

EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE REMOCIÓN DE NUTRIENTES DE UN
EFLUENTE ANAEROBIO MEDIANTE UNA CEPA DE *Chlorella vulgaris*

JUAN CARLOS SERRANO MALAGÓN

UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
SECCIONAL BUCARAMANGA
ESCUELA DE INGENIERIAS
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL

2015

EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE REMOCIÓN DE NUTRIENTES DE UN
EFLUENTE ANAEROBIO MEDIANTE UNA CEPA DE *Chlorella vulgaris*

JUAN CARLOS SERRANO MALAGÓN

Trabajo de grado como requisito para optar
al título de Ingeniera Ambiental

DIRECTORA:

Alexandra Cerón Vivas

Doctora en ingeniería

UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA

SECCIONAL BUCARAMANGA

ESCUELA DE INGENIERIAS

FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL

BUCARAMANGA

2015

Nota de aceptación

Presidente del Jurado

Jurado

Jurado

Bucaramanga, Octubre de 2015.

*Dedicada a Mariano y María
Antonia, mis padres amorosos
quienes nunca dejaron de creer
en mí, a mis hermanos Mariano,
Jorge, Emmanuel y Cristian,
quienes siempre supieron
aconsejarme y darme su amor
incondicional, a mi sobrino Juan
Pablo por cada sonrisa que
iluminó mi vida y para mi querida
tía Rosa, sin ella nunca habría
llegado a este lugar.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme en la vida todo y más de lo que siempre le pedí.

Agradezco enormemente mis padres por ser mi constante apoyo y nunca dejar de creer en mí, a mis hermanos por su acompañamiento en mi proceso estudiantil, su ejemplo y por ser mi más grande orgullo.

Agradezco muy especialmente a mi docente, Alexandra Cerón Vivas por guiarme durante todo el proceso de la realización del proyecto y por ayudarme a sortear tantos contratiempos.

Agradezco también mis compañeros de éste proyecto, quienes se volvieron amigos muy preciados: Sebastián, Yohana, Fernando, Paola y Leandro.

Agradezco a Ana María Álvarez, por tener tanta paciencia.

A Shirley por su ayuda, su amor, su apoyo cuando el mundo se veía más gris y por creer en mí y en todo lo que hago.

A Nathalia por ser mi más grande compañía en mi proceso universitario, por siempre tener una palabra cariñosa y una sonrisa.

A Ángela por sus constantes intentos de hacerme una mejor persona.

Por último a mis profesores, compañeros, amigos y a todas las personas que fueron partícipes en mi proceso educativo, a todos ellos, gracias.

CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	12
2	OBJETIVOS	15
	OBJETIVO GENERAL.....	15
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	MARCO TEÓRICO.....	16
3.1	ANTECEDENTES.....	16
3.2	MARCO CONTEXTUAL	17
3.3	TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.....	18
3.4	LAS MICROALGAS	24
3.5	FOTOSÍNTESIS	27
3.5.1	Reacciones de la fase lumínica.....	28
3.5.2	Reacciones de la fase oscura	30
3.6	MICROALGAS EN DEPURACIÓN DE AGUAS RESIDUALES.....	31
3.7	METABOLITOS DE VALOR AGREGADO.....	32
3.8	DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE CHLORELLA VULGARIS.....	34
3.9	PARÁMETROS DE INFLUYEN EN EL CRECIMIENTO ALGAL	35
3.9.1	Temperatura.....	36
3.9.2	Nutrientes.....	37
3.9.3	pH y Alcalinidad.....	39
3.9.4	Disponibilidad lumínica.....	40
3.10	SISTEMAS DE CULTIVO Y TIPOS DE FOTOBIOREACTORES	40
3.10.1	Sistemas de cultivo cerrados	42
4	METODOLOGÍA.....	46

4.1	DISEÑO Y MONTAJE DE UN MÓDULO DE CULTIVO TIPO BATCH	46
4.2	OBTENCIÓN DE MICROORGANISMOS	46
4.3	CULTIVO Y CONSERVACIÓN DEL INÓCULO	48
4.4	DISEÑO EXPERIMENTAL	48
4.5	MÉTODOS ANALÍTICOS	49
4.5.1	Determinación de biomasa en peso seco.	49
4.5.2	Determinación de la producción de clorofila.	50
4.5.3	Determinación de la producción de carbohidratos	50
4.5.4	Determinación de la producción de lípidos.	51
4.5.5	Determinación de nitrógeno	52
4.5.6	Determinación de ortofosfatos	52
4.5.7	Determinación de la producción de proteínas	53
4.5.8	Determinación de la concentración de nitratos	54
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
5.1	DISEÑO DE UN MÓDULO DE CULTIVO TIPO BATCH A ESCALA LABORATORIO	55
5.2	CRECIMIENTO DE LA BIOMASA	58
5.3	INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE BIOMASA EN LA REMOCIÓN DE NUTRIENTES	59
5.3.1	Influencia de la concentración inicial de biomasa en la remoción de nitrógeno.	62
5.3.2	Influencia de la concentración inicial de biomasa en la remoción de ortofosfatos.	63
5.4	INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE NITRÓGENO EN LA REMOCIÓN DE NUTRIENTES	64
5.4.1	Influencia de la concentración inicial de nutrientes en la remoción de nitrógeno	65
5.4.2	Influencia de la concentración inicial de nutrientes en la remoción de fósforo	68

5.4.3 Influencia de la concentración inicial de NH₃-N sobre la biomasa. biomasa algal dependiendo de la concentración inicial de nitrógeno amoniacal..

