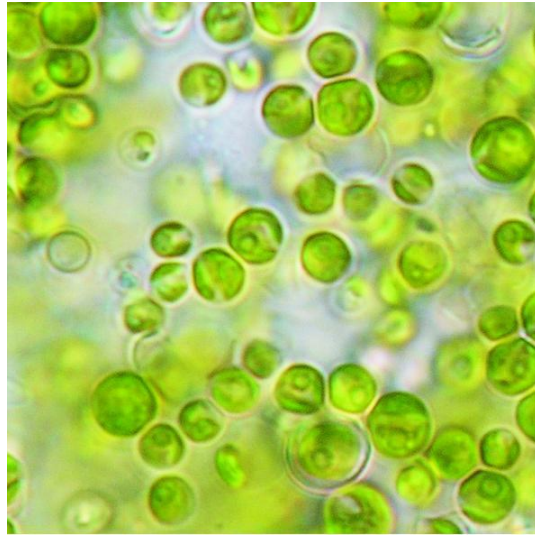
- ✓ **Fotoautótrofas:** las algas obtienen la energía del sol y el carbono de los compuestos inorgánicos.
- ✓ **Fotoheterótrofas:** las algas obtienen la energía del sol y emplean compuestos orgánicos como fuente de carbono.
- ✓ **Mixotróficas:** muchas algas son capaces de crecer bajo procesos tanto autótrofos como heterótrofos, por lo que su fuente de energía puede ser la luz o la materia orgánica y la fuente de carbón de los compuestos orgánicos y del CO₂.
- ✓ **Heterótrofas:** hay algas que pueden desarrollarse en ausencia de luz, obteniendo su energía de compuestos orgánicos.

La composición de las microalgas puede ser manipulada mediante varios parámetros durante el cultivo, además de la especie a la que pertenezcan (MALGAS, 2013). Las microalgas dependen de parámetros como la intensidad de la luz, CO₂, pH, temperatura, y la concentración de nutrientes (Leal et al., 2013). Las especies de microalgas usadas para biorremediación deben tener alta tasa de crecimiento, alta tolerancia a la variación estacional y diurna en caso de sistemas abiertos; buena capacidad para formar agregados (Park et. al, 2011).

Entre los géneros de microalgas usadas en biorremediación de fuentes hídricas se encuentran *Chlorella*, *Bacillariophyceae* o *Diatomeas* y *Ulothrix sp.*

La *Chlorella* es un género de algas verdes unicelulares que viven en aguas dulces, existiendo aproximadamente 30 especies de estas. Tienen forma esférica como se muestra en la Figura 1, con tamaño entre los 2 a 10 µm de diámetro y forman aproximadamente el 90% del plancton de agua dulce (Moronta et. al, 2006).

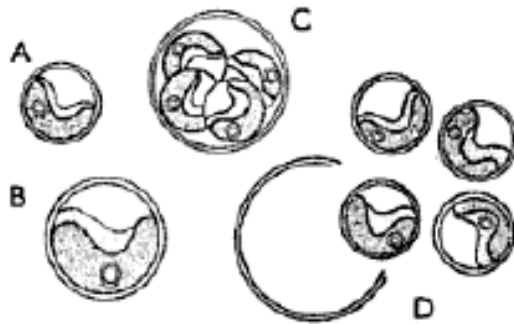
Figura 1. *Chlorella vulgaris*



Fuente: Harmonic Art 2013.

Las microalgas del género *Chlorella* son muy fáciles de cultivar, debido a que su multiplicación es continua, generando una proliferación multitudinaria. Sus células contienen un plasto parietal voluminoso provisto de un pirenoide. La célula madre puede dividirse en 4 o en 8, formando así el mismo número de células hijas idénticas a ella, como se muestra en la Figura 2.

Figura 2. División celular de la *Chlorella*



Fuente: Des Abbayes, 1989.

Este tipo de reproducción asexual es el único conocido en esta alga, lo que permite un aumento rápido de la población de microalgas cuando se encuentran en un medio con las condiciones necesarias y favorables (Des Abbayes et al., 1989).

Las *diatomeas* (ver figura 3) son muy abundantes en casi todos los hábitats acuáticos, son morfológicamente sencillas, sin flagelos, unicelulares o en forma de pequeñas agrupaciones (Cubas, 2008). Son probablemente los eucariotas más abundantes en los medios acuáticos, se caracterizan por la presencia de una pared celular compuesta por sílice. Según Round et al. (1990), entre sus pigmentos fotosintéticos destacan la clorofila a y c; y la fucoxantina (Ruiz, 2011).

Pueden formar una capsula de dos piezas (epiteca e hipoteca) denominada frústulo, cuyas formas y ornamentaciones son características para su identificación taxonómica. Se multiplican por bipartición, dentro del frústulo el protoplasto se divide en un plano paralelo a las caras de las valvas. Las *Bacillariophyceae* son importantes indicadores de la calidad de agua.

Figura 3. Bacillariophyceae



Fuente: Bellin, (2011).

Ulothrix (ver figura 4) hacen parte de las microalgas de orden Ulotrichales, son organismos filamentosos no ramificados, con plastidios en forma de copa, comunes en aguas dulces. Los sistemas de reproducción son muy variados y

aunque puede darse la reproducción sexual, es más frecuente la asexual. Cualquier fragmento del filamento puede crecer y desarrollarse completamente (Wysor, 2009).

Figura 4. *Ulothrix* sp

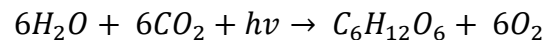


Fuente: Tormo (2015)

3.3 FOTOSÍNTESIS

La fotosíntesis es el método por el cual la energía entra a la biosfera,; se ve afectada por diferentes factores ambientales como la intensidad y calidad de la luz, humedad del aire, temperatura, disposición de agua, nutrientes y dióxido de carbono. La fotosíntesis incluye reacciones de óxido-reducción. Durante el proceso de la fotosíntesis, las microalgas usan la energía proveniente del sol para generar un oxidante capaz de extraer el oxígeno del agua, al igual que electrones y protones, mientras que se reduce el dióxido de carbono para así formar carbohidratos (Salisbury & Ross, 1994).

La estequiometría de la reacción de la fotosíntesis es la siguiente:



Los electrones extraídos del agua reducen, en la fase luminosa de la fotosíntesis, el NADP⁺ a NADPH. El NADP⁺ es una coenzima que interviene en numerosas vías anabólicas, mientras que la NADPH es su forma reducida que interviene en la fase oscura de la fotosíntesis donde se reduce el CO₂.

3.3.1 Absorción de la luz

Las reacciones lumínicas se llevan a cabo gracias a los pigmentos, los cuales absorben y transfieren la energía hacia el centro de reacción. Estos centros de reacción están constituidos por un tipo particular de moléculas de clorofila que ejecutan la reacción fotoquímica (Melgarejo, 2010).

El proceso de fotosíntesis funciona gracias a dos fotosistemas, en el fotosistema I se reduce el aceptor terminal, donando un electrón a la ferredoxina para reducir el NADP que se utiliza al transformar el CO₂ a carbohidratos, este fotosistema puede trabajar de manera independiente. En el fotosistema II el agua se usa como donador de electrones liberando oxígeno como producto (Melgarejo, 2010).

3.3.1.1 Pigmentos fotosintéticos

Los pigmentos se encuentran en las membranas tilacoides, en los sacos llamados lamelas. Estos son los encargados de absorber la luz, a determinadas longitudes de onda (Azcon & Talon, 1993). Los pigmentos encargados de la absorción de la luz son:

- **Clorofila:** es la encargada de transformar la energía lumínica en energía química. Absorbiendo las ondas que se encuentran en la región del rojo (650-700nm) y azul (400-500nm).
- **Carotenoides:** absorben en la región del azul (400-500nm) y se encuentran principalmente en bacterias purpuras.
- **Ficobilinas:** Absorben en la región anaranjada del espectro (600-650nm). Se encuentran presentes solo en las cianobacterias y algas.

3.3.2 Reducción y fijación de CO₂

El ATP y el NADPH resultantes de la fase de absorción de luz, son utilizados para llevar a cabo la reducción del carbono del CO₂ a un azúcar simple. La energía almacenada en el ATP y el NADPH se transfiere a las moléculas adecuadas para el transporte y almacenamiento de energía en las células de las algas.

3.3.3 Cloroplastos

La fotosíntesis tiene lugar en los cloroplastos, los cuales se encuentran envueltos por dos membranas que controlan la entrada o salida a la molécula. Los cloroplastos poseen membranas laminares llamadas tilacoides, en las cuales se encuentran la clorofila a y clorofila b y a su vez se encuentran otros pigmentos llamados carotenos y xantofilas. Estos pigmentos son los encargados de la absorción de la luz, en las membranas tilacoides también se encuentran unas enzimas para ayudar al transporte de electrones y al factor de acoplamiento para la formación de ATP (Salisbury & Ross, 1994).

3.4 PARAMETROS DE INFLUENCIA EN UN SISTEMA DE CULTIVO

Existen diversas variables que afectan el crecimiento en un sistema de cultivo, entre las que se encuentran, el tipo y concentración de nutrientes, las condiciones óptimas de temperatura, pH, intensidad luminosa, ciclos de luz y oscuridad entre otras, las cuales son importantes para llevar un buen control de las condiciones del cultivo (Fábregas et al, 1996; Tan et al, 2016).

3.4.1 pH

En las microalgas, varía el requerimiento de pH durante su crecimiento. Para valores de pH alcalinos, la disponibilidad de CO₂ puede ser limitante para el crecimiento y la fotosíntesis de microalgas.

El pH en el cultivo está influenciado por varios factores como la alta capacidad de crecimiento, respiración, alcalinidad y composición iónica del medio de cultivo, actividad microbiana y eficiencia de la adicción de CO₂ (Martinez, 2008). La respuesta de las microalgas al pH varía ampliamente, debido a que este factor determina la solubilidad del dióxido de carbono y de los minerales en los cultivos e influye directa o indirectamente en su metabolismo (Ortega & Moronta, 2004).

El pH puede controlarse con la inyección de CO₂ mediante un sistema automatizado, o con la adición de ácido o base (Martinez, 2008). Algunos autores indican que el crecimiento óptimo de las microalgas se da en pH neutro de 7.5 (F. P. H. Martin, 2010; Steinbrenner & Linden, 2001).

3.4.2 Temperatura

La temperatura es uno de los factores ambientales de gran importancia que no solo afecta las reacciones celulares, sino también los requerimientos nutricionales y la composición de la biomasa, así como la solubilidad de los gases en el agua (Skoda, 1992). Los cambios en la temperatura pueden causar alteraciones en las rutas metabólicas, dando cambios en la eficiencia de absorción asociada a una variación en el tamaño y niveles de pigmentos (F. P. H. Martin, 2010). A temperaturas altas se altera la síntesis de proteínas, generando muerte en las microalgas. En muchos casos, la temperatura óptima para el crecimiento de microalgas es 28 °C (Mosqueda-Cano & Gutiérrez-Corona, 1995).

3.4.3 Luz

La intensidad de luz es uno de los factores más importantes para el crecimiento fotosintético de las microalgas. Los sistemas de cultivos están siendo iluminados con luz artificial, solar o ambas. Entre los sistemas de cultivo de algas con iluminación natural y grandes áreas, se encuentran los estanques abiertos, paneles planos, airlift tubulares o de tipo serpentín e inclinado, entre otros (Chisti, 2008). Los sistemas de biorreactores empleados a nivel laboratorio son iluminados interna o externamente por luz artificial con lámparas fluorescentes, dependiendo del sistema de energía se encarece el diseño del fotobiorreactor (Janssen et al., 2000).

La tasa específica de crecimiento de las microalgas depende de la intensidad de la luz. El crecimiento de las microalgas se incrementa conforme la intensidad de luz aumenta. Cuando la tasa de crecimiento llega a su punto máximo, ésta disminuye con el incremento de la intensidad de la luz debido a la foto inhibición (Bohne,

2002). Este patrón de crecimiento en relación con la intensidad de la luz se observa en la mayoría de las especies de microalgas (Fábregas et. al, 1998). Se ha reportado que la producción y acumulación de metabolitos de interés comercial se ve afectada por la radiación de luz blanca en algas, hongos y bacterias (Martin, 2010). Sin embargo, la intensidad y el régimen de la iluminación varían con el género de microalgas.

Es importante tener en cuenta los fotoperiodos a los que se someten los cultivos, ya que el proceso de fotosíntesis cuenta con un ciclo de luz/oscuridad, los cuales son determinantes en la eficiencia de crecimiento de las microalgas (Ramírez et al., 2013).

3.4.4 Nutrientes

El nutriente más utilizado en los cultivos de microalgas es el CO₂. Al consumirse el carbono, el oxígeno es producido por fotólisis del agua y este es diluido en el medio de cultivo (Molina et. al, 1999). Puesto que las microalgas pueden vivir bajo altas concentraciones de dióxido de carbono, los gases de invernadero, el dióxido de nitrógeno y contaminantes en la atmósfera (a partir de diversas fuentes) pueden ser nutrimentos suficientes para las microalgas (Van Beilen, 2009). Los límites de CO₂ en la práctica se usan en el rango de 5 al 15% (Jaiswal & Kashyap, 2002). A continuación, se muestran las concentraciones CO₂ tolerables por algunas especies de microalgas:

Tabla 1. Concentración de CO₂ asimilable por diversas especies de microalgas

Especie	Tolerancia máxima de concentración de CO₂
<i>Cyanidium caldarium</i>	100%
<i>Scenedesmus sp.</i>	80%
<i>Chlorococcum littorale</i>	60%
<i>Synechococcus elongatus</i>	60%
<i>Euglena gracilis</i>	45%

<i>Chlorella sp.</i>	40%
<i>Eudorina sp.</i>	20%
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	15%
<i>Nannochloris sp.</i>	15%
<i>Chlamydomonas sp.</i>	15%
<i>Tetrselmis sp.</i>	14%

Fuente: Ono & Cuello, (2003)

Los nutrientes como los nitratos y fosfatos son importantes, al igual que el sodio y silicatos (Pelah et al., 2004). Esto se debe tener en cuenta al seleccionar un medio de cultivo, debido a los requerimientos específicos de cada cepa de microalgas.

3.5 METABOLITOS DE VALOR AGREGADO

Las microalgas han empezado a desempeñar un papel importante en la biotecnología gracias a la amplia variedad de metabolitos con alto valor comercial. Entre sus aplicaciones se encuentra el uso en la industria alimenticia, agregando valor nutricional en alimentos, amplia utilidad en la acuicultura, en la industria cosmética y obtención de fármacos.

Desde el punto de vista nutricional, las microalgas son fuente de macronutrientes, micronutrientes y ácidos grasos esenciales, tal como se muestra en las tablas 2 y 3. El gran contenido de proteínas y polisacáridos de varias especies de microalgas, es una de las principales características de interés alimenticio que las convierte en una nueva fuente de proteínas. Además, los aminoácidos obtenidos a partir de microalgas salen favorecidos al compararlos con los obtenidos a partir de otras proteínas alimenticias (Gouveia et al., 2008). Un factor importante que favorece la utilización de los polisacáridos obtenidos a partir de las microalgas, es que las posibilidades de controlar el proceso son muy altas y la velocidad de crecimiento y de producción son idóneas (Gouveia et al., 2008).

Tabla 2. Contenido de proteínas y carbohidratos para diferentes especies de microalgas

Microorganismo	Proteínas [%ms]	Carbohidratos [%ms]
<i>Scenedesmus obliquos</i>	50-56	10-17
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	32
<i>Spirogyra sp.</i>	6-20	33-64
<i>Dunaliella salina</i>	57	32
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-45	40-57
<i>Spirulina máxima</i>	28-39	13-16

Fuente: Gouveia et al., (2008)

Tabla 3. Contenido de lípidos en distintas microalgas

Microorganismo	Lípidos [%peso seco]
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella sp.</i>	28-32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16-37
<i>Dunaliella primoleta</i>	23
<i>Isochrysis sp.</i>	25-33
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloris sp.</i>	20-35
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31-68

<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30
<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77
<i>Tetraselmis suecica</i>	15-23
<i>B. braunii</i>	25-75

Fuente: Gouveia et al. (2008)

Los lípidos están entre los metabolitos más representativos que son materia prima para la elaboración de biocombustibles. La *Chlorella sp.*, posee la capacidad de producir cantidades representativas de lípidos (hasta el 40% presente dentro de la estructura de la microalga), los cuales están compuestos por ácidos grasos poli-insaturados, que son de gran utilidad como materia prima para la elaboración de biodiesel (F. P. H. Martin, 2010). En la tabla 3, se puede observar el contenido de lípidos para diferentes tipos de microalgas.

Dado que el género *Chlorella* produce 1/3 de su peso en lípidos, se la ha tomado en cuenta como una de las especies aptas para la producción de biodiesel (Gouveia et al., 2008). El tipo de ácidos grasos que producen son de fundamental importancia debido a que poseen ácidos grasos poli-insaturados que disminuyen en cierto grado la estabilidad del biodiesel.

Una de las características más obvias y significativas de las microalgas es su color. En general, cada familia tiene su propia combinación de pigmentos y un color en particular (Gouveia et al., 2008). Además de la clorofila, las microalgas producen un gran número de pigmentos dentro de los que destacan un amplio rango de carotenoides. Están consideradas como una excelente fuente de colorantes naturales. Su función como antioxidantes en las algas presenta un paralelismo interesante con su potencial uso como antioxidante en alimentos para humanos. Todas las algas poseen al menos un tipo de clorofila, siendo la clorofila-a la más común. Además de su uso como colorante alimentario y farmacéutico, los

derivados de la clorofila han sido utilizados tradicionalmente como medicamentos debido a su capacidad antiinflamatoria así como de control de cristales de oxalato y deodorización interna (Ferruzzi & Blakeslee, 2007).