69

5.5	PRODUCCIÓN DE METABOLITOS DE VALOR AGREGADO	70
5.5.1	Producción de proteínas.	70
5.5.2	Producción de Lípidos.	72
5.5.3	Producción de carbohidratos.....	75
5.5.4	Producción de clorofila a y b.	77
6	CONCLUSIONES.....	79
7	RECOMENDACIONES	81
8	BIBLIOGRAFÍA	82
9	ANEXOS	i

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. SISTEMAS TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES EN COLOMBIA POR NIVEL DE TRATAMIENTO	17
TABLA 2. PRINCIPALES PROCESOS DE TRATAMIENTO BIOLÓGICO.....	20
TABLA 3. DIVISIONES PRINCIPALES DE LAS ALGAS DE AGUA DULCE: APARIENCIA MICROSCÓPICA	26
TABLA 4. CONTENIDO DE VITAMINAS EN EL ALGA MARINA WAKAME Y KOMBU EN 100 MG PESO SECO	34
TABLA 5. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS CULTIVOS ABIERTOS Y CERRADOS.....	41
TABLA 6. DESCRIPCIÓN DE LAS FASES DE CRECIMIENTO ALGAL EN UN CULTIVO TIPO BATCH...	45
TABLA 7. COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CRECIMIENTO BOLD BASAL (BB).	47
TABLA 8. TASAS DE CRECIMIENTO EN EL CULTIVO A DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES DE BIOMASA	61
TABLA 9. PORCENTAJE DE REMOCIÓN DE NH ₃ -N SEGÚN LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE BIOMASA	59
TABLA 10. PORCENTAJE DE REMOCIÓN DE ORTOFOSFATOS SEGÚN LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE BIOMASA	59
TABLA 11. RESULTADOS ANOVA DE LA CONCENTRACIÓN DE BIOMASA A TRAVÉS DE LOS DÍAS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
TABLA 12. RESULTADOS ANOVA DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO A TRAVÉS DE LOS DÍAS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
TABLA 13. RESULTADOS ANOVA DE LA CONCENTRACIÓN DE FÓSFORO A TRAVÉS DE LOS DÍAS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
TABLA 14. PORCENTAJE DE REMOCIÓN DE NH ₃ -N SEGÚN LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE NUTRIENTES.....	64
TABLA 15. PORCENTAJE DE REMOCIÓN DE P-PO ₄ SEGÚN LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE NUTRIENTES.....	65

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESQUEMA DE REACCIONES DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA DE MATERIALES POLIMÉRICOS. 1, BACTERIAS FERMENTATIVAS; 2, BACTERIAS ACETOGÉNICAS QUE PRODUCEN HIDRÓGENO; 3, BACTERIAS HOMOACETOGÉNICAS; 4, BACTERIAS METANOGÉNICAS HIDROGENOTRÓFICAS; 5, BACTERIAS METANOGÉNICAS ACETOCLÁSTICAS.....	22
FIGURA 2. ESQUEMA GRÁFICO DE LA MAQUINARIA DE LA FOTOSÍNTESIS.	27
FIGURA 3. CLOROFILA A, B Y BETA-CAROTENO	28
FIGURA 4. FOSFORILACIÓN	29
FIGURA 5. CICLO DE CALVIN-BENSON.....	30
FIGURA 6. CHLORELLA VULGARIS	35
FIGURA 7. CONSUMO DE DIÓXIDO DE CARBONO (MG/L*D) POR VARIAS ESPECIES DE MICROALGAS	39
FIGURA 8. ESQUEMA DE UN FOTOBIORREACTOR TUBULAR	43
FIGURA 9. ESQUEMA DE UN FOTOBIORREACTOR DE PANEL PLANO.....	43
FIGURA 10. A, CURVA DE CRECIMIENTO DE UNA POBLACIÓN ALGAL EN UN MEDIO DE CULTIVO; B-VARIACIÓN DE LA TASA DE CRECIMIENTO DEL MISMO.	45
FIGURA 11. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DEL MONTAJE EXPERIMENTAL PARA EL PRESENTE ESTUDIO	56
FIGURA 12. MONTAJE PRELIMINAR DEL SISTEMA DE ILUMINACIÓN	56
FIGURA 13. CONFIGURACIÓN FINAL DEL SISTEMA DE ILUMINACIÓN EN FUNCIONAMIENTO.	57
FIGURA 14. CURVA DE CRECIMIENTO EN PESO SECO VS ABSORBANCIA A 610 NM	58
FIGURA 15. COMPORTAMIENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE BIOMASA A DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES DE BIOMASA	60
FIGURA 16. CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO AMONIAICAL A DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES DE BIOMASA	62
FIGURA 17. CONCENTRACIÓN DE ORTOFOSFATOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES DE BIOMASA	64
FIGURA 18. CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO AMONIAICAL A DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES DE NITRÓGENO	66
FIGURA 19. CONCENTRACIÓN DE NITRATOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES DE NITRÓGENO.....	67
FIGURA 20. CONCENTRACIÓN DE ORTOFOSFATOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES DE NITRÓGENO.....	68
FIGURA 21. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN EL CULTIVO A TRAVÉS DEL TIEMPO A DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES DE BIOMASA	70
FIGURA 22. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN EL CULTIVO A TRAVÉS DEL TIEMPO A DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES DE NITRÓGENO AMONIAICAL	72
FIGURA 23. CONCENTRACIÓN DE LÍPIDOS EN EL CULTIVO A TRAVÉS DEL TIEMPO A DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES DE BIOMASA	73
FIGURA 24. CONCENTRACIÓN DE LÍPIDOS EN EL CULTIVO A TRAVÉS DEL TIEMPO A DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES DE NITRÓGENO AMONIAICAL	74

FIGURA 25. CONCENTRACIÓN DE CARBOHIDRATOS EN EL CULTIVO A TRAVÉS DEL TIEMPO A DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES DE BIOMASA	75
FIGURA 26. CONCENTRACIÓN DE CARBOHIDRATOS EN EL CULTIVO A TRAVÉS DEL TIEMPO A DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES DE NITRÓGENO AMONICAL	76
FIGURA 27. CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA A EN EL CULTIVO A TRAVÉS DEL TIEMPO A DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES DE BIOMASA	77
FIGURA 28. CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA B EN EL CULTIVO A TRAVÉS DEL TIEMPO A DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES DE BIOMASA	78

RESUMEN GENERAL DE TRABAJO DE GRADO

TITULO: EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE REMOCIÓN DE NUTRIENTES DE UN EFLUENTE ANAEROBIO MEDIANTE UNA CEPA DE *Chlorella vulgaris*

AUTOR(ES): JUAN CARLOS SERRANO MALAGÓN

FACULTAD: Facultad de Ingeniería Ambiental

DIRECTOR(A): ALEXANDRA CERÓN VIVAS

RESUMEN

El tratamiento anaerobio es un sistema que presenta remociones adecuadas en cuanto a materia orgánica y sólidos totales, pero carece de efectividad a la hora de remover nutrientes en el agua residual. Debido a ello se hace necesaria la implementación de tecnologías terciarias con el fin de llevar a cabo dicha remoción. Con el presente estudio se evaluó la eficiencia de la remoción de nitrógeno y fósforo por una cepa de *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor tipo batch a escala laboratorio. Adicionalmente se midió la producción de biomasa, proteínas, carbohidratos, lípidos y clorofila, con el fin de cuantificar los metabolitos de valor agregado que se producen, para determinar posibles usos en el futuro. Las muestras de agua residual se obtuvieron del efluente anaerobio de una planta de tratamiento de agua residual, se utilizaron 3 concentraciones iniciales de nutrientes: 74,5 mg/L, 49,8 mg/L y 55,6 mg/L de NH₃-N, así como 3 concentraciones iniciales de biomasa: 100 mg/L, 400 mg/L y 600 mg/L en peso seco, los cuales corresponden con un modelo de experimento factorial 3². Las remociones obtenidas fueron mayores al 70% de nitrógeno y 33% de ortofosfatos, siendo mejores las obtenidas para las concentraciones iniciales de 55,6 mg/L de NH₃-N y 600 mg/L de biomasa, para el caso del nitrógeno y 49,8 mg/L de NH₃-N y 100 mg/L de biomasa seca para ortofosfatos.

PALABRAS CLAVES:

Remoción de nutrientes, Efluente anaerobio, Metabolitos de valor agregado, Microalgas.

V° B° DIRECTOR DE TRABAJO DE GRADO

GENERAL SUMMARY OF WORK OF GRADE

TITLE: ASSESMENT OF THE REMOVAL EFFICIENCY OF NUTRIENTS OF AN ANAEROBIC EFFLUENT USING A STRAIN OF CHLORELLA VULGARIS

AUTHOR(S): JUAN CARLOS SERRANO MALAGÓN

FACULTY: Facultad de Ingeniería Ambiental

DIRECTOR: ALEXANDRA CERÓN VIVAS

ABSTRACT

Anaerobic treatments are systems that have shown to be efficient in terms of organic matter and total solids removal, but lack of effectiveness when it comes to remove nutrients in wastewater. On that basis, the implementation of tertiary technologies is necessary in order to carry out such removal. The present study assessed the efficiency of nitrogen and phosphorus removal by a strain of *Chlorella vulgaris* in a photobioreactor type batch scale laboratory. In addition, the production of biomass, proteins, carbohydrates, lipids and chlorophyll, was measured in order to quantify the value-added metabolites production, in order to determine their biotechnological applications. The wastewater samples were obtained from the anaerobic effluent from a wastewater treatment plant, 3 initial nutrient concentrations were used: 74,5 mg/L, 49,8 mg/L & 55,6 mg/L de NH₃-N, as well as 3 initial concentrations of biomass: 100 mg/L and 400 mg/L & 600 mg/L of dry weight biomass, which corresponds to a 32 factorial experiment model. The removals obtained were greater than 70% for NH₃-N and 33% P-PO₄ being better those obtained for the initial concentrations of 55.6 mg NH₃-N / L and 600 mg dry biomass / L.

KEYWORDS:

Nutrients removal, anaerobic effluent, Value-added Metabolites, Microalgae.

V° B° DIRECTOR OF GRADUATE WORK

1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad las plantas de tratamiento de agua residual en Colombia siguen ciertos lineamientos que exige la norma en cuanto a descargas puntuales a fuentes hídricas; esta normatividad trata principalmente de la concentración de materia orgánica en los vertimientos y no contempla en ningún caso los nutrientes disueltos, como el fósforo y el nitrógeno, presente en la descarga.

Los altos niveles de nitrógeno y fósforo pueden generar un desequilibrio en los ecosistemas acuáticos, ya que se puede producir un proceso de eutrofización. La eutrofización es el fenómeno que ocurre cuando el agua de un lago o río se va enriqueciendo de nutrientes a un ritmo superior al de eliminación y por esta razón se da un aumento en el crecimiento de organismos de la fase primaria. Al darse este proceso en una fuente hídrica, se crea una competencia entre los distintos seres vivos presentes y una disminución en los niveles de oxígeno, generando extinción de especies de peces y cualquier otro organismo vivo que requiera oxígeno para su subsistencia.

El efluente anaerobio de la Universidad Pontificia Bolivariana Seccional Bucaramanga posee altos niveles de nitrógeno y fósforo, por ello se hizo necesaria la aplicación de tratamientos terciarios como el Buchón de agua (*Eichhornia Crassipes*), que resultan ser útiles por cierto tiempo, pero al llegar a su punto de saturación se inicia un proceso de desorción que, sumado con sus subproductos metabólicos, termina por aumentar las cargas biológicas; de ahí que sea necesaria la investigación para la aplicación de tecnologías complementarias. En este trabajo se realizó un tratamiento biológico del afluente anaerobio mediante una cepa de *C. vulgaris* con el fin de remover el nitrógeno y el fósforo, así mismo, se realizó una evaluación de los metabolitos de valor agregado producidos por la microalga y se determinó la influencia de la concentración inicial de biomasa y nutrientes en cada fase.

2 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficiencia de remoción de nitrógeno y fósforo de un efluente anaerobio mediante un cultivo tipo batch de una cepa de *Chlorella vulgaris*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar el diseño, montaje y puesta en marcha de un módulo de cultivo de microalgas en reactores tipo batch a escala laboratorio.
- ✓ Determinar la influencia de la concentración inicial de microalgas sobre su crecimiento y remoción de nitrógeno y fósforo de un efluente anaerobio.
- ✓ Determinar la influencia de la concentración inicial de nutrientes en un efluente anaerobio sobre el crecimiento de una cepa de *Chlorella vulgaris* y la remoción de nitrógeno y fósforo.
- ✓ Evaluar los metabolitos de valor agregado producidos por las microalgas.