3.6 TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL CON EL USO DE MICROALGAS

Diversos tipos de aguas residuales constituyen un medio apropiado para el crecimiento de microalgas, las cuales crecen rápidamente convirtiendo la energía solar en materia orgánica. Además, la actividad fotosintética proporciona oxígeno para la oxidación microbiológica de los residuos orgánicos y la incorporación fotosintética de CO₂ aumenta el pH del agua residual hasta un valor letal para muchas bacterias y virus patógenos.

El objetivo fundamental de la aplicación de microalgas en el tratamiento de aguas residuales es la utilización y transformación de los nutrientes a biomasa, con la consecuente producción de oxígeno para mejorar la calidad del efluente, así como la disponibilidad de éste para la continua oxidación bacteriana de la materia orgánica en sistemas integrales, mediante el ciclo de oxigenación fotosintética de aguas residuales.

La importancia y aplicación de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales, tiene sus antecedentes en la época de Caldwell (1940), quien reporta los primeros estudios, sobre la posibilidad de utilizar las microalgas como "microorganismos purificadores de aguas residuales", debido al aprovechamiento de los nutrientes inorgánicos contenidos en esta agua, para favorecer el crecimiento de las microalgas, funcionando éste como medio de cultivo.

Posteriormente (Oswald & Gotaas, 1852), introduce un nuevo concepto en la producción masiva de microalgas, al llevar a cabo el tratamiento de las aguas residuales, obteniendo una producción de biomasa vegetal con un alto contenido proteico, lo que finalmente se considera como una valorización de las aguas residuales mediante el cultivo de microalgas.

El tratamiento de las aguas residuales con microalgas presenta ventajas tan importantes como son el mejoramiento de la calidad del efluente mediante un mecanismo de bajo costo energético, así como el aprovechamiento de nutrientes que están siendo desechados al ser incorporados a la biomasa, con la consecuente producción y generación de oxígeno (Ramalho, 1996).

Estas ventajas tienen como consecuencia en un proceso global, la remoción de sales (amonio, nitritos, nitratos, ortofosfatos), el aumento del pH de los efluentes (proceso fotosintético) lo cual favorece la precipitación de ortofosfatos, la eliminación de nitrógeno amoniacal, por efecto de intercambio gaseoso, la disminución de la demanda biológica de oxígeno, la oxigenación del agua favoreciendo la oxidación continua de materia orgánica, la acción bactericida reduciendo la supervivencia de organismos patógenos y la recuperación de CO₂ liberado en los procesos mediante su empleo en el proceso (Abalde, 1995).

Algunos autores han investigado el tratamiento de aguas residuales mediante microalgas fijas en biopelículas, alginato y quitosán abe y takahashi. Entre las especies estudiadas se encuentran las *Pediastrum sp* (Park et al., 2011), *Chlorella sp* y *Chlamydomonas sp* (Avila, 2015), *Chorella* y *Scenedesmus* (Acurio & Archiniegas, 2015). En la tabla 4, se muestra algunas especies de microalgas que se han usado en el tratamiento de aguas residuales.

Tabla 4. Microalgas empleadas en el tratamiento de aguas residuales

Microalga	Tipo agua residual
<i>Prototheca zopfi</i>	Hidrocarburos
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Tintes azoicos
<i>Chlorella sp.</i>	Materia orgánica en sistemas anaerobios
<i>Ankistrodesmus</i>	Agua residual de la industria del papel
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Agua residual de la industria del papel
<i>Spirulina platensis</i>	Agua residual urbana

<i>Chlorella sorokiniana</i>	Agua residual sin presencia de luz
<i>Botryococcus braunii</i>	agua residual después del sistema secundario
<i>Scenedesmus</i>	Altos niveles amonio en efluente de digestión anaerobia

Fuente: Rawat, (2011).

3.7 EFLUENTES ANAEROBIOS

El tratamiento anaerobio (descomposición en ausencia de oxígeno), nació hace unos 20 años, para el tratamiento de los efluentes industriales. Tiene los mismos fundamentos microbiológicos que las tradicionales plantas que utilizan los agricultores para generar biogás con estiércol, pero se adoptó a efluentes diluidos, separando el tiempo de retención del agua residual en los tanques y el de retención de la microbiota. Además, los tiempos de retención del agua residual en los tanques de fermentación se redujeron en comparación a las plantas tradicionales.

Para llevar a cabo la digestión anaerobia se han propuesto varios procesos con configuraciones diferentes, con el objetivo de optimizar el sistema. Este tipo de configuraciones puede agruparse de acuerdo a la forma en que se encuentre la biomasa en su interior. A partir de esto, se originan tres grandes tipos, reactores con crecimiento celular en suspensión, con biomasa fija y de lecho expandido (Arias, 2004). A continuación en la tabla 5, se muestran los distintos sistemas de tratamientos anaerobios.

Tabla 5. Sistemas de tratamiento anaerobios

Sistemas anaerobios	Primera generación: Biomasa en suspensión	Fosa séptica Laguna anaerobia Digestor convencional
---------------------	--	---

		Digestor completamente mezclado Contacto anaerobio
Segunda Generación:	Biomasa fija	Filtro anaerobio de flujo ascendente Reactor tubular de película fija
	Biomasa suspensión	Reactor anaerobio de flujo ascendente
Tercera generación: Lecho expandido		Lecho expandido Lecho fluidificado

Fuente: Arias, (2004)

Según Arias (2004), los sistemas de primera generación corresponden a aquellos procesos en donde la biomasa se encuentra en suspensión. Los de segunda generación, están compuestos por aquellos procesos en donde los microorganismos son retenidos en el reactor, ya sea mediante un soporte formando una película de microorganismos fijos, o bien por medio de la sedimentación de floculos microbianos con muy buenas características de decantación. En estos sistemas se logran menores tiempos de retención hidráulica, lo que recae en volúmenes menores de reactor. Además, presentan una mayor estabilidad y facilidad en su operación.

Los de tercera generación son aquellos donde los microorganismos ya están adheridos en un soporte que se expande o fluidifica. Presentan tiempos de retención relativamente menores, en comparación con otros sistemas.

Los sistemas anaerobios han tenido un desarrollo apreciable y tienen ventajas para considerarlos una buena opción como sistemas de tratamiento primarios.

Las bacterias anaerobias utilizan entre 5- 10% de la energía contenida en el sustrato para funciones de reproducción, originando nuevas células, dirigiendo el 90- 95% restante en la producción de gas metano, en cambio en los sistemas aerobios las bacterias emplean entre 50-65% de la energía del sustrato en la síntesis de nuevas células, mientras que la otra parte es utilizada en la

reutilización de otras funciones metabólicas. De esta manera los compuestos contaminantes son aprovechados y transformados en nuevas células, por lo que las características metabólicas determinan el tipo de aplicación, ventajas y desventajas del proceso (Cuervo, 1988; Noyola, 1989).

Sin embargo, tiene en su contra su efecto sobre la concentración de nutrientes. Si bien sus resultados sobre la remoción de materia orgánica demuestran ser eficientes, la eliminación de nitrógeno, fósforo y patógenos es apenas parcial (Van Haandel & Lettinga, 1994).

El tiempo de arranque en los sistemas anaerobios se hace mucho más lento, debido a que las bacterias anaerobias son susceptibles a inhibición por un gran número de compuestos y por su lenta adaptación a las variaciones alimenticias. Usualmente se requiere de un post-tratamiento, se debe esto a la posibilidad de generar efluentes de mal aspecto, el agua resultante tiene una cantidad de amonio y su bioquímica y microbiología son muy complejas (Chernicharo, 1997).

3.8 FOTOBIOREACTORES

Son biorreactores que incorporan algún tipo de fuente de luz como fuente de energía fotónica al sistema. Son considerados sistemas cerrados, en los cuales el cultivo de microalgas no interactúa directamente con el ambiente, evitando así la contaminación del mismo.

Son contruidos de materiales transparentes como vidrio y policarbonato, lo cual permite el traspaso de la luz necesaria para llevar a cabo la fotosíntesis.

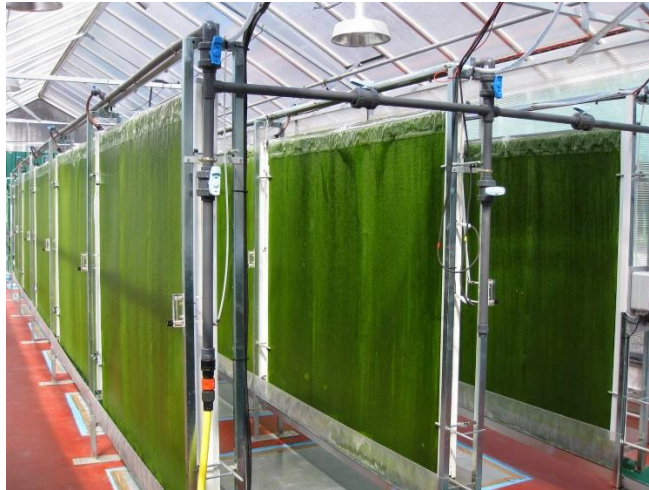
3.8.1 Tipos de fotobiorreactores

3.8.1.1 Fotobiorreactores de placa plana

Posee una amplia superficie de iluminación, está hecho de materiales transparentes para el aprovechamiento máximo de la energía lumínica. La

acumulación de oxígeno disuelto es relativamente bajo en comparación a otros tipos de fotobiorreactores (Tredici et. al, 1991). Sin embargo, este tipo de fotobiorreactor es poco económico debido a la cantidad de materiales que se requieren para construirlo.

Figura 5. Fotobiorreactor de placa plana



Fuente: Benavente (2012)

3.8.1.2 *Fotobiorreactores tubulares de columna inclinada*

Son compactos y fáciles de operar, permite una alta transferencia de masa, buena mezcla y bajo consumo de energía. La poca área de iluminación y los materiales de construcción son unas de sus limitaciones (Sánchez, 1999).

Figura 6. Fotobiorreactores de columna inclinada



Fuente: Benavente (2012)

3.8.1.3 *Fotobiorreactor tubular horizontal*

Es adecuado para cultivos en el exterior bajo acción de energía lumínica proveniente del sol. Por eso, el diámetro de los tubos del colector es pequeño, inferiores al 0.1 metro (Chisti, 2008). Utiliza para su funcionamiento un cultivo continuo, que circula desde una columna de desgasificación hacia un colector solar y de regreso a la columna de desgasificación. Estos fotobiorreactores están organizados de manera horizontal, los tubos deben estar ubicados sobre un piso blanco para así aumentar su capacidad de reflectancia solar y deben ir orientados en dirección Norte-Sur (Chisti, 2008).

Figura 7. Fotobiorreactor tubular



Fuente: Benavente (2012)

4. METODOLOGÍA

4.1 OBTENCIÓN Y PRESERVACIÓN DE LAS MICROALGAS

La muestra de microalgas nativas fue tomada de los canales que se encuentran al final de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de la Universidad Pontificia Bolivariana Seccional Bucaramanga (PTAR-UPB). Las microalgas fueron cultivadas en el laboratorio de agua potable de la universidad.

El cultivo se realizó en recipientes cilíndricos transparentes de vidrio con una capacidad de 1 litro, cada uno con proporciones de 200 mL de biomasa y 800 mL de medio de cultivo Bold Basal. La tabla 6 muestra la composición del medio de cultivo Bold Basal utilizado. Todos los materiales y el medio de cultivo se esterilizaron previamente durante 2 horas en una autoclave Gemmy Sturdy SA-300VL. Los cultivos fueron realizados con una iluminancia de 4700 Lux en un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas y a una distancia de 5 cm de los tubos fluorescentes. Se tuvo aireación continua, suministrada por un soplador y temperatura ambiente de 27 ± 2 °C.

Tabla 6. Bold Basal Medium

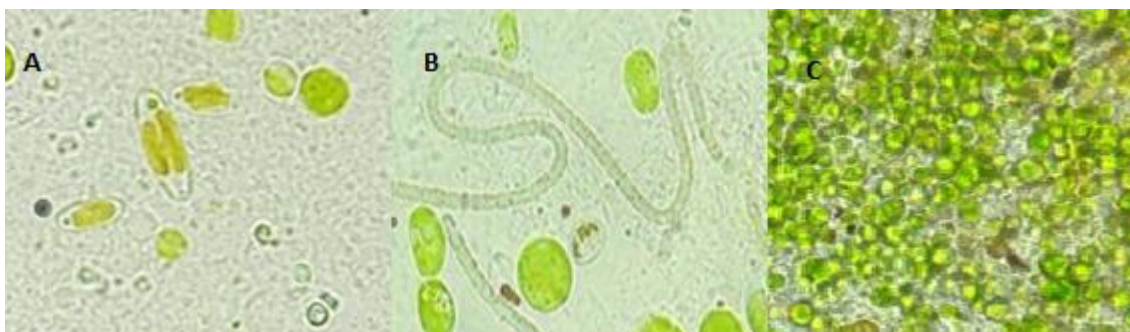
Componente	Solución Stock (g·L ⁻¹ dH ₂ O)	Cantidad Usada	Concentración en Medio Final (M)
NaNO ₃	25.00	10 mL	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.50	10 mL	2.94×10^{-3}
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7.50	10 mL	1.70×10^{-4}
K ₂ HPO ₄	7.50	10 mL	3.04×10^{-4}
KH ₂ PO ₄	17.50	10 mL	4.31×10^{-4}
NaCl	2.50	10 mL	1.29×10^{-3}
Solución EDTA Alcalina	1 mL		4.28×10^{-4}
EDTA	50.00		
KOH	31.00		1.71×10^{-4}
Solución de Métodos Acidificada	1 mL		5.53×10^{-4}
FeSO ₄ ·7H ₂ O	4.98		
H ₂ SO ₄			1.79×10^{-5}
Solución de Boro	1 mL	1 mL	

H ₃ BO ₃	11.42		
Solución de Metales Traza	1 mL		1.85 × 10 ⁻⁴
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.82		
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.44		3.07 × 10 ⁻⁵
MoO ₃	0.71		7.28 × 10 ⁻⁶
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.57		4.93 × 10 ⁻⁶
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.49		6.29 × 10 ⁻⁶

Fuente: Bischoff & Bold, (1963).

Se hizo resiembra de los cultivos para suplir el agotamiento de nutrientes y realizar réplicas de dicho cultivo. Se identificaron cepas de microalgas *Chlorella vulgaris*, las cuales predominaron en mayor cantidad, mientras que las cepas de *Bacillariophyceae* y *Ulothrix sp.*, se presentaron en menor cantidad, como se muestra en la figura 8.

Figura 8. Microalgas identificadas. A: *Bacillariophyceae*, B: *Ulothrix sp.*, C: *Chlorella vulgaris*.



Fuente: Los autores, (2016)

4.2 DESCRIPCION DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental se hizo para estudiar los efectos de los factores de interés de una manera simultánea. Se utilizó un diseño factorial 3², en el cual se definieron dos factores: concentración inicial de microalgas y concentración inicial de nutrientes, además, para cada factor se plantearon 3 niveles específicos. Las

pruebas se realizaron en 3 corridas diferentes, para las cuales se manejaron las concentraciones iniciales de biomasa de 50, 200, 300 mg/L, mientras que los niveles elegidos en la concentración inicial de nutrientes fueron 89,0 mg/L, 58,6 mg/L y 83,3 mg/L de ortofosfatos, y 116,9 mg/L, 105,3 mg/L y 107,3 mg/L de nitrógeno, cada concentración inicial de nutrientes fue estudiada durante una corrida. Las concentraciones de nutrientes pertenecen al efluente anaerobio de la planta de tratamiento de aguas residuales de la Universidad Pontificia Bolivariana Seccional Bucaramanga (PTAR-UPB), cada concentración fue tomada en una época diferente durante el semestre, teniendo en cuenta, que las concentraciones de 89,0 mg/L de ortofosfatos y 116,9 mg/L de nitrógeno fueron tomadas a final de semestre, mientras que las de 58,6 mg/L de ortofosfatos y 105,3 mg/L de nitrógeno fueron tomadas en época de vacaciones, cuando el número de personas presentes en la universidad era menor. Por último las concentraciones de 83,3 mg/L de ortofosfatos y 107,3 mg/L de nitrógeno fueron tomadas a inicios de semestres. Las variables de respuesta para este diseño fueron: la concentración final de biomasa, concentración final de proteínas, carbohidratos, lípidos, clorofila a y b, concentración de NH_4^+ y P-PO_4 . Los experimentos se realizaron por triplicado.

Para el análisis estadístico se realizó un análisis de modelo lineal general univariado ANOVA, para explorar la interacción y la significancia de los diferentes niveles y factores en las variables de respuestas, utilizando el software IBM SPSS Statistics 23.

4.3 MONTAJE EXPERIMENTAL A ESCALA LABORATORIO

Los fotobiorreactores fueron simulados usando botellas SCHOTT DURAN® de vidrio translúcido con un volumen útil de 1000 mL y con dimensiones de 101 mm de diámetro x 230 mm de altura. En los fotobiorreactores se acopló un dispositivo de desgasificación, que permite la liberación de oxígeno liberado durante el

proceso de fotosíntesis. La agitación en el reactor se realizó por medio de burbujeo, a través de un sistema de inyección de aire, el cual también suministró el CO₂ requerido por las microalgas. El aire inyectado fue filtrado a través filtros Pall Acro 50 de 0.2 micras para material particulado, para evitar la contaminación del reactor.