3.1 ANTECEDENTES

En el campo de la ficología aplicada, se han estudiado principalmente los cultivos de biomasa a gran escala, puesto que mediante estos se logran mayores potenciales industriales. Las primeras investigaciones sobre el potencial de las microalgas para el tratamiento de aguas residuales nacieron como un accidente, las investigaciones de Oswald (1957) sentaron las bases para explorar el campo de las microalgas a escala industrial.

Durante la década del 60, Oswald (1963) (1962) realizó investigaciones evaluando la eficiencia del uso de la energía solar en el tratamiento de aguas residuales. En la década de los 70 McGriff y McKinney (1972) evaluaron la remoción de nutrientes del agua residual mediante un tratamiento de algas activadas, cuyo objetivo principal fue la determinación de los parámetros de operación (ciclos de luz-oscuridad, tiempo de retención hidráulica, sensibilidad lumínica y concentración de biomasa) óptimos para un fotobiorreactor de algas.

Con los años las investigaciones sobre el tratamiento de aguas residuales empezaron a explorar el valor agregado del uso de microalgas, como los bajos costos energéticos mediante la manipulación de los aparatos fotosintéticos (Banemann, 1990) y la reducción de gases de efecto invernadero (Green, 1998).

Actualmente se cuenta con numerosos estudios a nivel mundial sobre la eliminación de nutrientes, en especial nitrógeno y fósforo en aguas residuales de todo tipo (Abdel-Raoufa, 2012). Las investigaciones de mayor importancia y renombre a nivel mundial en materia de microalgas se realizan en el M.M. Watanabe & K. Kaya Lab, a cargo del doctor Makoto Watanabe y su equipo de investigación, quienes actualmente exploran técnicas para mejorar el proceso de fotosíntesis con el fin de remover más eficazmente los nutrientes en aguas residuales, el potencial de la interacción entre algas y bacterias, entre otras (Watanabe, 2015).

En Colombia, se han llevado a cabo investigaciones a pequeña escala por instituciones educativas como la Universidad de Antioquia, la Universidad Industrial de Santander y la Universidad Pontificia Javeriana, entre otras, y se han llevado a

escala industrial en procesos del sector hidrocarburos con empresas como ICP y Cementos Argos, entre otras (Corredor, 2008).

A nivel local, en la Universidad Industrial de Santander se han realizado varias investigaciones sobre el aprovechamiento de efluentes residuales para la producción de metabolitos de valor agregado de microalgas (Solano, 2013) (2011) (Porrás, 2012), se han variado los sustratos para las microalgas tomando, desde aguas residuales domésticas hasta aguas residuales industriales producto de actividades relacionadas con el sector económico de hidrocarburos (Solano, 2013) (Lopez, 2010). Asimismo se han llevado a cabo investigaciones sobre el cultivo de microalgas y su potencial energético para la producción de biocombustible (Sánchez Tuirán, 2012) (Pestana & Pestana, 2012).

3.2 MARCO CONTEXTUAL

Actualmente la mayoría de plantas de tratamiento de agua residual en Colombia realizan tratamiento secundario. El 17,3 % de sistemas de tratamiento de aguas residuales en Colombia utilizan tratamiento preliminar y primario. Los tratamientos secundarios son los más usados en el país, aunque pocas plantas poseen tratamientos terciarios. Aproximadamente el 43,2% de las aguas son tratadas, de las cuales el 82% se tratan mediante tecnologías secundarias, lo cual corresponde a un caudal de tratamiento de 13,1 m³/seg. (Superintendencia de Servicios Públicos Domiciliarios, 2012). En la tabla 1 se puede apreciar el número de sistemas de tratamientos existentes en el país según el nivel de tratamiento alcanzado.

Tabla 1. Sistemas tratamiento de aguas residuales en Colombia por nivel de tratamiento

Nivel de Tratamiento	Número de Sistemas	Caudal Tratado (m ³ /s)
Preliminar	14	1,35
Primario	33	8,66
Secundario	224	13,15
Total General	271	23,18

Fuente: Sistema Único de Información de Servicios Públicos SUI, 2012

Las plantas de tratamiento anaerobio de aguas residuales en el país adquirieron su importancia a finales de los 80s. En 1989, gracias a las experiencias de empresas como Biotec Colombia, Hydra ingeniería Ltda, CDMB, Bavaria y Sucromiles, se optó por tecnologías que involucraban tratamientos anaerobios. Una de las desventajas de las plantas anaerobias es su ineficiencia para remover nutrientes, los cuales pueden ser benéficos si se usan para riego de cultivos en zonas agrícolas, pero resultan nocivos a la hora de disponerlos en fuentes hídricas. Por tal razón, se han buscado tecnologías auxiliares complementarias que permitan la eliminación de nutrientes, los cuales son llamados tratamientos terciarios (Conil, 2006).

Es necesario aclarar que aunque muchos de los municipios y empresas tengan un sistema de tratamiento secundario, no cumplen a cabalidad la norma en cuanto a remoción de contaminantes. Por ello los diferentes operadores de plantas han ido avanzando hacia la implementación de tecnologías adicionales para lograr dichas remociones, haciendo necesaria la formulación de proyectos mediante los cuales se desarrollen soluciones evitando así futuras sanciones económicas o interrupción en la producción.

3.3 TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

La prevención de la contaminación de los cuerpos de agua y el suelo es posible siempre y cuando sean realizados tratamientos apropiados a cada caso. A medida que la población crece demanda más recursos y genera una mayor cantidad de desechos, de allí que cada vez sea más importante hallar formas de tratamiento o renovación de aguas para minimizar el impacto ambiental y la amenaza a la salud pública. El objetivo de los tratamientos de agua residual es proteger la salud pública y propender por el bienestar de las poblaciones.

Según Romero (1999) “las aguas residuales son las usadas y los sólidos que por uno u otro medio se introducen en las cloacas y son transportados mediante el sistema de alcantarillado”, las cuales surgen como producto inevitable de las actividades humanas y sus características están ligadas a las actividades económicas que las producen. Para el tratamiento de aguas es necesaria la evaluación de las características físicas, químicas y biológicas de dichas aguas, así como su impacto en la fuente receptora.