Para el aporte de luz se utilizó un sistema de iluminación artificial, que cuenta con lámparas fluorescente trifósforo PHILIPS F32T8/TL841/PLUS/ALTO HG, cada una ubicada a 5 cm del reactor. El ciclo de luz/oscuridad que se manejo fue de 12/12 horas, el cual fue controlado por temporizadores eléctrico que se fijaron a un marco de acero inoxidable a una altura de 5 y 10 cm con respecto a la base. Los experimentos se llevaron a cabo durante 10 días a una temperatura ambiente de 27 ± 2 °C. Durante el transcurso de los experimentos no se suministró ningún tipo de nutrientes extras a los reactores. El medio de cultivo utilizado fue efluente anaerobio adquirido de la planta de tratamiento de aguas residuales de la Universidad Pontificia Bolivariana Seccional Bucaramanga (PTAR-UPB). En la Figura 9, se muestra el montaje realizado para el estudio.

Figura 9. Montaje en Funcionamiento



Fuente: Los autores

4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.4.1 Parámetros de control

Los parámetros de control medidos durante el proceso fueron: pH, temperatura y oxígeno disuelto, los cuales se monitorearon utilizando un medidor multipárametro portátil HQ40D.

Debido a que los tratamientos de aguas residuales con el uso de métodos biológicos requieren ciertas condiciones de medio, se tuvo en cuenta los rangos de temperatura entre 25-35°C y pH entre 6,5-7,5. El pH se mantuvo en dicho rango utilizando H₂SO₄ 1M y NaOH al 10%.

4.4.2 Parámetros de seguimiento

4.4.2.1 *Peso seco*

La metodología utilizada para establecer la concentración de biomasa fue la propuesta por Moheimani (2012), en la cual se mide la densidad óptica a una determinada longitud de onda. En esta metodología se realiza previamente una curva de correlación entre el peso seco de muestras de biomasa algal y la absorbancia.

Para determinar el peso seco se utilizaron filtros GF/C, los cuales se secaron durante 1 hora a una temperatura de 104 °C, posteriormente se pesaron. Se filtró 1 mL de alícuota en un filtro y se secó durante 1 hora a una temperatura de 104 °C. Posteriormente se dejó reposar durante 15 min en el desecador y se pesó nuevamente en una balanza analítica. Simultáneamente, se tomaron absorbancias a 500, 550, 580 y 610 nm en un espectrofotómetro Thermo serie GENESYS 10UV. Este procedimiento se repitió durante 21 días por duplicado. Finalmente, se obtuvo la curva de correlación y la ecuación correspondiente.

El peso seco de la muestra se calculó con la siguiente ecuación:

$$PS = \frac{\text{peso filtro seco con la muestra} - \text{peso del filtro sin la muestra}}{\text{volumen muestra}}$$

La tasa de crecimiento puede ser calculada usando la siguiente ecuación (Borowitzka & Mohemani, 2012):

$$K' = \frac{\ln(N_1 - N_2)}{t_2 - t_1}$$

Donde N_1 y N_2 son la biomasa en t_1 y t_2 , los cuales son los tiempos. La tasa específica de crecimiento se calcula usando la ecuación (Borowitzka & Mohemani, 2012):

$$\mu = \frac{K'}{\ln 2}$$

4.4.2.2 Preparación de la muestra

Se tomaron 10 mL de muestra, la cual fue centrifugada en tubos graduados de polipropileno de 15 mL por 10 minutos a 3600 rpm. El sobrenadante se almacenó en frascos ámbar de 50 mL para ser utilizado en las pruebas de ortofosfatos, nitratos y nitrógeno, mientras que los pellets fueron usados para las muestras de proteínas, carbohidratos, clorofila y lípidos.

4.4.2.3 Nitrógeno

Se realizó con ayuda del Grow Master para el análisis de nutrientes HI 83225 de HANNA Instruments. Se utilizó la metodología descrita en el manual de instrucciones del equipo, que consiste en una adaptación del método Nessler, D1426-92() tomado del Manual of Water and Environmental Technology ASTM. El procedimiento consiste en el uso de un reactivo A-HI 937715A-0 y un reactivo B-HI 93715B-0. El reactivo B-HI 93715B-0 está compuesto por Hidróxido de Sodio y Yoduro de Mercurio (II) (HANNA, 2008), los cuales al reaccionar toman una tonalidad que puede ser medida en el equipo mediante un diodo en una fotocelda.

Se tomaron 10 mL de sobrenadante de la muestra, agregándolo en la celda de medición hasta la marca, se agregaron los reactivos y se midió en el equipo durante 3 minutos y 30 segundos. El equipo muestra la concentración de nitrógeno

amoniaco ($\text{NH}_3\text{-N}$) en mg/L, la concentración de amoníaco (NH_3) en mg/L y la concentración de amonio (NH_4) en mg/L.

4.4.2.4 *Nitratos*

La determinación de la concentración de nitratos se realizó mediante el uso del método de proyección espectrofotométrica ultravioleta 4500- $\text{NO}_3\text{-B}$ (APHA, 2005). Se tomaron 10 mL del sobrenadante de la muestra, se agregaron 0.2 mL de HCl 1N y se realizó la medición en un espectrofotómetro UV-VIS DR5000 HACH a longitudes de onda de 220 nm y 275 nm, con el fin de determinar la interferencia debido a la materia orgánica disuelta.

4.4.2.5 *Ortofosfatos*

La determinación de ortofosfatos se llevó a cabo utilizando el método colorimétrico del ácido Vanadomolibdofosfórico 4500-PC (APHA, 2005). Para llevar a cabo el procedimiento se preparó el reactivo de vanadato molibdato mediante la mezcla de dos soluciones, en la primera solución se disolvieron 25 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 300 mL de agua destilada; para la segunda solución se disolvieron 1.25 g de NH_4VO_3 en 300 mL de agua destilada caliente, se dejó enfriar y se agregaron 330 mL de HCl, por último, se mezclaron las dos soluciones y se aforaron a 1 L con agua destilada. Se realizó la curva de calibración usando una solución estándar de fosfatos.

Se agregaron 35 mL de sobrenadante de la muestra en un balón aforado de 50 mL, se adicionaron 10 mL de reactivo de vanadato molibdato y se aforó con agua destilada. Se dejó reposar durante 10 minutos y se midió en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 470 nm, para el blanco se utilizó agua destilada con el reactivo.

4.4.2.6 *Carbohidratos*

El método usado para la determinación de la concentración de carbohidratos es el método de ácido fenol-sulfúrico desarrollado por Kochert (1978). Al pellet

resultante de en la etapa de extracción de la muestra, se le adicionó 5 mL de H₂SO₄ 1 M, se mezcló en el vortex y se sometió a baño María durante 1 hora. Posteriormente se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos y se centrifugó por 10 minutos a 3600 rpm, luego se extrajo 2 mL de sobrenadante y se colocó en un tubo de vidrio, se agregó 1 mL de fenol al 5% y se agitó en el vortex. A continuación, se agregó 5 mL de H₂SO₄ concentrado, se agitó nuevamente en el vortex y se dejó reposar por 30 minutos hasta enfriarse. Pasados los 30 minutos se midió la absorbancia en el espectrofotómetro, en el cual se había realizado la curva de calibración con glucosa a 458 nm.

4.4.2.7 *Proteínas*

El método utilizado para la determinación de proteínas es el método de Lowry et al., (1951). En un tubo de ensayo con el pellet de algas centrifugadas, se agregaron 10 ml del reactivo de Biuret, se mezcló en el vortex y se llevó a baño María por 1 hora. Posteriormente, se agregaron 0,5 mL de Folin-Fenol a la muestra aún caliente mezclando en el vortex, se dejó reposar en hielo y luego a temperatura ambiente por 15 minutos. Por último, se centrifugó la muestra durante 10 minutos a 3600 rpm y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro en el cual se había realizado la curva de calibración con albumina a una longitud de 660nm.

4.4.2.8 *Lípidos*

Para determinar la concentración de lípidos se utilizó el método de Bligh and Dyer (1959). El reactivo de Bligh and Dyer está compuesto por metanol, cloroformo y agua destilada, en una proporción 2:1:0.8 respectivamente.

En el tubo de ensayo que contiene el pellet resultante de la centrifugación, se adicionó 5,7 mL del reactivo Bligh and Dyer, se mezcló en el vortex para resuspender la biomasa, se centrifugó nuevamente la muestra a 3600 rpm por 10 minutos y el sobrenadante se adicionó a un tubo de vidrio de 20 mL. Se tomó el tubo de ensayo que contiene el pellet y se adicionó nuevamente 5,7 mL del

reactivo de Bligh and Dyer, se mezcló en el vortex, se centrifugó y se adiciono el sobrenadante al tubo de vidrio. Posteriormente, se agregaron 3 mL de cloroformo al tubo de vidrio y se llevó a vortex nuevamente. La muestra en el tubo de vidrio se dejó en el refrigerador a 5 °C durante 24 horas en la oscuridad. Pasadas las 24 horas se procedió a retirar la capa de etanol y agua en la parte superficial con ayuda de una pipeta Pasteur. La fase del cloroformo de traspasó a una caja Petri previamente pesada, la cual se llevó a una cabina de extracción hasta que la el cloroformo se evaporó. La caja Petri se llevó a un desecador y posteriormente fue pesada en una balanza analítica.

Para determinar el contenido de lípidos se usó la siguiente ecuación:

$$\text{Lípidos (L)} = \text{Peso de la caja petri con la muestra seca} \\ - \text{Peso del la caja petri vacía}$$

4.4.2.9 Clorofila

La concentración de clorofila se determinó a partir del método de Mohemani (2012). En un tubo de ensayo con el pellet que resultó de la etapa de extracción de la muestra, se agregaron 10 mL de etanol al 100%, consecutivamente se llevó a baño maría por 15 minutos, se dejó enfriar durante 5 minutos y nuevamente se centrifugó durante 10 minutos a 3600 rpm. Por último, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a longitudes de ondas de 664 nm, 647 nm, 630 nm y 691 nm.

Las ecuaciones usadas para determinar la concentración de clorofila son las siguientes (Ritchie, 2008):

$$\text{Clorofila } a = 0,0604E_{630} - 4,5224E_{647} + 13,2969E_{664} - 1,7453E_{691}$$

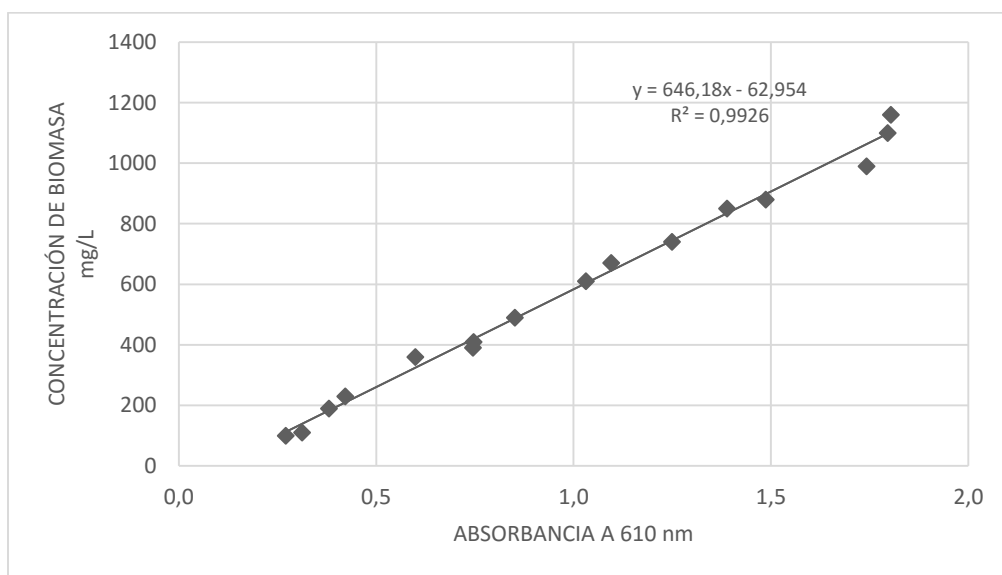
$$\text{Clorofila } b = -4,1982E_{(630)} + 25,7205E_{647} - 7,4096E_{664} - 2,7418E_{691}$$

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 CURVA DE CORRELACIÓN PARA LA BIOMASA

Para determinar la concentración de biomasa en las pruebas posteriores se realizaron curvas de correlación entre densidad óptica a diferentes longitudes de onda y concentración de biomasa, medida como peso seco. Las longitudes de onda evaluadas para la densidad óptica fueron: 500 nm, 550 nm, 580 nm 610 nm; de las cuales se eligió trabajar con la longitud de onda de 610 nm, que presentó mejor ajuste lineal y constante de correlación R^2 en comparación a las otras longitudes de onda (Ver figura 10).

Figura 10. Curva correlación entre la concentración de biomasa y la absorbancia



Fuente: Los autores

La Figura 10 muestra el comportamiento lineal de los datos, con una constante de correlación R^2 igual al 0,9926 y la ecuación $y = 646,18x - 62,954$, que describe el crecimiento de la biomasa. Con esta información se llevó a cabo el control del crecimiento del cultivo durante las pruebas posteriores. Este tipo de

comportamientos se pueden evidenciar en los modelos reportados por otros autores (De-Bashan et al., 2002; Infante et al., 2013; Martin, 2010).

5.2 PARÁMETROS DE CONTROL

Los parámetros de control se midieron día por medio, entro los cuales se encuentran el pH, la temperatura y el oxígeno disuelto. El pH se mantuvo en un rango de 6.5 a 7.5, utilizando H_2SO_4 1N y NaOH al 10%. En cuanto al oxígeno disuelto, el valor máximo registrado fue de 7,1 mg/L y para la temperatura se obtuvieron valores entre 24,5°C y 27,9°C. Los datos de los parámetros de control se pueden evidenciar en el Anexo F.

5.3 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE BIOMASA

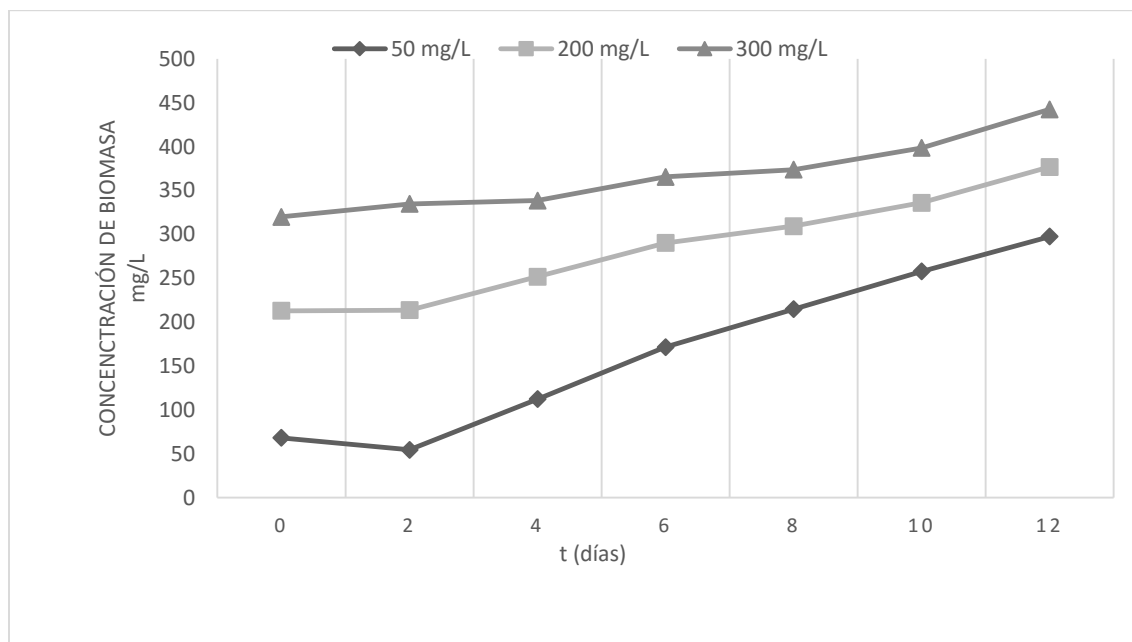
5.3.1 Crecimiento de microalgas

Las concentraciones iniciales de biomasa usadas fueron 50, 200, 300 mg/L. Las pruebas se realizaron durante 12 días en las mismas condiciones ambientales de temperatura, pH y ciclo de luz/oscuridad. Durante las pruebas se presentó un rápido crecimiento, como se observa en la Figura 12.

Se puede observar que el comportamiento del crecimiento de la biomasa para los tres casos es muy similar, presentando así una tendencia muy cercana a la lineal, con constantes de correlación de 0.93, 0.98 y 0.97 para 300 mg/L, 200 mg/L y 50 mg/L, respectivamente. El análisis de varianza ANOVA no reveló diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de biomasa ($p \leq 0.05$), lo cual se puede evidenciar en el anexo A. Este comportamiento es contrario al obtenido por Andrade et al., (2006), quien evidencia diferencias significativas ($p < 0,05$), debido a la cantidad y disponibilidad de los nutrientes en el agua residual. Por su parte, Kastánek et al. (2010) presenta en sus resultados un comportamiento similar en el crecimiento de las microalgas, el cual mostró un crecimiento con comportamiento

lineal. En la Tabla 7, se muestra el comportamiento de la cinética de crecimiento microalgal, a diferentes concentraciones iniciales de biomasa.