Las aguas residuales pueden provenir de distintos lugares y, dependiendo de su origen se derivan sus características. Existen varias clasificaciones según la fuente, algunos autores las dividen en 3 grupos principales, otros en 4. Según Romero (1999) las aguas residuales pueden clasificarse de acuerdo a su origen en: Aguas Residuales Domésticas (ARD), las cuales provienen de las viviendas o residencias, edificios comerciales e institucionales, Aguas Residuales Municipales, que son los residuos líquidos transportados por el alcantarillado de una ciudad o población y son tratados en una planta de tratamiento municipal y Aguas Residuales Industriales (ARI), que son aquellas que se generan como producto de las actividades económicas de la industria de manufactura. Según Ramalho (1983) la clasificación de aguas residuales según su fuente debe ser: (1) aguas domésticas o urbanas, (2) aguas residuales industriales, (3) aguas de escorrentía de usos agrícolas y (4) pluviales.

Para el tratamiento de aguas residuales se han definido 4 niveles, (1) el tratamiento preliminar, (2) el tratamiento primario, (3) el tratamiento secundario y en algunos casos (4) el tratamiento terciario o avanzado.

El tratamiento preliminar comprende una serie de unidades o módulos que tienen por fin la eliminación de los constituyentes (materiales gruesos) de las aguas residuales, que pueden causar problemas en la conducción, mantenimiento u operación de una PTAR. Los principales sistemas que se utilizan en la etapa de pretratamiento son las rejillas y los desarenadores.

El tratamiento primario es aquel que se enfoca a la remoción parcial de sólidos suspendidos, materia orgánica u organismos patógenos, generalmente mediante sedimentación, como método de preparación para el tratamiento secundario. Usualmente en ésta etapa de tratamiento se logran remociones hasta del 60% de los sólidos suspendidos y 35 a 40% de la DBO (Romero, 1999).

El tratamiento secundario comprende los tratamientos microbiológicos tanto aerobios como anaerobios, y en esencia es un proceso de oxidación biológica. Según Romero (1999) “es la conversión bacteriana de los elementos de su forma orgánica a su forma inorgánica mediante una oxidación fuerte en un proceso denominado mineralización”.

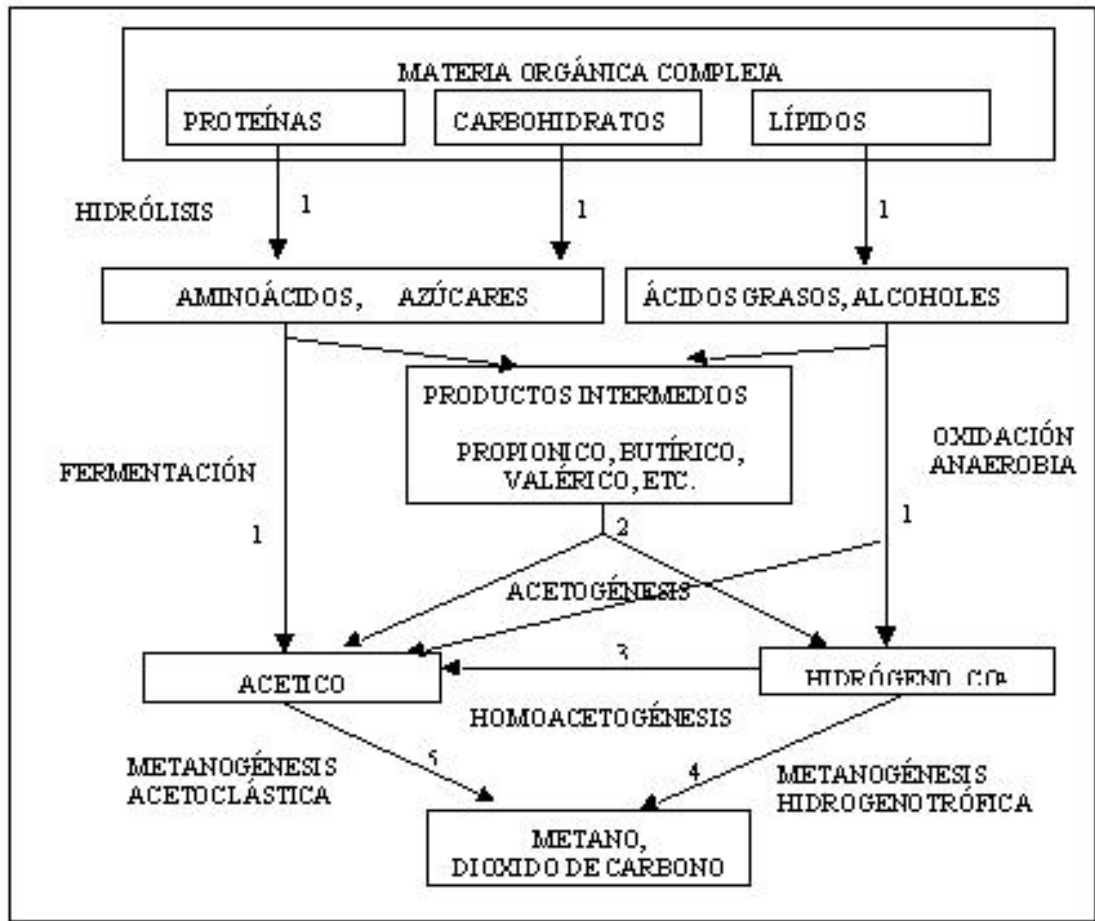
La actividad microbiológica se utiliza para remover sustancias orgánicas biodegradables, disueltas o coloidales mediante la producción de biomasa y su conversión en gases que escapan a la atmósfera. Dependiendo del proceso utilizado, los tratamientos secundarios pueden lograr remociones de nitrógeno y

Anóxicos	Suspendido	Bardenpho Desnitrificación	Remoción de DBO, N y P Remoción de N
	Adherido	Desnitrificación	Remoción de N
Anaerobios	Suspendido	Digestión anaerobia Anaerobio de contacto	Remoción de DBO – estabilización Remoción de DBO
	Híbrido	Lagunas anaerobias Manto de lodos-flujo Ascensional (PAMLA) o UASB	Remoción de DBO- estabilización Remoción de DBO y SS
	Adherido	Filtro anaerobio Lecho expandido	Remoción de DBO – estabilización

Fuente: Romero (1999)

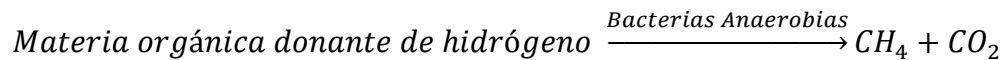
Para lograr el uso de los sulfatos y del CO₂ como aceptores de electrones se tienen que garantizar condiciones anaeróbicas, es decir, sin oxígeno libre ni nitratos. Las moléculas orgánicas a degradar poseen oxígenos que pueden usarse como aceptores de electrones. En el caso de los carbohidratos una porción se transforma en CO₂ mientras que las otras se reducen para formar aldehídos, cetonas y alcoholes. A continuación, en la figura 1, se puede observar un esquema simplificado de las reacciones de la digestión anaerobia en materiales poliméricos, forma en la cual se encuentran en el agua residual.

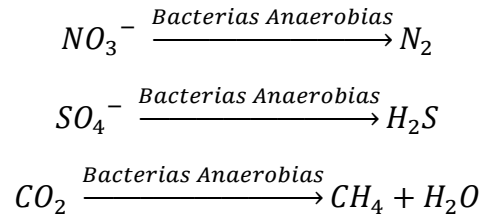
Figura 1. Esquema de reacciones de la digestión anaerobia de materiales poliméricos. 1, bacterias fermentativas; 2, bacterias acetogénicas que producen hidrógeno; 3, bacterias homoacetogénicas; 4, bacterias Metanogénicas hidrogenotróficas; 5, bacterias Metanogénicas acetoclásticas



Fuente: Pavlostathis (1991)

En los tratamientos anóxicos ocurren procesos de descomposición anaerobia como la desnitrificación de nitratos, respiración de sulfatos, hidrólisis y fermentación acetogénica y metanogénica, como se observan en las siguientes ecuaciones (Romero, 1999).





El tratamiento terciario o avanzado es utilizado para la remoción de sólidos solubles o nutrientes, con el fin de prevenir la eutrofización de los cuerpos hídricos. En algunos casos las tecnologías terciarias son usadas con el fin de adecuar el efluente para ser reutilizado (Ramalho, 1983). Los tratamientos terciarios más comunes son: (1) separación de sólidos en suspensión, (2) adsorción mediante carbón activado, (3) intercambio iónico, (4) ósmosis inversa, (5) electrodiálisis, (6) oxidación química, (7) métodos de eliminación de nutrientes, (8) proceso “sonozone” para purificación de aguas residuales.

La adsorción mediante carbón activado es un proceso físico mediante el cual el carbón activado funciona como absorbente atrapando las moléculas de contaminantes que se encuentran en el agua (absorbatos). El proceso de intercambio es en el cual un sólido atrae iones suspendidos mediante fuerzas electrostáticas, los iones se intercambian por otros iones de una especie diferente en disolución, cuyo ejemplo más notable son las resinas de intercambio iónico. La ósmosis inversa funciona revertiendo el flujo normal de la ósmosis directa mediante la aplicación de una fuerza externa superior al valor de la presión osmótica. La electrodiálisis es un método de intercambio iónico a través de membranas, las cuales son permeables sólo para los iones y actúan como barreras selectivas para ciertas especies iónicas. Los procesos de oxidación química más usados para el tratamiento de agua son la cloración y la ozonación. La cloración se utiliza para desinfectar el efluente que se va a descargar, adicionalmente reduce la DBO, oxida iones metálicos y cianuros y elimina olores y color aparente.

Para la eliminación de nutrientes se usan tradicionalmente procesos fisicoquímicos y biológicos, el más adoptado entre ellos es el proceso de nitrificación y desnitrificación (Fair, 1984), pues ha demostrado ser una técnica efectiva y económica (Brock, 1991). La nitrificación es un proceso aerobio que se lleva a cabo en 2 etapas, la oxidación amonio-nitrito y la oxidación nitrito-nitrato, en las cuales intervienen microorganismos diferentes para cada fase, pero ambos pertenecientes a la familia Nitrobacteriaceae (Prosser, 1989). La desnitrificación biológica es un

proceso anaerobio en el cual se transforma el nitrato producido en la nitrificación a N_2 por medio de la actividad de diferentes enzimas (Knowles, 1982)

Otros métodos usados para la reducción de nitratos son la reducción desasimilativa de nitrato de amonio (RDNA), la cual es realizada por una enzima nitrato reductasa no asociada a la membrana, en la cual el donador de electrones es el NADH y el formato (Mulder A., 1995) y la oxidación anaerobia de amonio (ANAMMOX), la cual es el proceso de formación de N_2 a partir de nitrito y amonio, bajo condiciones anaerobias (Mulder A., 1995).

3.4 LAS MICROALGAS

Las microalgas son organismos unicelulares, fotosintéticos, generalmente autótrofos, que por medio de la energía lumínica producen energía química (Andersen, 2005). En busca de una definición más exacta, los ficólogos incluyeron en la definición de microalga a las cianobacterias, que son organismos unicelulares procariontes. De esta manera, el término microalga puede hacer referencia a cualquier alga microscópica y a las bacterias fotosintéticas oxigénicas, cianobacterias, anteriormente conocidas como Cyanophyceae (Lee, 1989).

Las algas no pertenecen a ningún grupo taxonómico definido, sin embargo poseen ciertas características generales y de organización que se encuentran abiertas a cambios conforme se acumula información. Los miembros procariontes de las algas se dividen en 2: Cyanophyta and Prochlorophyta; mientras los miembros eucariontes se dividen en 9: Glaucophyta, Rhodophyta, Heterokontophyta, Haptophyta, Cryptophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Chlorarachniophyta, and Chlorophyta (Barsanti, 2006).

Típicamente, las microalgas son capaces de aprovechar la energía lumínica para su sustento, en dicho proceso su desarrollo depende de la materia inorgánica. Sin embargo existen algas que pueden aprovechar la materia orgánica para lograr la síntesis de nutrientes. De esta forma las microalgas pueden clasificarse según su mecanismo de obtención de energía en:

- Fotoheterótrofas: un organismo fotoheterótrofo es capaz de aprovechar la energía lumínica y al mismo tiempo emplear compuestos orgánicos como fuente de carbono.