Figura 11. Crecimiento de la microalgas a diferentes concentraciones iniciales de biomasa



Fuente: Los autores

Tabla 7. Tasa de crecimiento del cultivo a diferentes concentraciones iniciales de biomasa

[mg/L] Biomasa	K promedio [células/ml]	μ promedio [células/día]	T gen promedio [días]
50	0,12	0,17	4,04
200	0,04	0,06	12,29
300	0,03	0,04	19,79

Fuente: Los autores

Se puede evidenciar que la constante K promedio dio mayor para la concentración de biomasa inicial de 50 mg/L; al igual que la tasa de crecimiento promedio μ , pero el tiempo de generación promedio T fue inversamente proporcional a estos dos últimos factores. Lo que sugiere que la velocidad de crecimiento de una cepa de microalgas depende de la cantidad de individuos y de la concentración inicial de nutrientes que tengan a disposición para llevar cabo sus procesos metabólicos (Park et al., 2011), ya que la cantidad de nutrientes es un factor limitante en el crecimiento de las microalgas (Ho et al., 2011; Park et al., 2011). De igual manera, Serrano (2015), reporta que a menor concentración de individuos, aumenta la actividad metabólica, facilitando el crecimiento del cultivo. Sin embargo, se puede decir que en todos los casos el desarrollo del cultivo fue satisfactorio, gracias a la adaptabilidad que presentó el cultivo de microalgas al medio.

5.3.2 Remoción de nitrógeno

En la tabla 8 se presentan los resultados correspondientes a la remoción de nitrógeno de acuerdo a la concentración inicial de biomasa.

Tabla 8. Remoción de NH_4^+ según la concentración inicial de biomasa

[] Biomasa	%Remoción de NH_4^+	Des. Estándar
50 mg/L	73,5	7,02
200 mg/L	82,9	12,26
300 mg/L	83,3	10,21

Fuente: Los autores

Según la tabla 8, se puede considerar que el cultivo de microalgas mostró una buena respuesta en la remoción de NH_4^+ , ya que se obtuvieron valores de $83.3 \pm 10.2\%$ de NH_4^+ para la concentración inicial de biomasa de 300 mg/L. Se presentó un comportamiento directamente proporcional entre la

concentración inicial de la biomasa y la remoción de NH_4^+ . Esto se debe a que la remoción de nitrógeno estuvo ligada a los requerimientos nutricionales por parte del cultivo (Serrano, 2015).

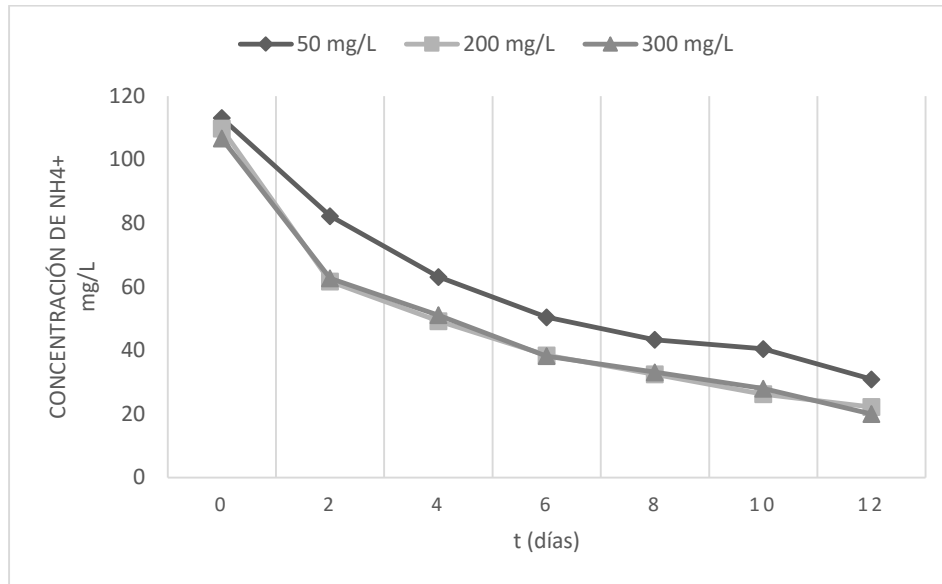
Además, los altos porcentajes de remoción podrían deberse a que las microalgas al ser nativas de la planta de tratamiento de la cual se adquiere el agua residual, están adaptadas al medio (Hernández-Reyes et. al, 2012). Se debe tener en cuenta que las altas concentraciones de nitrógeno en forma de amonio, no afectan significativamente el crecimiento de las microalgas (Tam & Wong, 1996).

Otros estudios han alcanzado porcentajes de remoción de NH_4^+ similares a los obtenidos en esta investigación. Ruiz-Marín et al. (2010) reportaron un 74,3% de remoción de NH_4^+ presente en aguas residuales urbanas, con el uso de un cultivo de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesus obliquus*. Igualmente, Choi & Lee (2012), obtuvieron remociones de nitrógeno del 82,58% y 82,22% al evaluar la eficiencia de la eliminación de nutrientes con una cepa de *C. vulgaris*. En Colombia, Infante et al. (2013), determinaron la remoción de NH_4^+ usando *Chlorella sp.* en aguas residuales urbanas, alcanzando valores del 65% y concluyendo que el pH afectaba ligeramente las remociones de nutrientes.

El comportamiento de las concentraciones de NH_4^+ en el tiempo, de acuerdo a la concentración inicial de biomasa se puede observar en la Figura 13. Se puede apreciar que para los casos de concentraciones iniciales de 200 mg/L y de 300 mg/L de biomasa, el comportamiento de la concentración de NH_4^+ es muy semejante, demostrando una buena respuesta en la remoción del nitrógeno, mientras que para la concentración inicial de 50 mg/L de biomasa el descenso en la concentración de NH_4^+ es menor.

Según Martin (2010), para una alta productividad de las microalgas es prioridad una alta concentración de nitrógeno. Por lo que el NH_4^+ es uno de los nutrientes esenciales para el buen desarrollo de la biomasa microalgal.

Figura 12. Perfil de la concentración de NH_4^+ según la biomasa

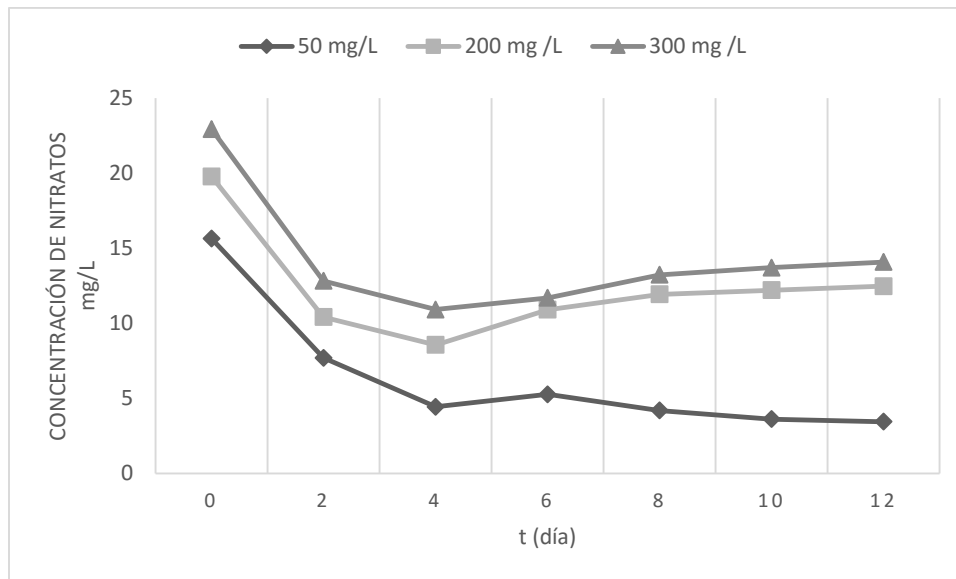


Fuente: Los autores

En el anexo B se puede observar que la biomasa no tiene significancia en la concentración del nitrógeno ($P > 0,05$). Los resultados obtenidos por Ávila (2015) muestran una significancia entre la cepa de *C. vulgaris* utilizada y la disminución de la concentración de nitrógeno en aguas residuales municipales.

La asimilación de nitrógeno por parte de las microalgas, se puede hacer de forma indirecta por medio del seguimiento de la concentración de nitratos. En la Figura 14 se puede ver la concentración de nitratos.

Figura 13. Perfil de la concentración de nitratos según la biomasa



Fuente: Los autores

De acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio se puede observar que el cultivo de microalgas consumió el NO_3^- obteniendo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre cada una de las concentraciones iniciales de biomasa. La concentración de biomasa inicial en la cual se presentó mayor remoción de nitratos fue en la de 50 mg/L de biomasa, debido a que su porcentaje de remoción fue de 77,98%, a comparación de los presentados por las otras concentraciones de biomasa iniciales que fueron de 40,61% y 43,71%. A pesar de esto durante los primeros 3 días se presentó una disminución en la concentración de nitratos en el agua residual, pero a partir del cuarto día la concentración comienza a aumentar. El nitrato se consume con rapidez durante los periodos de proliferación de las microalgas, debido a que estas son capaces de asimilar varias formas de nitrógenos para sus procesos metabólicos. Este comportamiento se puede evidenciar en el estudio realizado por Santafé (2015), quien presenta un aumento inicial en la asimilación de nitrato, pero al pasar los días presenta un aumento en la concentración de estos. Esto se debe a la liberación de nitratos al descomponerse la biomasa muerta o a la descomposición de materia orgánica presente en el medio. En el caso de Tafur (2015), presentó disminución de la

concentración de nitratos en el tratamiento de agua residual municipal al utilizar un cultivo monoalgal de *Chlorella sp*, concluyendo que es viable el tratamiento para la remoción de nitratos.

5.3.3 Remoción de ortofosfatos PO₄-P

Los ortofosfatos en el agua pueden ser limitantes en un ecosistema para el crecimiento vegetal, llegando a provocar eutrofización cuando su concentración es muy alta. La cantidad de ortofosfatos necesaria por las microalgas es menor a la cantidad de nitrógeno necesaria para la misma cantidad de biomasa generada; la toma de nutrientes por parte de las microalgas se ve afectada por la relación N:P en el medio de cultivo (MALGAS, 2013). En a Tabla 9, se presentan los valores de remoción de ortofosfatos según la concentración inicial de biomasa:

Tabla 9. Porcentaje de Remoción de ortofosfatos según la concentración inicial de biomasa

[] Biomasa	%Remoción de P-PO ₄	Des. Estándar
50 mg/L	62,2	6,38
200 mg/L	47,6	8,78
300 mg/L	53,5	9,05

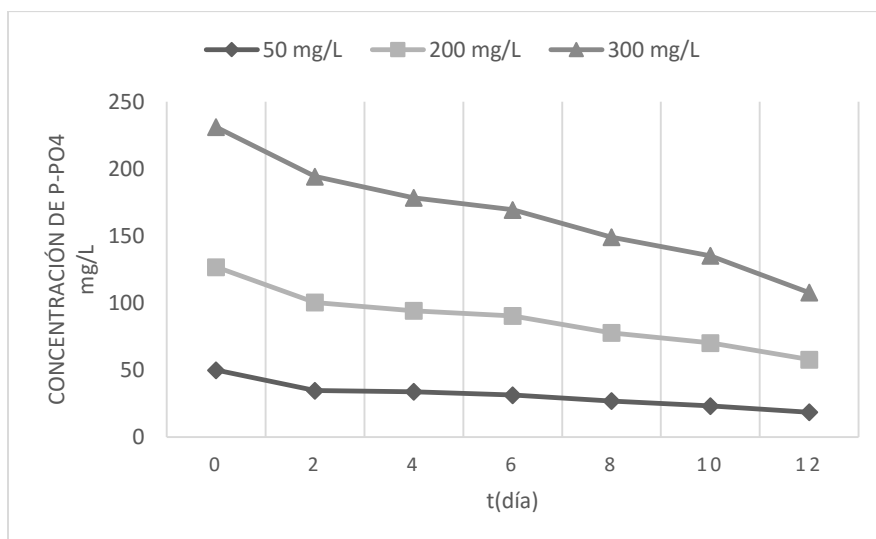
Fuente: Los autores

En cuanto al PO₄-P se obtuvo una disminución del 62,2% en su concentración en la menor concentración inicial de biomasa. Lo que es inversamente proporcional al comportamiento presentado para la concentración de nitrógeno. Algunos autores reportan remociones de fosfatos inferiores, como Aslan & Kapdan (2006) quienes obtuvieron remociones del 15% al investigar el efecto del nitrógeno inicial y las concentraciones de fósforo en el rendimiento de remoción de nutrientes de la *C. vulgaris*. Choi & Lee (2012) presentaron remociones en la concentración de fósforo en un promedio de 28% con *C. vulgaris*. Serrano (2015) reporta remociones de PO₄-P inferiores al 56,3%, con el uso de *C.vulgaris* en el

tratamiento de aguas residuales institucionales. Por el contrario Bermero et al., (2011), indica que la eliminación de ortofosfatos con el uso de *Scenedesmus obliquus* fue superior al 95%, utilizando una concentración inicial de 6,62 mg/L de ortofosfatos, la cual es menor a las utilizadas en esta investigación. Igualmente, Hernandez et al. (2012) obtuvieron eficiencias en la remoción de PO₄-P superiores a 99%, sin embargo también presentaron, en algunos casos, remociones del 49,2% de PO₄-P. Ellos afirman que el consumo de PO₄-P puede ser por asimilación y pérdida por precipitación.

En la Figura 15, se muestra el comportamiento de la concentración de ortofosfatos a través de los días. Se puede determinar que el comportamiento para las tres concentraciones iniciales de biomasa muestra diferencias significativas ($p < 0,05$) en el comportamiento de las concentraciones de ortofosfatos, esto se debe a que la cantidad de ortofosfatos que pueden asimilar las microalgas depende de la cantidad de biomasa que se produce (Beuckels et al., 2015), esto se evidencia en la figura 15, ya que a mayor concentración inicial de biomasa, mayor es la pendiente de variación de la concentración de ortofosfatos.

Figura 14. Perfil de concentración del P-PO₄ a diferentes concentraciones de biomasa



Fuente: Los autores

Según Beuckels et al., (2015) las microalgas absorben nitrógeno y fósforo del agua residual y lo usan para producir biomasa. Las microalgas no pueden asimilar nitrógeno sin la presencia de fósforo, debido a que ambos nutrientes son esenciales para su crecimiento. En la Figura 15, se puede observar que la variación en la concentración de $\text{PO}_4\text{-P}$ no fue alta. Hernandez et al., (2012) reportó, que el consumo de NH_4^+ no equivale al $\text{PO}_4\text{-P}$ removido, por lo que suponen una pérdida por precipitación de fosfatos. A su vez, las variaciones de la concentración de $\text{PO}_4\text{-P}$ podría ser causa de la relación N:P presente en el agua residual y a los ciclos de luz/oscuridad manejados (Choi & Lee, 2012; Zhang et al., 2008), ya que la relación N:P utilizada en esta investigación fue de 8:3 y según Martin et al. (1985), la proporción de N:P en un cultivo de microalgas debe ser de 6:10, la cual es muy distinta a la presentada en esta investigación.

5.4 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE NUTRIENTES

A continuación, se muestra el estudio de la influencia de la concentración inicial de ortofosfatos sobre el comportamiento del crecimiento de las microalgas, en la remoción de amonio NH_4^+ y en la remoción de ortofosfatos $\text{PO}_4\text{-P}$.

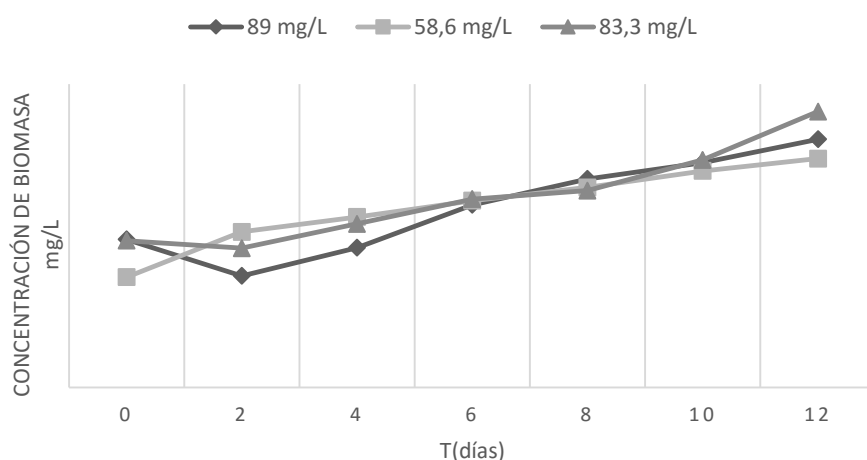
5.4.1 Crecimiento de microalgas

El crecimiento de las microalgas dependen de la concentración de nutrientes disponible para sus procesos metabólicos, pero a concentraciones altas el nitrógeno en forma amoniacal inhibe el crecimiento de las microalgas y en ocasiones pueden llegar a ser tóxicos para estos organismos fotosintéticos (Ruiz, 2011).

En la Figura 16, se muestra la tendencia de la concentración de biomasa de acuerdo a la concentración inicial de nutrientes. Se puede apreciar que la concentración de biomasa presenta mejor crecimiento en la concentración inicial

de 83,3 mg/L de ortofosfatos, pero en todos los casos se observa similitud en las tres gráficas. De acuerdo con el estudio ANOVA, no existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las concentraciones iniciales de nutrientes, esto sugiere que en los tres casos los requerimientos nutricionales de las microalgas fueron debidamente cubiertos por el agua residual utilizada en la investigación (Tafur Alvarez & Estrada Palencia, 2015). En otros estudios se cultivó *Chlorella sp.* cuyo crecimiento mostró una tendencia de comportamiento de tipo lineal, similar a la presentada en los resultados de esta investigación (González et al., 1997; Kastánek et al., 2010; Infante et al., 2012).

Figura 156. Perfil de la biomasa de acuerdo a la concentración inicial de nutrientes



Fuente: Los autores

5.4.2 Remoción de nitrógeno

Para la determinación de la influencia de la concentración inicial de nutrientes sobre la remoción de nitrógeno, se tomó en cuenta como variable de respuesta el comportamiento de la concentración de NH_4^+ a través del tiempo. Los porcentajes de remoción de NH_4^+ según la concentración inicial de nutrientes se presentan a continuación en la Tabla 10:

Tabla 10. Remoción de NH_4^+ de acuerdo a la concentración inicial de nutrientes

[] de Ortofosfatos	% de Remoción de NH ₄ ⁺	Des. Estándar
89,0	64,6	4,4
58,6	87,3	5,7
83,3	82,8	4,4

Fuente: Los autores

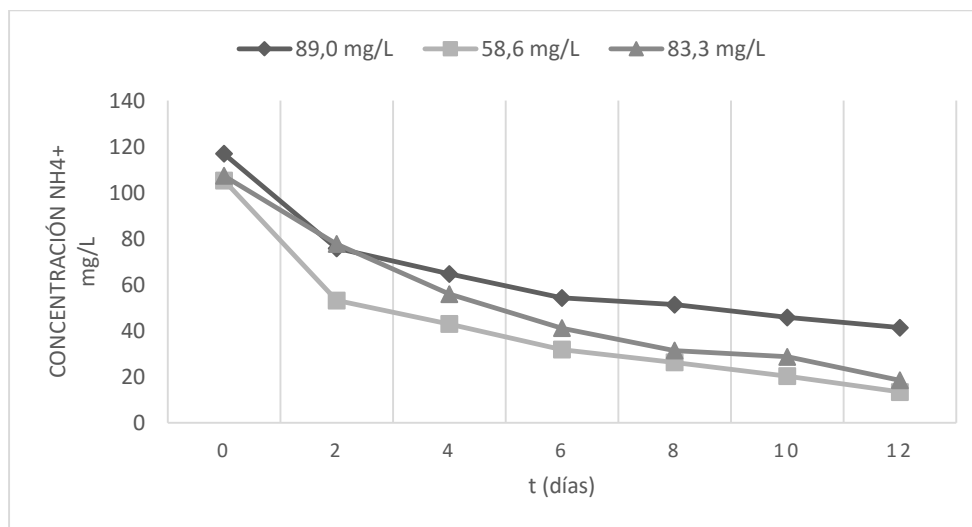
Como se puede observar, las remociones de NH₄⁺ son altas para las tres concentraciones iniciales de nutrientes. La mayor remoción se presenta en la concentración inicial de nutrientes menor. Lo anterior concuerda con lo indicado por Tam & Wong (1996), quienes reportan que el exceso de nitrógeno disminuye la eficiencia de remoción del nutriente, ya que este no es asimilado por el cultivo de microalgas. Mientras que según Ji et al. (2013), los cultivos de microalgas tienen mayor capacidad de remoción de nutrientes al estar adaptadas al medio y tienen la capacidad de modificar su contenido de nitrógeno y fósforo para ajustarse a las condiciones ambientales. González (2010) reportó una eficiencia del 100% para la remoción de nitrógeno mientras que Ruiz (2010) alcanzó remociones del 100%, usando un cultivo de *S. obliquus* y remociones de nitrógeno del 80% con el uso de *C. vulgaris*. En el estudio realizado por Wang et al. (2013), la *Chlorella sp.* mostró alta eliminación de nitrógeno en el agua residual con resultados entre el 75% y 100%. Serrano (2015) con el uso de *C. vulgaris*, obtuvo remociones del 91,2% de nitrógeno indicando que se debía a la rápida adaptación de las microalgas.

En la Figura 17, se evidencia el comportamiento de la concentración de nitrógeno a través de los días, para las diferentes concentraciones iniciales de nutrientes. El resultado arrojado por el análisis ANOVA, permite comprobar que la relación de la concentración inicial de PO₄-P y la concentración de NH₄⁺ tiene significancia (P<0,05). En sus estudios Beuckels al et., (2015), también reportaron significancia entre la concentración inicial de nutrientes y la concentración de nitrógeno. La

remoción de nitrógeno no solo puede deberse al trabajo metabólico de las microalgas, sino también a otros factores como el pH, la alcalinidad, la temperatura y la concentración de oxígeno disuelto (Cárdenas & Sánchez, 2013).

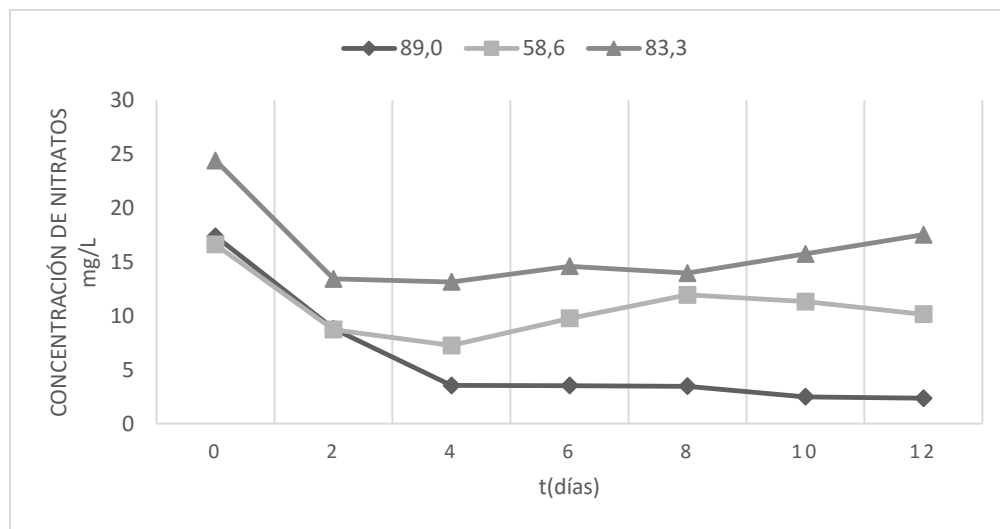
Según Serrano (2015), la remoción de nitrógeno depende de la cantidad de nutrientes en la biomasa de la microalga y que a su vez depende de la cantidad de nutriente disponible en el medio. Por ejemplo, los nitratos pueden ser obtenidos a través de la conversión de nitritos por parte de las microalgas (González et al., 1997); pero existen otros mecanismos capaces de transformar el nitrógeno amoniacal en nitritos y nitratos. Por eso, la concentración de nitratos es una forma de evidenciar si el nitrógeno está siendo eliminado por otros métodos. En la Figura 18, se puede ver el comportamiento de las concentraciones de nitratos a través del tiempo.

Figura 16. Perfil del NH_4^+ teniendo en cuenta la concentración inicial de nutrientes



Fuente: Los autores

Figura 17. Concentración de nitratos a diferentes concentraciones iniciales de nutrientes



Fuente: Los autores

La concentración de nitratos disminuyó durante los primeros 4 días, lo cual quiere decir que la biomasa llevó a cabo la asimilación de nitrógeno, mientras que después del 6 día las concentraciones aumentaron. Según Acurio y Archiniegas (2015), esto podría deberse a varios factores, entre los que se encuentra la oxidación de nitritos a nitratos por parte de bacterias presentes en el agua residual. Es posible que parte del nitrógeno se transformara en nitratos debido al aumento de la alcalinidad del medio, como lo demuestra Bedoya (2012), quien al aumentar la alcalinidad del medio, llevando a cabo un proceso de nitrificación, convirtió el nitrógeno en nitritos y por la presencia del oxígeno en los reactores este se transformó en nitratos. Parra (2012) indica que las microalgas pueden llegar a tener un gran poder de remoción de la concentración de nitratos en tiempos relativamente cortos.

5.4.3 Remoción de ortofosfatos

Mientras las microalgas pueden asimilar el nitrógeno en diferentes formas, el fósforo es asimilado casi exclusivamente en forma de fosfato y es este nutriente el que determina la tasa de crecimiento de las microalgas (Sze, 1998). La remoción del fósforo se logra al mantener unas condiciones ambientales estables dentro de

los reactores, este fósforo es usado por las microalgas para sus procesos metabólicos. A continuación, se muestra en la Tabla 11 los porcentajes de remoción de ortofosfatos según la concentración inicial de nutrientes.

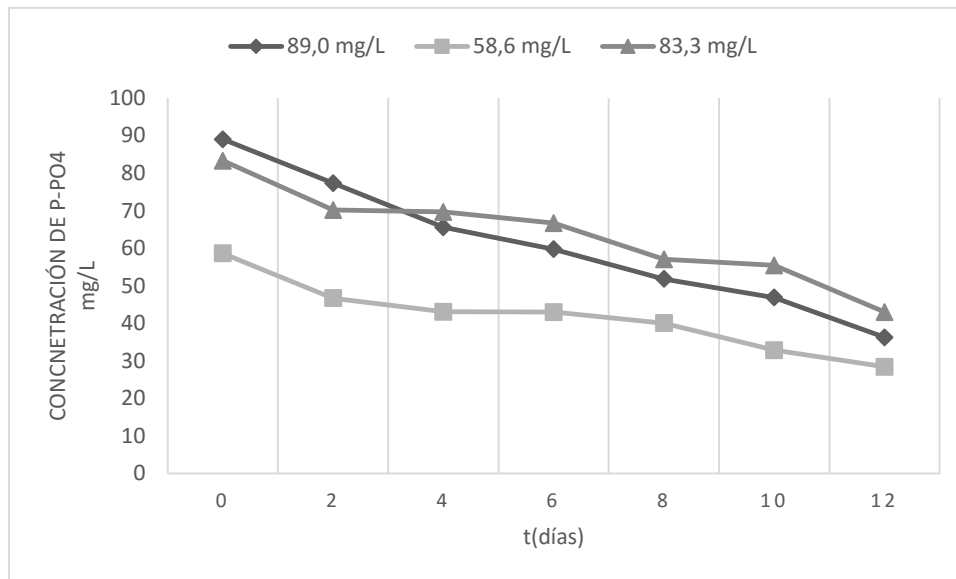
Tabla 11. Remoción de ortofosfatos según la concentración inicial de nutrientes

[] de Ortofosfatos	% de Remoción ortofosfatos	Des. Estándar
89,0	59,9	19
58,6	51,5	9,7
83,3	48,4	12,9

Fuente: Los autores

En la tabla anterior se observa que la mayor remoción de ortofosfatos (59,9%) se presentó con una concentración inicial de nutrientes de 89,0 mg/L. Los resultados de la interacción de la concentración inicial de nutrientes en la remoción de ortofosfatos mostraron un factor significativo ($p < 0,05$). El valor de la remoción de ortofosfatos es mayor a las remoción obtenida por Aslan (2006), quien reportó remociones de ortofosfatos en un 30% con el uso de *Chlorellas vulgaris* en agua residual sintética, mientras que Ávila (2015), obtuvo remociones de ortofosfatos entre 78% a 81% en el tratamiento de aguas residuales municipales con el uso de *Chlorella sp* y *Chlamydonas sp*. Por otro lado, Lau et al. (1995) alcanzaron remociones de ortofosfatos de 85% en un cultivo concentrado y de 70% en un cultivo de baja concentración. Serrano (2015) obtuvo remociones de ortofosfatos entre los 33.3% y 53%, sin embargo, también reporta que la producción de ortofosfatos fue mayor que la fijación del mismo. La variación de la concentración de ortofosfatos en el tiempo, a diferentes concentraciones iniciales de nutrientes se ve representada en la Figura 19.

Figura 18. Perfil de concentración de ortofosfatos a diferentes concentraciones iniciales de nutrientes



Fuente: Los autores

Se puede observar que el comportamiento de las concentraciones de ortofosfatos en el cultivo son similares, la reducción en la concentración de ortofosfatos muestran un tendencia gradual, y con el resultado estadístico ANOVA se demuestra que la variación de la concentración de nutrientes presenta significancia ($p < 0.05$). Lau et al., (1995) reporta un comportamiento similar al presentado en esta investigación, con el uso de cultivos de *Chlorella vulgaris* para el tratamiento de aguas residuales municipales. En algunos casos los factores como el pH excesivamente alto o bajo, o la ausencia de iones de potasio, sodio o magnesio pueden llegar a ralentizar la obtención de ortofosfatos por parte de las microalgas (MALGAS, 2013). Serrano (2015) presentó remoción de ortofosfatos, pero debido a la saturación de las microalgas, se registró un aumento en la concentración de ortofosfatos. La concentración de ortofosfatos durante el estudio presentó una buena significancia ($P \leq 0,05$) con respecto a la concentración inicial de nitrógeno, obteniendo una buena remoción por parte de las microalgas.

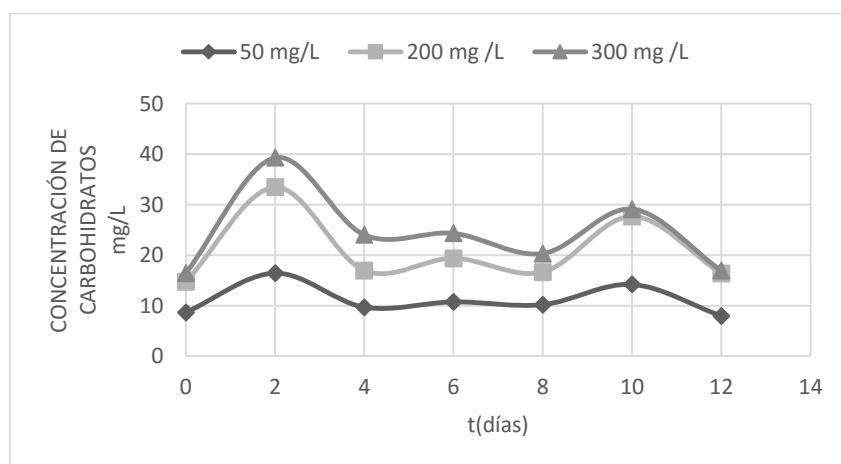
5.5 PRODUCCIÓN DE METABOLITOS DE VALOR AGREGADO

Las microalgas son organismos autótrofos unicelulares, coloniales y filamentosos que habitan diversos ambientes acuáticos en todas las latitudes y ecosistemas del planeta. Son fuentes de biomoléculas y metabolitos de gran importancia económica y constituyen una fuente directa de alimento, medicamentos, forraje, fertilizantes y combustible, e incluso, como indicadores de contaminación (Liang et. al, 2004).

5.5.1 Producción de Carbohidratos

La limitación de elementos importantes para el metabolismo de las microalgas, como el nitrógeno y el fósforo generan un aumento en la concentración de carbohidratos en la biomasa algal (Hirano et. al, 1997). En la Figura 20, se evidencia la producción de carbohidratos en el cultivo, a través del tiempo, a diferentes concentraciones iniciales de biomasa. El comportamiento que se presentó a través de las pruebas, ratifica lo dicho por el autor debido a que en la de mayor concentración inicial de biomasa (300 mg/L) se logró la mayor producción de carbohidratos (19,93 mg/L), y siendo la de menor concentración inicial de biomasa (50 mg/L) la de menor producción de carbohidratos (7,95 mg/L).

Figura 19. Perfil de carbohidratos a diferentes concentraciones iniciales de biomasa

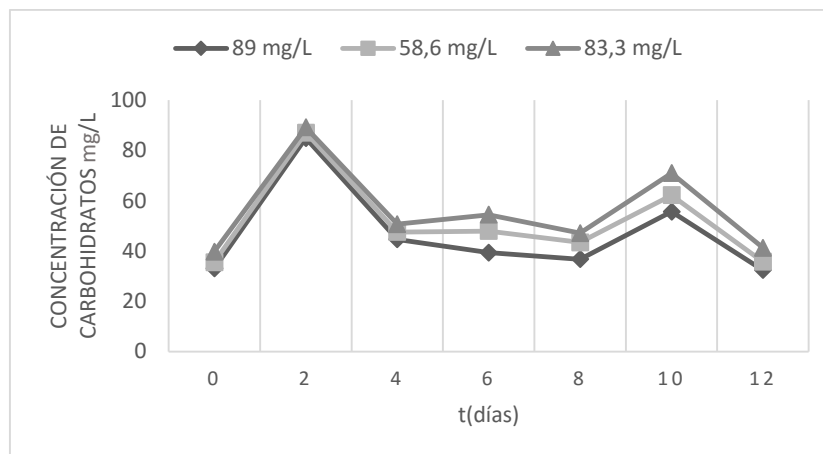


Fuente: Los autores

La producción de carbohidratos está directamente relacionada con la concentración inicial de biomasa, la concentración inicial de nutrientes y la interacción biomasa*nutrientes con una significancia ($p < 0,05$), corroborando lo dicho por Barsanti (2006) y Hirano et al. (1997), quienes afirmaron que bajas concentraciones de nutrientes, generan un incremento en la producción de carbohidratos.