- Fotoautótrofas: son organismos capaces de aprovechar la energía lumínica y emplear compuestos inorgánicos en forma de sales como sustento.
- Mixotróficas: son organismos capaces de sintetizar alimento a partir de la luz solar y la materia orgánica. Pueden desarrollar procesos tanto autótrofos como heterótrofos, lo cual permite el aprovechamiento de carbono orgánico o inorgánico.
- Heterótrofas: los compuestos orgánicos representan tanto su fuente de energía como su fuente de carbono, lo cual permite a dichas algas su desarrollo en ambientes afóticos.

El término alga no representa una clasificación taxonómica, sino que el mismo es un término acuñado para distintos tipos de organismos fotosintéticos.

Las algas dulces pueden clasificarse en 10 grupos o filums con base en su apariencia microscópica (Tabla 3) y en sus características bioquímicas.

Tabla 3. Divisiones principales de las algas de agua dulce: apariencia microscópica

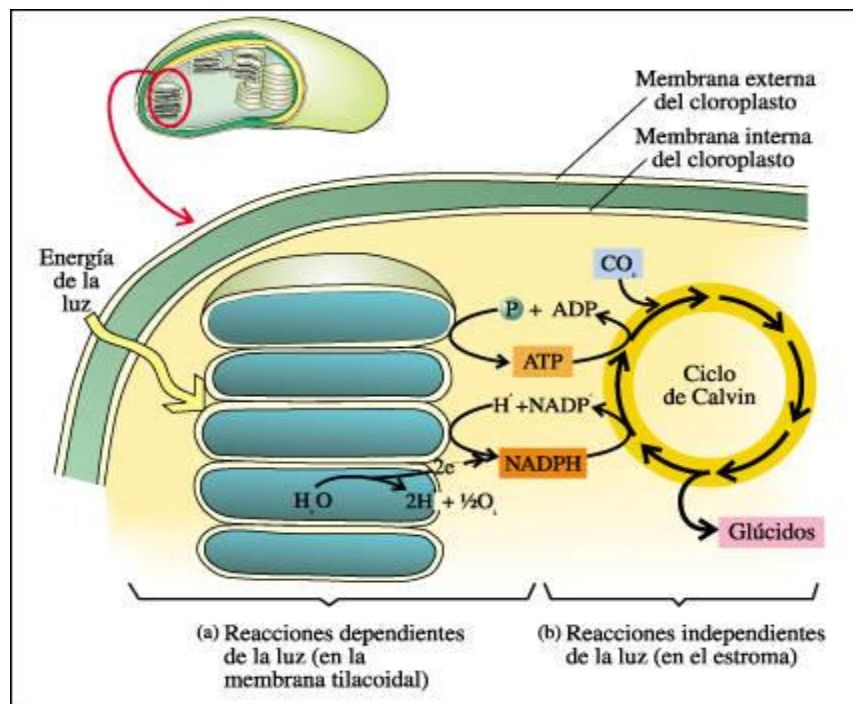
División algal (filum)	Número de especies	Color Típico	Morfología típica	Motilidad	Representante del filum
Algas verde-azuladas (Cianophyta)	297	Verde-Azul	Microscópico o visible, usualmente colonial	Presentan motilidad	<i>Synechocystis</i> , <i>Microcystis</i>
Algas verdes (Chlorophyta)	992	Verde	Microscópico o visible, colonial	Presentan motilidad	<i>Chlamydomonas</i> , <i>Cladophora</i>
Euglenoides (Euglenophyta)	124	Colores Variados	Microscópico, unicelular	Presentan motilidad	<i>Euglena</i> , <i>Colacium</i>
Algas Verde-Amarillas (Xanthophyta)	73	Amarillo-Verde	Microscópico, unicelular o filamentoso	Presentan motilidad	<i>Ophioctyium</i> , <i>Vaucheria</i>
Dinoflagelados (Dinophyta)	54	Rojo-marrón	Microscópico, unicelular	Presentan motilidad	<i>Ceratium</i> , <i>Peridinium</i>
Criptomonas (Cryptophyta)	15	Colores variados	Microscópico, unicelular	Presentan motilidad	<i>Rhodomonas</i> , <i>Cryptomonas</i>
Crisofitas (Chrysophyta)	115	Dorado-marrón	Microscópico, unicelular o colonial	Presentan motilidad	<i>Mallomonas</i> , <i>Dinobryon</i>
Diatomeas (Bacillariophyta)	1652	Dorado-marrón	Microscópico, unicelular o colonas filamentosas	Presentan motilidad	<i>Stephanodiscus</i> , <i>Aulacoseira</i>
Algas Rojas (Rhodophyta)	22	Rojo	Microscópico, unicelular o colonial	No presentan motilidad	<i>Batrachospermum</i> , <i>Bangia</i>
Algas Marrones (Phaeophyta)	2	Marrón	Colchones multicelulares o recubrimiento de tallos	No presentan motilidad	<i>Pleurocladia</i> , <i>Heribaudiella</i>

Fuente: Basanti (2006)

3.5 FOTOSÍNTESIS

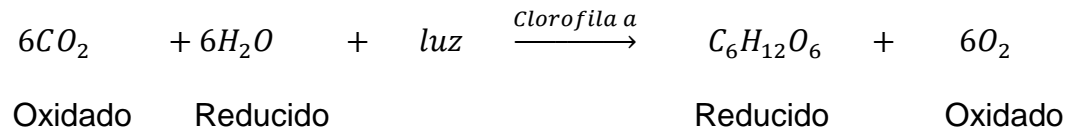
La fotosíntesis oxigénica en organismos eucariotas (Figura 2) es un proceso en el cual la energía solar se convierte en energía química por medio de unas reacciones de oxidación y reducción, en el que interviene un fotón en un rango de 400 a 700 nm para excitar los protones presentes en las moléculas de clorofila. La fotosíntesis se da en 2 grupos de reacciones, las primeras reacciones dependientes de la luz, las cuales capturan la energía lumínica y la transforman en energía química en forma de ATP y NADPH. El segundo grupo de reacciones reciben el nombre de reacciones independientes de la luz, y son una serie de reacciones en las cuales se toma el potencial químico liberado de las primeras reacciones y es usado para convertir carbono inorgánico en triosafosfato, sustrato para el alga (Barsanti, 2006).