En la Figura 21, se muestra el comportamiento de la concentración de carbohidratos en el tiempo teniendo en cuenta las concentraciones iniciales de nutrientes. Se puede observar que al presentarse escases de nutrientes la producción de carbohidratos disminuye, este comportamiento es contrario al presentado por Serrano (2015), quien obtuvo un crecimiento constante en la producción de carbohidratos. En la figura también se refleja que no hay una tendencia de crecimiento constante. Esto podría deberse al no tener una relación de N:P necesaria para la buena producción de los carbohidratos, diversos autores han concluido que la relación N:P en el medio de cultivo influye en la toma de nutrientes por parte de las microalgas, de modo que entre más alto este la relación N:P, mayor crecimiento y toma de nutrientes tendrá, así mismo su producción de carbohidratos se verá afectada positivamente. La producción de carbohidratos también se puede ver afectada por la cantidad de CO_2 disponible (MALGAS, 2013).

Figura 20. Perfil del carbohidrato a diferentes concentraciones iniciales de nutrientes.



Fuente: Los autores

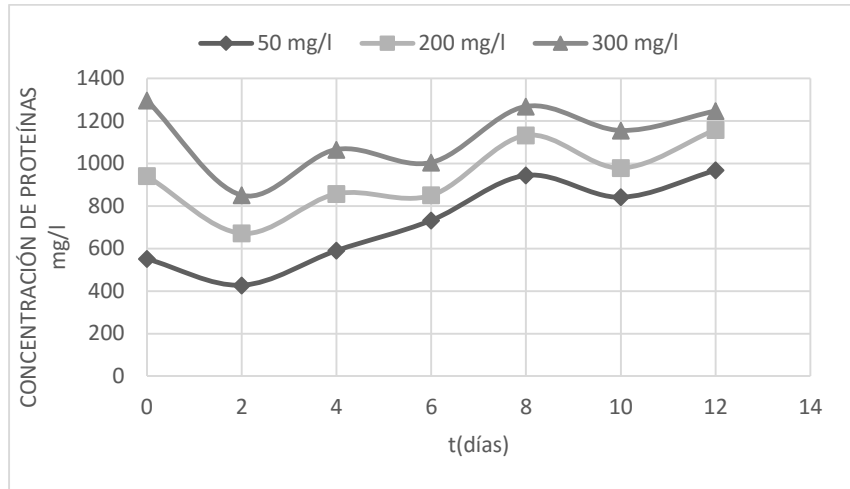
La producción de carbohidratos en los 3 primeros días es muy similar en todas las pruebas, a pesar de que las concentraciones de fósforo en forma de ortofosfatos ($P-PO_4^{-3}$) son diferentes (89 mg/L, 58,6 mg/L, 83,4 mg/L) y las concentraciones de nitrógeno en forma de amonio (NH_4^+) son muy parecidas (116,9 mg/L, 105,3 mg/L, 107,3 mg/L), lo cual contradice lo propuesto por otros autores donde se sostiene que la limitación de los nutrientes determina la composición de las microalgas. Siendo así, se esperaba que con la menor concentración inicial de ortofosfatos 58,6 mg/L se produjera la mayor concentración de carbohidratos, situación que no se presenta debido a que su producción final fue de 3,33 mg/L, inferior a las presentadas por los demás concentraciones iniciales de ortofosfatos, donde su producción final fue de (5,51 mg/L, 32,39 mg/L) respectivamente y está relacionada con la concentración de nutrientes inicial.

5.5.2 Producción de Proteínas

Las microalgas poseen concentraciones de nutrientes poco comunes, las cuales son superiores a las observadas en cualquier especie de planta superior. El contenido en proteína de algunas algas es el 65% en base seca de la biomasa algal, superior al de otros alimentos naturales (Pervushkin et. al, 2001). La *Chlorella vulgaris* es particularmente reconocida por la producción de proteínas, vitaminas y ácidos grasos. En la Figura 22, se presenta el comportamiento de la

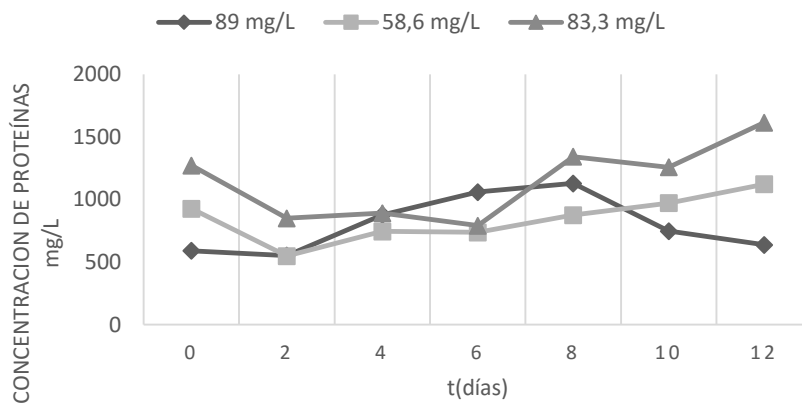
concentración de proteínas en el cultivo a diferentes concentraciones de biomasa inicial y en la Figura 23, la producción de proteínas en el cultivo a diferentes concentraciones iniciales de ortofosfatos.

Figura 21. Perfil de las proteínas a diferentes concentraciones iniciales de biomasa



Fuente: Los autores

Figura 22. Perfil de las proteínas a diferentes concentraciones iniciales de nutrientes



Fuente: Los autores

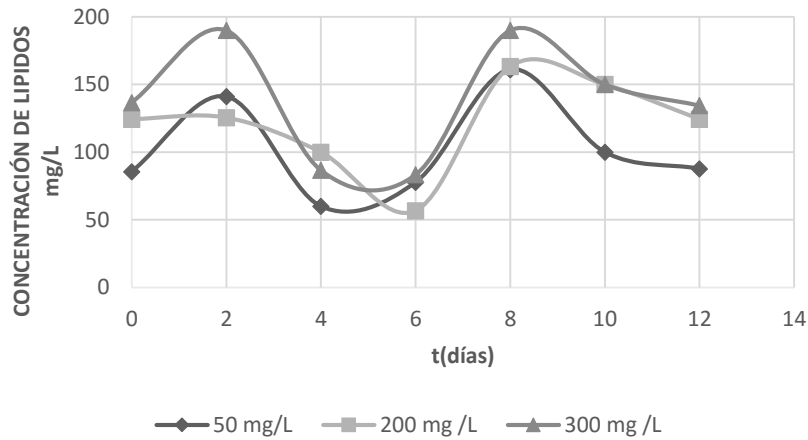
Según la prueba estadística ANOVA se mostró una significancia ($p < 0.05$) en la concentración inicial de nutrientes y en la concentración inicial de biomasa, mas

no fue significativo la interacción biomasa-nutrientes. La concentración de proteínas aumento en todos los casos, pero fue de manera significativa en la de menor concentración inicial de biomasa (50 mg/l), empezando con una concentración inicial de 551,20 mg/L y logrando una concentración final de proteínas de 967,89 mg/l. A pesar que en las otras concentraciones de biomasa (200 mg/l, 300 mg/l) se logran concentraciones finales mayores a la presentada anteriormente (1158,17 mg/L, 1246,13 mg/l), el comportamiento a través de la prueba refleja que su producción fue inferior, debido a que su concentración inicial de biomasa fue de (940,57 mg/L, 1296,14 mg/l) respectivamente. Estos resultados corroboran los resultados presentados por Serrano (2015), donde la mayor producción de proteínas se evidenció en la prueba con menor concentración de biomasa inicial. Lo anterior se debe a la disponibilidad de nitrógeno en los medios de cultivo, ya que si el suministro de nitrógeno no es suficiente no se pueden formar suficientes proteínas para mantener los niveles óptimos de crecimiento (L. González, 2010), siendo una relación directamente proporcional, a mayor cantidad de nitrógeno, mayor la producción de proteínas, tal como lo corrobora Beuckels et al., (2015), quienes afirman que la concentración de nutrientes en el cultivo determina la síntesis de proteínas

5.5.3 Producción de Lípidos

El uso de microalgas para la producción de biodiesel ha surgido como una opción promisoría, debido a que presentan mayor eficiencia fotosintética, son más eficaces en la asimilación de CO₂ y otros nutrientes con respecto a las plantas y acumulan entre 20 y 80% de triglicéridos (Chisti, 2008). En la Figura 24 se muestra la producción de lípidos a través del tiempo a diferentes concentraciones iniciales de biomasa.

Figura 23. Perfil del lípido a diferentes concentraciones iniciales de biomasa



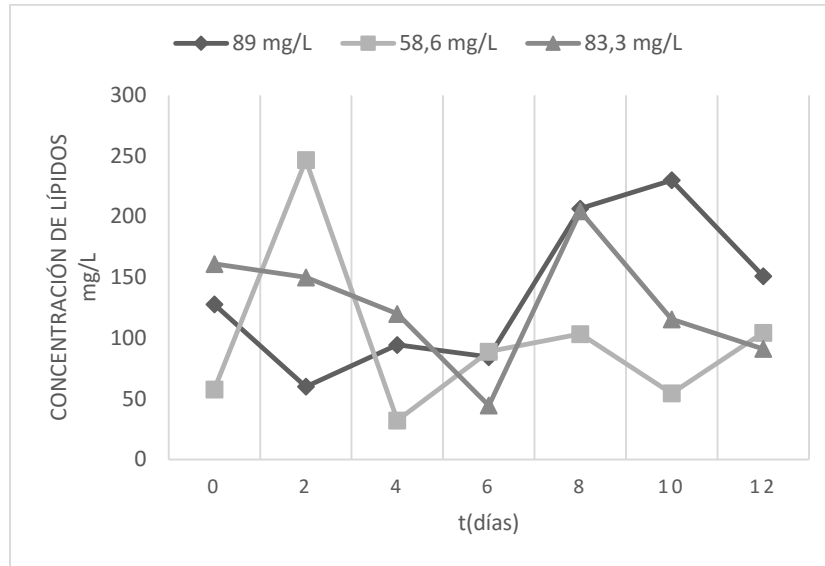
Fuente: Los autores

Los valores de concentración de lípidos presentaron una amplia variación, sin embargo, en las pruebas con mayor concentración de biomasa algal, 200 mg/L y 300mg/L, su comportamiento fue bastante similar, siendo estas las que lograron la mayor producción de lípidos con concentraciones finales de 124,44 mg/l y 134,44 mg/l esto, se debe principalmente a la limitación de nitrógeno y fósforo, que incrementan el contenido lipídico en las microalgas (Beer et. al, 2009). Aunque también la composición del medio de cultivo y las condiciones de crecimiento de microalgas tienen un efecto importante en el rendimiento de biomasa y en el contenido de lípidos (Christenson & Sims, 2011).,

En la Figura 25, se presenta el comportamiento de la concentración de lípidos en el cultivo a diferentes concentraciones iniciales de ortofosfatos. A todos los valores se les aplicó el análisis de varianza para determinar la relación entre la concentración de biomasa, nutrientes y biomasa*nutrientes encontrándose que no hay relación significativa ($p < 0.05$), lo cual contradice lo dicho por Heredia-Arroyo (2010), donde afirma que en especies de *Chlorella sp*, cuando se cultivan en un medio pobre en nitrógeno, pero con suficiente luz y/o fuentes orgánicas de

carbono, acumulan lípidos o almidón. Esta contradicción puede presentarse por el uso de la técnica usada de Bligh and Dyer (1959), la cual no permite un grado de precisión alto a la hora de obtener los resultados.

Figura 24. Perfil de lípidos a diferentes concentraciones iniciales de nutrientes

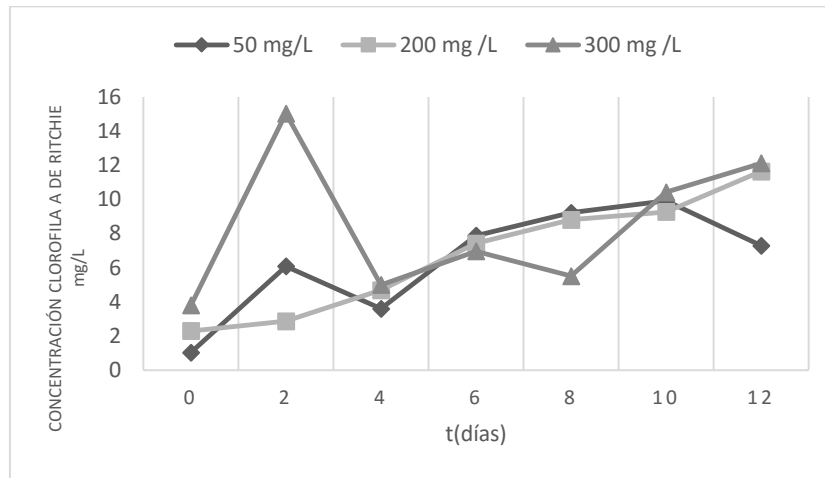


Fuente: Los autores

5.5.4 Producción de Clorofila a y b

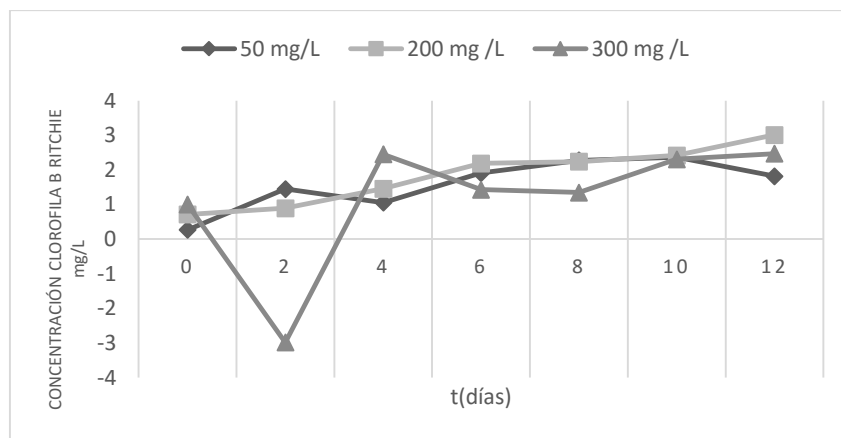
La producción de clorofila en microalgas está relacionada con una baja intensidad luminosa, efecto de ensombrecimiento a elevadas densidades celulares, suficiencia de fuentes nitrogenadas, magnesio y mixotrofia en cultivos discontinuos (Otero, 1995). Según la prueba estadística ANOVA tanto para la clorofila a y b, se mostró una significancia ($p < 0.05$) en la concentración inicial de biomasa, siendo este el factor que se modificó en la producción de clorofila, debido a que la irradiancia se mantuvo constante en el estudio. En las Figuras 26 y 27, se puede observar el comportamiento de la concentración de la clorofila a y b en el cultivo a través del tiempo a diferentes concentraciones de biomasa.

Figura 25. Perfil de clorofila a para diferentes concentraciones iniciales de biomasa



Fuente: Los autores

Figura 26. Perfil de clorofila b a diferentes concentraciones iniciales de biomasa



Fuente: Los autores

La clorofila a es el pigmento fotosintético primario, que a nivel de cloroplastos se encuentran presentes para el proceso de fotosíntesis (Camacho et. al, 1989), por tal razón, las magnitudes de concentración de clorofila a son mayores que en las de clorofila b. (Lichtenthaler & Babani, 2004).

Para cuantificar la clorofila, se reportan en la literatura diferentes solventes (acetona, metanol, etanol, entre otros) y procedimientos de extracción (maceración, sonicación, calentamiento y congelamiento). Algunas revisiones detalladas analizan los inconvenientes que ofrecen estos procedimientos en la exactitud de la cuantificación de la clorofila (Rowan, 1989). Dentro de los procedimientos más discutidos que pretenden determinar con mayor exactitud la cuantificación de clorofila-a, está la estimación de sus derivados mediante la acidificación de la muestra. En la práctica, este procedimiento conduce en muchas ocasiones, a la obtención de valores negativos de clorofila-a (Bührer, 1991).

A su vez se ha cuestionado el uso de ecuaciones y procedimientos que no requieren de acidificación, como la fórmula tricromática de Jeffrey y Humprey (APHA, 1998), por no considerar los derivados de la clorofila (feofitinas y feoforbidos).

Según los resultados arrojados por ANOVA tanto en la clorofila a como en la clorofila b, fue significativo el factor de concentración inicial de biomasa ($p < 0,05$), este factor es de vital importancia debido a que está ligado con la actividad fotosintética (McGriff, 1972), sin embargo, la concentración de nutrientes iniciales y la relación entre biomasa*nutrientes no fue significativa, contradiciendo lo reportado por los autores quienes sostienen que las microalgas que tienen mayor disponibilidad de nutrientes, tienden a aumentar el número de su colonia más fácilmente, por ende habrá mayor producción de clorofila.

6. CONCLUSIONES

Se determinó el efecto de la concentración inicial de biomasa para la eliminación de nutrientes en el agua residual. Se obtuvo un porcentaje de remoción de nitrógeno de $83.3 \pm 10.2\%$ para la concentración inicial de 300 mg/L de biomasa, aunque todos los valores fueron superiores al 73%. Por otra parte, el porcentaje de remoción de ortofosfatos fue de $62.2 \pm 6.4\%$ para la concentración inicial de 50 mg/L de biomasa y los demás valores fueron superiores al 47%. El crecimiento microalgal respecto a la concentración inicial de biomasa es inversamente proporcional, ya que la concentración inicial de 50 mg/L presentó un tiempo de generación promedio mayor que para las concentraciones iniciales de 200 mg/L y 300 mg/L de biomasa.

Teniendo en cuenta la concentración inicial de nutrientes sobre la remoción de estos, los resultados indican que el cultivo de microalgas nativas fue eficiente en la remoción de nitrógeno, alcanzando una eficiencia de un $87.3 \pm 5.7 \%$ para la concentración inicial de 58,6 mg/L de ortofosfatos. Sin embargo, el porcentaje de remoción de ortofosfatos fue menor, obteniendo un valor $59.9 \pm 19.0\%$ para la concentración inicial de ortofosfatos de 89,0 mg/L. La concentración inicial de nutrientes presentó una influencia positiva en el crecimiento de las microalgas, siendo la concentración de biomasa de mejor comportamiento en la correspondiente a la concentración inicial de 83,3 mg/L de ortofosfatos.

El cultivo de microalgas nativas mostró un crecimiento significativo en el agua residual, debido a la interacción de la concentración inicial de biomasa y la concentración inicial de nutrientes.

Se logró producción de metabolitos de valor agregado como proteínas y clorofila, las cuales, mostraron una tendencia al aumento con el tiempo. No obstante, los carbohidratos y lípidos no mostraron una buena tendencia de crecimiento de sus concentraciones.

El uso de microalgas provenientes del sistema de tratamiento de aguas residuales es una buena alternativa para la biorremediación del agua residual, teniendo en cuenta que las microalgas se encuentran adaptadas a las concentraciones de nutrientes y otras sustancias presentes en el agua residual.

7. RECOMENDACIONES

Llevar un mejor control de la inyección de aire al sistema, debido a se pueden producir cambios en el pH del medio y presentarse transformaciones del amonio en los biorreactores a amonio libre, produciendo perdidas en el biorreactor.

Realizar un control sobre el tamaño de las burbujas, debido a que el tamaño de estas puede afectar las células de las microalgas.

Evaluar el efecto de la remoción de nutrientes con microalgas sobre los parámetros fisicoquímicos, tales como DQO y DBO, para conocer el comportamiento del oxígeno en el transcurso del estudio.

Tener en cuenta la relación de C:N:P óptima, con el fin de llevar a cabo un mayor control en la producción de metabolitos de valor agregado.

Estudiar la posibilidad de llevar el proyecto a escala piloto para evaluar el comportamiento de las microalgas a concentraciones mayores de nutrientes.

Considerar la biorremediación del agua residual con el uso de microalgas, con el fin de estudiar su factibilidad para la producción de biocombustibles.

BIBLIOGRAFÍA

- Abalde, J. . (1995). *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones*. Laboratorio de Microbiología.
- Acurio, S., & Archiniegas, K. (2015). *EVALUACIÓN DE LA REMOCIÓN DE NITRITOS Y NITRATOS EN MUESTRAS DE AGUA DEL RÍO SAN PEDRO CANTÓN RUMIÑAHUI POR MICROALGAS CLOROFITAS*. Universidad Politécnica Salesina sede Quito.
- Andrade, C., Chacón, C., Cárdenas, C., & Avendaño, M. (2006). Remoción de nitrógeno y fósforo de aguas residuales urbanas por la microalga *Chlorella sp* . en condiciones de laboratorio Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater for the microalgae *Chorella sp* . in conditions laboratory, 14(March), 56–63.
- APHA, A. P. (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. (A. P. Association, Ed.) (21Th Editi). Washington.
- Arias, A. (2004). *Manual de laboratorio de ingeniería ambiental*. Universidad de Costa Rica.
- Arredondo, B. O., & Vázquez-Duhalt, R. (1991). *Aplicaciones Biotecnológicas en el Cultivo de Microalgas*. Ciencia y Desarrollo.
- Aslan, S., & Kapdan, I. K. (2006). Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering*, 28(1), 64–70. <http://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2006.04.003>
- Avila, J. G. (2015). *Nitrate and phosphate removal from free and immobilized microalgae from wastewaters for Biological Terciary Treatment (Thesis)*, (MAY 2015), 0–90.
- Azcon, J., & Talon, M. (1993). *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. *McGraw Hill-Intramericada*.

- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2006). *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology. The Quarterly Review of Biology* (Vol. 81). <http://doi.org/10.1086/511594>
- Beer, L. L., Boyd, E. S., Peters, J. W., & Posewitz, M. C. (2009). Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(3), 264–271. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.06.002>
- Bellin, V. L. (2011). Cultivo de Microalgas em Fotobiorreactores. Retrieved from http://microalgasprofessoravera.blogspot.com.co/2011_01_01_archive.html
- Benavente, I., Montañez, J. C., Aguilar, C. N., Méndez, A., & Valdivia, B. (2012). Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores. *Revista Científica de La Universidad Autónoma de Coahuila*, 4(7), 1–12.
- Bermero Castillo, L. E., & Vargas Machuca, J. A. (2011). Estudio Del Cosechado De Cultivos De Microalgas En Agua Residual Mediante Técnicas De Centrifugado, 54.
- Beuckels, A., Smolders, E., & Muylaert, K. (2015). Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. *Water Research*, 77, 98–106. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2015.03.018>
- Bischoff, H. W., & Bold, H. C. (1963). *Phycological studies. IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species*. Texas.
- BLIGH, E. G., & DVER, W. J. (1959). *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37.
- Bohne, F. A. (2002). Regulation of carotenoid biosynthesis genes in response to light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 26–34.
- Borowitzka, M. A., & Mohemani, N. (2012). *Algae for Biofuels and Energy*.
- Bührer, H. (1991). Problems in Estimation of Pheophytine. *Verh Internat Verein Limnol*, 24, 12–59.

- Caldwell, J. S. (1940). Three new species of Psyllidae with notes on others. *Journal of Science*, 40, 49–50.
- Camacho, F., Martínez, M., & Sanchez, S. (1989). *Contenido de clorofila en chlorella pyrenoidosa durante el crecimiento heterotrófico sobre monosacáridos*. Universidad de Granada.
- Cárdenas, G., & Sánchez, I. (2013). Nitrógeno en aguas residuales: orígenes, efectos y mecanismos de remoción para preservar el ambiente y la salud pública.
- Cerniglia, C. E., Gibson, D. T., & Van Baalen, C. (1979). Oxidation of Naphthalene by Cyanobacteria and Microalgae. *Microbiology*, 116(2), 495–500. <http://doi.org/10.1099/00221287-116-2-495>
- Chernicharo, C. A. (1997). *Principios do tratamento biológico de águas residuarias: Reactores anaerobios*. (Vol. 5). Brasil: Editorial SEGRAC.
- Chisti, Y. (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, 26(3), 126–131. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.12.002>
- Choi, H. J., & Lee, S. M. (2012). Effects of microalgae on the removal of nutrients from wastewater: Various concentrations of *Chlorella vulgaris*. *Environmental Engineering Research*, 17(S1), 3–8. <http://doi.org/10.4491/eer.2012.17.S1.S3>
- Christenson, L., & Sims, R. (2011). Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advances*, 29(6), 686–702. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.015>
- Claros Bedoya, J. A. (2012). Estudio del proceso de nitrificación y desnitrificación vía nitrito para el tratamiento biológico de corrientes de agua residual con alta carga de nitrógeno amoniacal, 230.
- Cubas, P. (2008). Bacillaryophyta (Diatomeas), 1–3.
- Cuervo, F. H. (1988). Generalidades sobre tratamiento anaerobio de aguas

residuales. Manual de Curso “Tratamiento Anaeróbico de Aguas Residuales. Microbiología y Bioquímica”. Medellín. Medellín, Colombia.

D’Andrea, A. L. (2006). Biodiesel a partir de aceite de microalgas. Retrieved from <http://lasmicroalgas.blogspot.com.co/2008/07/biodisel-base-de-microalgas.html>

De-Bashan, L. E., Moreno, M., Hernandez, J.-P., & Bashan, Y. (2002). Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*, 36, 2941–2948.

Des Abbayes, H., Chadefaud, M., Feldmandd, J., Deferre, Y., Gaussen, H., Grasse, P. P., & Prevot, A. R. (1989). *Botánica Vegetales inferiores* (Editorial). Barcelona.

Fábregas, J., Domínguez, A., García Álvarez, D., Lamela, T., & Otero, A. (1998). Induction of astaxanthin accumulation by nitrogen and magnesium deficiencies in *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Letters*, 20(6), 623–626. <http://doi.org/10.1023/A:1005322416796>

Fábregas, J., Patiño, M., Morales, E. D., Cordero, B., & Otero, A. (1996). Optimal renewal rate and nutrient concentration for the production of the marine microalga *Phaeodactylum tricomutum* in semicontinuous cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(1), 266–268.

Ferruzzi, M. G., & Blakeslee, J. (2007). Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. *Nutrition Research*, 27(1), 1–12. <http://doi.org/10.1016/j.nutres.2006.12.003>

Garibay-Hernández, a. (2009). Biodiesel a partir de microalgas. *BioTecnología*, 13(3), 38–61. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Biodiesel+a+Partir+de+Microalgas#0>
<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Sear>

ch&q=intitle:Biodiesel+a+partir+de+microalgas#0

González, L. (2010). *Influencia de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en las interacciones competitivas entre Chlorella vulgaris y Scenedesmus acutus*. Universidad Nacional de Colombia.

González, L. E., Cañizares, R. O., & Baena, S. (1997). Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresource Technology*, 60(3), 259–262. [http://doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)00029-1](http://doi.org/10.1016/S0960-8524(97)00029-1)

Gouveia, L., Batista, A. P., Sousa, I., Raymundo, A., & Bandarra, N. M. (2008). *Microalgae in Novel Food Product*. *Food Chemistry Research Developments*.

HANNA, I. (2008). Hoja de seguridad HI93715A-0 / HI93715B-0.

Heredia-Arroyo, T., Wei, W., & Hu, B. (2010). Oil Accumulation via Heterotrophic/Mixotrophic *Chlorella protothecoides*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(7), 1978–1995. <http://doi.org/10.1007/s12010-010-8974-4>

Hernández-Reyes, B. M., Rodríguez-Palacio, M. C., Lozano-Ramírez, C., & Castilla-Hernández, P. (2012). Remoción de nutrientes por tres cultivos de microalgas libres e inmovilizados. ... *Ambiental Y Algal*, 3(1), 80–94. Retrieved from http://www3.inecol.edu.mx/solabiaa/ARCHIVOS/documentos/relbaa/RELBA_-_V3N1.pdf#page=85

Hirano, A., Ueda, R., Hirayama, S., & Ogushi, Y. (1997). CO₂ fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation. *Energy*, 22(2-3), 137–142. [http://doi.org/10.1016/S0360-5442\(96\)00123-5](http://doi.org/10.1016/S0360-5442(96)00123-5)

Ho, S., Chen, C., Lee, D., & Chang, J. (2011). Perspectives on microalgal CO₂ - emission mitigation systems — A review. *Biotechnology Advances*, 29(2), 189–198. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.11.001>

- Hoffman, J. P. (1998). Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae. *Journal of Phycology*.
- Infante, C., Angulo, E., Zárate, A., Florez, J. Z., Barrios, F., & Zapata, C. (2012). *Chlorella* sp ., 3(2), 159–164.
- Infante, C., León, I., Florez, J., Zárate, A., Barrios, F., & Zapata, C. (2013). Removal of ammonium and phosphate ions from wastewater samples by immobilized *Chlorella* sp. *International Journal of Environmental Studies*, 70(1), 1–7. <http://doi.org/10.1080/00207233.2012.742643>
- Jaiswal, P., & Kashyap, A. K. (2002). Isolation and characterization of mutants of two diazotrophic cyanobacteria tolerant to high concentrations of inorganic carbon. *Microbiological Research*, 157(2), 83–91. <http://doi.org/10.1078/0944-5013-00136>
- Janssen, M., Janssen, M., De Winter, M., Tramper, J., Mur, L. R., Snel, J., & Wijffels, R. H. (2000). Efficiency of light utilization of *Chlamydomonas reinhardtii* under medium-duration light/dark cycles. *Journal of Biotechnology*, 78(2), 123–137. [http://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00233-3](http://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00233-3)
- Jeanfils, J., & Thomas, D. (1986). Culture and nitrite uptake in immobilized *Scenedesmus obliquus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24(5), 417–422. <http://doi.org/10.1007/BF00294600>
- Ji, M., Abou-shanab, R. a I., Hwang, J., Timmes, T. C., Kim, H., Ph, D., ... Jeon, B. (2013). Removal of Nitrogen and Phosphorus from Piggery Wastewater Effluent Using the Green Microalga *Scenedesmus obliquus*, (September), 1198–1205. [http://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0000726](http://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000726).
- Kastánek, F., Sabata, S., Solcová, O., Maléterová, Y., Kastánek, P., Brányiková, I., ... V., Z. (2010). In-field experimental verification of cultivation of microalgae *Chlorella* sp . using the flue gas from a cogeneration unit as a source of carbon dioxide In-field experimental verification of cultivation of microalgae

Chlorella sp . using the flue gas from, (May).
<http://doi.org/10.1177/0734242X10375866>

Kochert, A. G. (1978). Carbohydrate determination by the phenol–sulfuric acid method. In: Hellebust JA, Craigie JS (eds), Handbook of Phycological Methods: Physiological and Biochemical Methods. *Cambridge University Press*, 95–97.

Lau, P. S., Tam, N. F. Y., & Wong, Y. S. (1995). Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater. *Environmental Pollution*, 89(1), 59–66. [http://doi.org/10.1016/0269-7491\(94\)00044-E](http://doi.org/10.1016/0269-7491(94)00044-E)

Leal, S., Alejandra-medina, M., Alejandro-guerrero, M., Piña, P., & Nieves, M. (2013). CONCENTRACIÓN Y COMPOSICIONES ORGÁNICA Y PROXIMAL DE DOS ESPECIES DE DIATOMEAS BENTÓNICAS A DIFERENTES SALINIDADES Concentration and organic and proximate compositions of two benthic diatoms species at different salinities, 29(1), 45–52.

Liang, S., Liu, X., Chen, F., & Chen, Z. (2004). Asian Pacific Phycology in the 21st Century: Prospects and Challenges: Proceeding of The Second Asian Pacific Phycological Forum, held in Hong Kong, China, 21--25 June 1999. In P. O. Ang (Ed.), (pp. 45–48). Dordrecht: Springer Netherlands. http://doi.org/10.1007/978-94-007-0944-7_7

Lichtenthaler, H. K., & Babani, F. (2004). Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis. In G. C. Papageorgiou & Govindjee (Eds.), (pp. 713–736). Dordrecht: Springer Netherlands. http://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_28

Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, L., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *Readings*, 193(1), 265–275. [http://doi.org/10.1016/0304-3894\(92\)87011-4](http://doi.org/10.1016/0304-3894(92)87011-4)

Luna, L. G., Álvarez, I., & Rivero, R. (2011). Cultivo de chlorella vulgaris sobre

- residual de soja con la aplicación de un campo magnético. *Rev. Colomb. Biotecnol*, 13(2), 27–38. Retrieved from <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/viewFile/27912/28654>
- MALGAS. (2013). *Aplicaciones de las microalgas: estado de la técnica*. Gijón, Asturias. Retrieved from <http://www.ast-ingenieria.com/guia-malgas-1>
- Martin, C., de la Noüe, J., & Picard, G. (1985). Intensive cultivation of freshwater microalgae on aerated pig manure. *Biomass*, 7(4), 245–259. [http://doi.org/10.1016/0144-4565\(85\)90064-2](http://doi.org/10.1016/0144-4565(85)90064-2)
- Martin, F. P. H. (2010). Optimization of photobioreactor for astaxanthin production in CHLORELLA ZOFINGIENSIS, 120.
- Martinez, L. (2008). Eliminación de CO₂ con microalgas autóctonas. León: Universidad de León.
- Melgarejo, L. M. (2010). Experimentos en Fisiología Vegetal, 249.
- Molina Grima, E., Acien Fernández, F. G., García Camacho, F., & Chisti, Y. (1999). Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *Progress in Industrial Microbiology*, 35(C), 231–247. [http://doi.org/10.1016/S0079-6352\(99\)80118-0](http://doi.org/10.1016/S0079-6352(99)80118-0)
- Moronta, R., Mora, R., & Morales¹, E. (n.d.). Respuesta de la microalga Chlorella sorokiniana al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. *Revista de La Facultad de Agronomía*, 23(1), 28–43. Retrieved from http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182006000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Mosqueda-Cano, G., & Gutiérrez-Corona, J. F. (1995). Environmental and developmental regulation of carotenogenesis in the dimorphic fungus *Mucor rouxii*. *Current Microbiology*, 31(3), 141 – 145. <http://doi.org/10.1007/BF00293544>

- Noyola, A. (1989). Los procesos anaerobios en el tratamiento de aguas residuales. In *I Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Cafetalera*. Veracruz, México.
- Ono, E., & Cuello, J. L. (2003). Design parameters of solar concentrating systems for CO₂-mitigating algal photobioreactors. *Energy*, 29(9-10), 1651–1657. <http://doi.org/10.1016/j.energy.2004.03.067>
- Ortega, J., & Moronta, R. (2004). Influencia del acetato sobre el crecimiento y contenido de pigmentos de la microalga *Chlorella* sp . Influence of acetate and pigments content on growth of the microalga *Chlorella* sp ., 12(March), 25–31.
- Oswald, W. J., & Gotaas, H. B. (1852). Photosynthesis in Sewage Treatment. *American Society of Civil Engineers*, 2849, 73–105.
- Otero, A. (1995). *Modificación de la composición bioquímica de microalgas marinas en régimen de ciclostato*. Universidad de Santiago de Compostela.
- Park, J. B. K., Craggs, R. J., & Shilton, A. N. (2011). Recycling algae to improve species control and harvest efficiency from a high rate algal pond. *Water Research*, 45(20), 6637–6649. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2011.09.042>
- Parra, A. L. R., & Villanueva, R. O. C. (2012). Bioremediación de aguas con fosfatos y nitratos utilizando *Scenedesmus incrassatulus* inmovilizado. *Bistua: Revista de La Facultad de Ciencias Básicas*, 10(1), 71–79. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90326398006>
- Pelah, D., Sintov, A., & Cohen, E. (2004). The Effect of Salt Stress on the Production of Canthaxanthin and Astaxanthin by *Chlorella zofingiensis* Grown Under Limited Light Intensity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(5), 483 – 486. <http://doi.org/10.1023/B:WIBI.0000040398.93103.21>
- Pérez, A. del P. (2010). *Producción y Valorización de biomasa de microalga: un enfoque de biorrefinería*. (P. Ramos, Ed.). Salamanca: Aquilafuente.

- Pervushkin, S. V, Voronin, A. V, Kurkin, V. A., Sokhina, A. A., & Shatalaev, I. F. (2001). PROTEINS FROM *Spirulina platensis* BIOMASS. *Chemistry of Natural Compounds*, 37(5), 476–481. <http://doi.org/10.1023/A:1014435813520>
- Ramalho, R. S. (1996). Tratamiento de Aguas Residuales.
- Ramírez Mérida, L. G., Zepka, L. Q., & Jacob-Lopes, E. (2013). FOTOBIORREACTOR: HERRAMIENTA PARA CULTIVO DE CIANOBACTERIAS. (Spanish). *PHOTOBIOREACTOR: TOOL FOR MASS CULTIVATION OF CYANOBACTERIA*. (English), 6(2), 9–19. <http://doi.org/ISSN 1390-4043>
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., & Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, 88(10), 3411–3424. <http://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.11.025>
- Ritchie, R. J. (2008). Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica*, 46(1), 115–126. <http://doi.org/10.1007/s11099-008-0019-7>
- Round, F. E., Crawford, R. M., & Mann, D. G. (1990). *Diatoms, Biology and Morphology of the Genera*. Cambridge.
- Rowan, K. S. (1989). *Photosynthetic Pigments of Algae*. (P. S. of the U. of Cambridge, Ed.).
- Ruiz, A. (2011). Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. *Universidad Politécnica de Valencia*, 102.
- Ruiz-marín, A., Mendoza-espinosa, L. G., & Stephenson, T. (2010). Bioresource Technology Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource*

Technology, 101(1), 58–64. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.076>

Salisbury, F., & Ross, C. (1994). *Fisiología Vegetal*. México: Editorial Iberoamérica.

Sánchez, A. C. (1999). Comparative Evaluation of Compact Photobioreactors for Large-Scale Monoculture of Microalgae. *Jornual of Biotechnology*.

Santafé, J. V. (2015). Evaluación de las aguas residuales domésticas de la universidad autónoma de occidente como medio de cultivo natural para la Microalga Nativa Chlorella. Retrieved from <http://bdigital.uao.edu.co/handle/10614/7736>

Serrano, J. C. (2015). *EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE REMOCIÓN DE NUTRIENTES DE UN EFLUENTE ANAEROBIO MEDIANTE UNA CEPA DE Chlorella vulgaris*. Universidad Pontificia Bolivariana.

Skoda, B. (1992). Contributions to the biochemical taxonomy of the genus Chlorella Beijerinck sensu lato - pigment composition. I. Cultures growing under optimal conditions. *Algological Studies*, 63, 19–35.

Steinbrenner, J., & Linden, H. (2001). Regulation of Two Carotenoid Biosynthesis Genes Coding for Phytoene Synthase and Carotenoid Hydroxylase during Stress-Induced Astaxanthin Formation in the Green Alga Haematococcus pluvialis, 125(February), 810–817.

Sze, P. (1998). *A biology of the algae*. (WCB/McGraw-Hill, Ed.) (3rd ed.). Boston.

Tafur Alvarez, J. E., & Estrada Palencia, L. (2015). Tratamiento De Aguas Residuales in Vitro Por Medio De La Microalga Chlorella Sp En El Municipio De Barrancabermeja, Colombia. *Citecsa*, 6(10), 5–19. Retrieved from <http://www.unipaz.edu.co/ojs/index.php/revcitecsa/issue/view/18>

Tam, N. F. Y., & Wong, Y. S. (1996a). Effect of ammonia concentrations on growth of Chlorella vulgaris and nitrogen removal from media. *Bioresource*

- Technology*, 57(1), 45–50. [http://doi.org/10.1016/0960-8524\(96\)00045-4](http://doi.org/10.1016/0960-8524(96)00045-4)
- Tam, N. F. Y., & Wong, Y. S. (1996b). Effect of ammonia concentrations on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media. *Bioresource Technology*, 57(1), 45–50. [http://doi.org/10.1016/0960-8524\(96\)00045-4](http://doi.org/10.1016/0960-8524(96)00045-4)
- Tan, X. B., Zhang, Y. L., Yang, L. Bin, Chu, H. Q., & Guo, J. (2016). Outdoor cultures of *Chlorella pyrenoidosa* in the effluent of anaerobically digested activated sludge: The effects of pH and free ammonia. *Bioresource Technology*, 200, 606–615. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.095>
- Tormo, R. (2015). Plantas y Hongos. Retrieved from <http://www.plantasyhongos.es/referencias/autor.htm>
- Tredici, M. R., Carozzi, P., Chini Zittelli, G., & Materassi, R. (1991). A vertical alveolar panel (VAP) for outdoor mass cultivation of microalgae and cyanobacteria. *Bioresource Technology*, 38(2-3), 153–159.
- Van Beilen, J. B. (2009). Why microalgal biofuels won't save the internal combustion machine. *Bioproducts and Biorefining*, 4(1), 41–52.
- Van Haandel, A. C., & Lettinga, G. (1994). *Anaerobic sewage treatment: a practical guide for regions with a hot climate*.
- Vargas, L., Cárdenas, C., Hernández, M., Araujo, I., Yabroudi, S., López, F., ... Delgado, J. (1987). Efecto de las microalgas en la remoción de los compuestos nitrogenados presentes en la laguna facultativa de una planta de tratamiento de aguas residuales.
- Wang, C., Yu, X., Lv, H., & Yang, J. (2013). Nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater by the green alga *Chlorella* sp. *Journal of Environmental Biology*, 34(2), 421–425. Retrieved from http://apps.webofknowledge.com.proxy1.lib.uwo.ca/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=2ENDf4oyXGbdIU6Qr5K&page=28&doc=277&cacheurlFromRightClick=no

Wysor, B. (2009). Introducción a la Diversidad de Algas Marinas Verdes (en Panama), 114.

Zhang, E., Wang, B., Wang, Q., Zhang, S., & Zhao, B. (2008). Ammonia-nitrogen and orthophosphate removal by immobilized *Scenedesmus* sp. isolated from municipal wastewater for potential use in tertiary treatment. *Bioresource Technology*, 99(9), 3787–93. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.07.011>

ANEXOS

Anexos A. Resultado ANOVA para concentración biomasa a través de los días

VARIABLES	Crecimiento 1		Crecimiento 2		Crecimiento 3		Crecimiento 4		Crecimiento 5		Crecimiento 6		Crecimiento 7	
	Coef	SIGN	Coef	SIGN	Coef	SIGN	Coef	SIGN	Coef	SIGN	Coef	SIGN	Coef	SIGN
Modelo corregido	306040,230 ^a	0	381235,226 ^a	0	246526,473 ^a	0	176784,074 ^a	0	128309,837 ^a	0	104246,233 ^a	0	124984,109 ^a	0
Intersección	1084586,018	0	1091330,997	0	1481458,020	0	2054305,204	0	2420054,517	0	2955160,625	0	3744002,509	0
Biomasa	287125,001	0	355914,059	0	234631,905	0	171928,076	0	115097,764	0	89488,396	0	94654,771	0
Nutriente	18138,899	0	19632,949	0	10271,448	0	347,060	0,8	1458,296	0,5	1302,875	0,7	22108,023	0
Biomasa * Nutriente	776,331	0	5688,218	0	1623,120	0,4	4508,937	0,3	11753,776	0,1	13454,962	0,1	8221,315	0,6
Error	248,581		1890,103		6792,681		16568,328		18554,189		30445,138		53417,548	
Total	1390874,829		1474456,327		1734777,173		2247657,606		2566918,543		3089851,996		3922404,166	
Total corregido	306288,811		383125,330		253319,153		193352,402		146864,026		134691,371		178401,657	
R2 Ajustada	0,999		0,993		0,961		0,876		0,818		0,674		0,568	

Fuente: Los autores.

Anexos B. Resultados ANOVA de la concentración de nitrógeno a través de los días

VARIABLES	Nitrógeno 1		Nitrógeno 2		Nitrógeno 3		Nitrógeno 4		Nitrógeno 5		Nitrógeno 6		Nitrógeno 7	
	Coef.	SIGN	Coef	SIGN	Coef	SIGN	Coef	SIGN	Coef	SIGN	Coef	SIGN	Coef	SIGN
Modelo corregido	970,074 ^a	0	6494,074 ^a	0	3719,407 ^a	0,02	3522,963 ^a	0	4229,630 ^a	0,01	4392,000 ^a	0,01	4941,630 ^a	0
Intersección	325820,593	0	127995,5926	0	80142,259	0	48471,704	0	35570,370	0	26885,333	0	16035,704	0
Biomasa	186,962963	0,01	2417,851852	0,01	1021,407	0,05	880,296	0,03	670,519	0,14	1080,889	0,03	595,852	0,07
Nutriente	686,518519	0	3360,962963	0	2160,963	0	2288,296	0	3170,074	0	3051,556	0	4002,074	0
Biomasa * Nutriente	96,5925926	0,23	715,2592593	0,44	537,037	0,48	354,370	0,48	389,037	0,65	259,556	0,73	343,704	0,49
Error	277,333333		3267,333333		2657,333		1765,333		2768,000		2314,667		1746,667	
Total	327068		137757		86519,000		53760,000		42568,000		33592,000		22724,000	
Total corregido	1247,40741		9761,407407		6376,741		5288,296		6997,630		6706,667		6688,296	
R2 Ajustada	0,679		0,517		0,398		0,518		0,429		0,501		0,623	

Fuente: Los autores.

Anexos C. Resultados ANOVA de la concentración de ortofosfatos a través de los días

VARIABLES	Ortofosfatos 1		Ortofosfatos 2		Ortofosfatos 3		Ortofosfatos 4		Ortofosfatos 5		Ortofosfatos 6		Ortofosfatos 7	
	Coef	SIGN	Coef	SIGN	Coef	SIGN	Coef	SIGN	Coef	SIGN	Coef	SIGN	Coef	SIGN
Modelo corregido	24327,326 ^a	0	25854,957 ^a	0	20186,387 ^a	0	16890,924 ^a	0	13233,694 ^a	0	12976,826 ^a	0	7745,219 ^a	0
Intersección	160079,920	0	113168,110	0	95431,399	0	86121,834	0	66583,135	0	54816,391	0	34813,668	0
Biomasa	13295,368	0	15736,018	0	11414,754	0	10341,463	0	8875,106	0	7902,976	0	4559,537	0
Nutriente	4697,276	0	4619,542	0	3689,904	0	2669,796	0	1363,134	0	2337,021	0	956,108	0
Biomasa * Nutriente	6334,682	0	5499,397	0	5081,730	0	3879,665	0	2995,454	0	2736,828	0	2229,573	0
Error	191,150		135,574		297,947		134,328		190,689		283,544		817,711	
Total	184598,396		139158,641		115915,733		103147,086		80007,518		68076,762		43376,598	
Total corregido	24518,476		25990,531		20484,334		17025,252		13424,383		13260,370		8562,930	
R2 Ajustada	0,989		0,992		0,979		0,989		0,979		0,969		0,862	

Fuente: Los autores.

Anexos D. Resultados ANOVA de la concentración de nitratos a través de los días

VARIABLES	Nitrato 1		Nitrato 2		Nitrato 3		Nitrato 4		Nitrato 5		Nitrato 6		Nitrato 7	
	Coef	SIGN	Coef	SIGN	Coef	SIGN	Coef	SIGN	Coef	SIGN	Coef	SIGN	Coef	SIGN
Modelo corregido	2,491 ^a	0	1,409 ^a	0	2,912 ^a	0	3,972 ^a	0	4,248 ^a	0	5,391 ^a	0	6,732 ^a	0
Intersección	30,384	0	8,519	0	5,084	0	6,912	0	7,668	0	7,763	0	8,012	0
Biomasa	,718	0	,352	0	,577	0	,658	0	1,282	0	1,589	0	1,763	0
Nutriente	,989	0	,389	0	1,257	0	1,651	0	1,659	0	2,441	0	3,083	0
Biomasa * Nutriente	,784	0	,668	0	1,078	0	1,663	0	1,307	0	1,361	0	1,886	0
Error	,096		,014		,186		,253		1,329		1,328		2,029	
Total	32,971		9,942		8,181		11,137		13,246		14,482		16,773	
Total corregido	2,587		1,423		3,098		4,225		5,578		6,719		8,761	
R2 Ajustada	0,946		0,986		0,913		0,913		0,656		0,715		0,665	

Fuente: Los autores.

Anexos E. Resultados ANOVA de la concentración de proteínas a través de los días

VARIABLES	Proteína 1		Proteína 2		Proteína 3		Proteína 4		Proteína 5		Proteína 6		Proteína 7	
	Coef	SIGN	Coef	SIGN	Coef	SIGN	Coef	SIGN	Coef	SIGN	Coef	SIGN	Coef	SIGN
Modelo corregido	550565591,630 ^a	,000	142617548,074 ^a	,000	129341466,000 ^a	,000	90620878,667 ^a	,000	161310967,407 ^a	,000	167515514,963 ^a	,000	473232238,963 ^a	,000
Intersección	2331734509,037	,000	1140113088,926	,000	1893897376,333	,000	2006942945,333	,000	3353608515,5926	,000	2654989170,370	,000	3411497370,704	,000
Biomasa	249895254,741	,000	81247068,519	,000	102084267,556	,000	33427592,667	,000	47396457,852	,000	44293894,296	,001	36409121,407	,006
Nutriente	209287908,741	,000	53493383,630	,000	11596609,556	,110	53920600,222	,000	98248609,185	,000	117909349,852	,000	428996544,296	,000
Biomasa * Nutriente	91382428,148	,000	7877095,926	,001	15660588,889	,197	3272685,778	,622	15665900,370	,036	5312270,815	,617	7826573,259	,570
Error	34154473,333		5136790,000		41814960,667		22006624,000		21651418,000		35331352,667		46906483,333	
Total	2916454574,000		1287867427,000		2065053803,000		2119570448,000		3536570901		2857836038,000		3931636093,000	
Total corregido	584720064,963		147754338,074		171156426,667		112627502,667		182962385,407		202846867,630		520138722,296	
R2 Ajustada	0,916		0,95		0,647		0,718		0,829		0,748		0,87	

Fuente: Los autores.

Anexos F. Parámetros de control

Parámetros de control																					
# Muestra	0			2			4			6			8			10			12		
	OD	pH	Temp. °C	OD	pH	Temp. °C	OD	pH	Temp. °C	OD	pH	Temp. °C	OD	pH	Temp. °C	OD	pH	Temp. °C	OD	pH	Temp. °C
1	6,76	8,84	26,7	7,19	6,85	25,5	7,21	6,86	26,3	7,27	6,50	25,8	7,24	6,63	25,8	7,24	6,73	25,8	7,06	6,82	26,8
2	6,98	6,99	26,2	7,44	6,95	25,7	7,37	7,00	26,6	7,56	6,50	25,7	7,74	6,78	25,0	7,33	6,91	25,5	7,16	6,67	27,1
3	6,38	6,89	26,4	7,46	6,87	26,3	7,59	6,73	27,0	7,29	7,00	26,9	7,22	6,92	26,9	7,22	6,93	26,5	7,05	6,52	27,9
4	6,21	7,00	26,3	7,31	6,75	26,6	7,52	7,00	27,1	7,51	6,61	27,0	7,22	6,52	26,7	7,20	6,93	26,6	7,06	6,89	27,7
5	6,63	6,92	26,5	7,24	6,96	26,3	7,32	6,96	26,8	7,34	6,60	26,6	7,25	7,00	25,5	7,21	6,94	26,5	7,06	6,74	27,6
6	6,58	6,97	26,6	7,19	6,85	26,5	7,36	7,00	26,9	7,34	6,81	26,6	7,25	6,86	26,5	7,23	6,67	26,3	7,08	6,93	27,4
7	5,66	6,79	26,9	7,23	7,00	27,1	7,48	6,91	27,4	7,44	6,72	27,6	7,22	6,81	26,8	7,19	6,93	26,7	7,06	6,75	27,6
8	6,38	6,94	27,1	7,20	6,90	26,6	7,29	7,02	27,0	7,31	6,83	26,8	7,31	6,62	26,2	7,21	6,50	26,5	7,1	7	27,3
9	6,78	6,85	27,0	7,30	7,00	27,0	7,36	6,84	27,5	7,48	6,91	27,2	7,25	6,57	27,0	7,18	6,54	27,0	7,02	6,99	28
10	6,82	6,99	27,3	7,19	6,80	26,7	7,24	6,94	27,1	7,28	6,95	26,8	7,35	6,86	27,8	7,22	6,57	26,5	7,14	6,67	27,1

Fuente: Los autores.