Figura 2. Esquema gráfico de la maquinaria de la fotosíntesis.



Fuente: Curtis (2000)

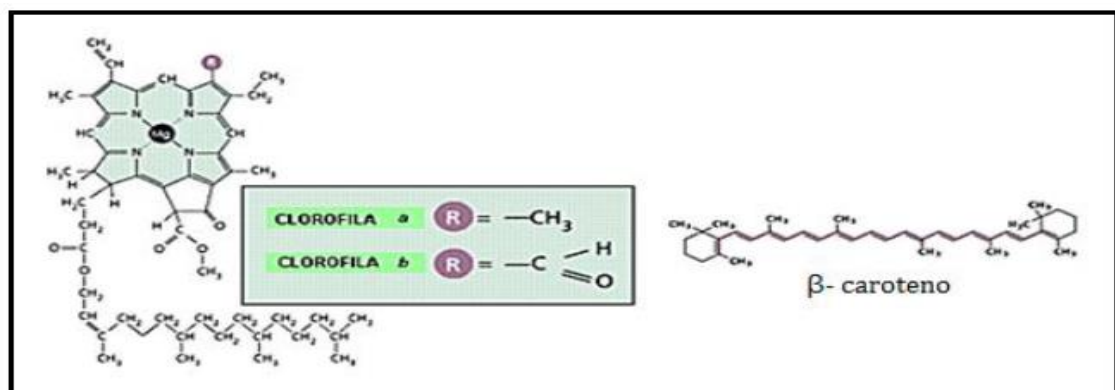
Como se puede apreciar en la reacción mostrada a continuación, establecida por Boussingault (1864), el proceso de fotosíntesis convierte un carbono en su máximo estado oxidativo (CO₂) en carbohidratos como resultado de una reducción fuerte:



En esta reacción| la luz es un sustrato primario, la clorofila a es un catalizador necesario para la reacción, el C₆H₁₂O₆ representa la materia orgánica reducida hasta carbohidratos.

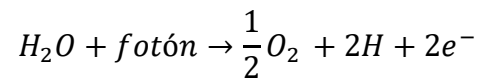
3.5.1 Reacciones de la fase lumínica. Las reacciones de la fase lumínica se llevan a cabo en las membranas tilacoides, cuya composición ha sido estimada en 50% de lípidos y 50% de proteínas y su espesor mide 7nm (Barsanti, 2006). En el ciclo lumínico están involucrados pigmentos fotosintéticos, dichos pigmentos contienen un grupo químico llamado cromóforo que posee la capacidad de absorber energía proveniente del espectro visible de la luz (Maris, 2012). Los pigmentos se ubican en el centro de reacción de los fotosistemas (I & II), ellos son los encargados de la transferencia de electrones a una molécula aceptadora. Los principales pigmentos presentes en los tilacoides en el género *Chlorella* son las xantofilas y los β-carotenos (figura 3) que son moléculas que absorben la luz en regiones del espectro de luz verde y azul (Maris, 2012).

Figura 3. Clorofila a, b y Beta-caroteno



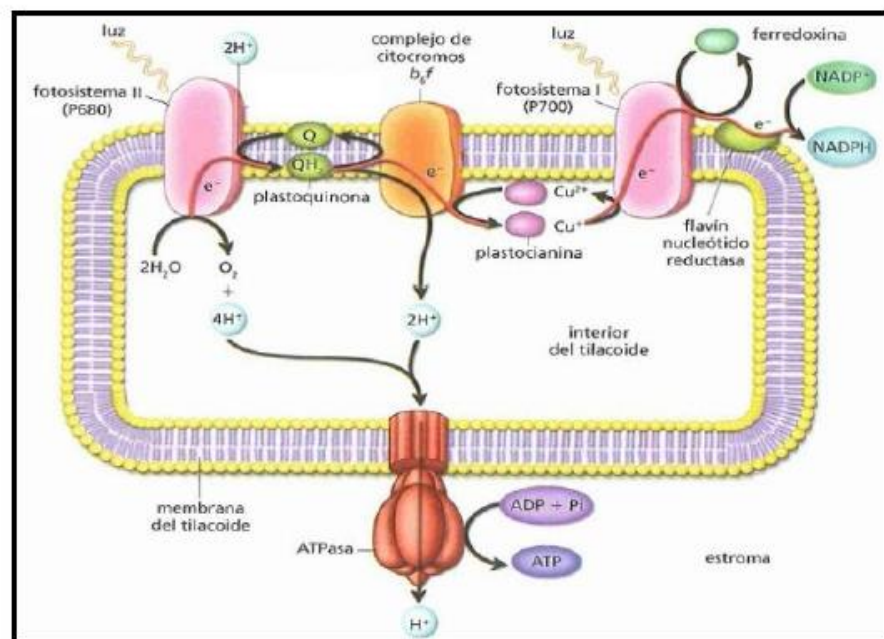
Fuente: EOL 2010

En la fase lumínica un electrón pasa a un estado excitado debido a la acción de la energía emitida por una fuente lumínica. Mediante un proceso de fotólisis del agua, el electrón se convierte en ATP y NADPH, dicho proceso se lleva a cabo en los cloroplastos y el proceso se describe en la siguiente reacción:



La fase de fotofosforilación ocurre cuando se forma una molécula de ATP mediante la energía del electrón excitado por la luz por medio de un enlace pirofosfato. Gracias a dicha energía se produce un bombeo de protones desde el estroma al espacio intratilacoidal, lo cual genera gradientes energéticos como se observan en la figura 4.

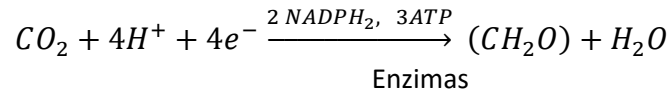
Figura 4. Fotofosforilación



Fuente: Maris (2012)

Posteriormente la energía obtenida a partir de la fase lumínica da inicio a la fase oscura. En la que el CO_2 se reduce para formar carbohidratos y otros productos metabólicos.

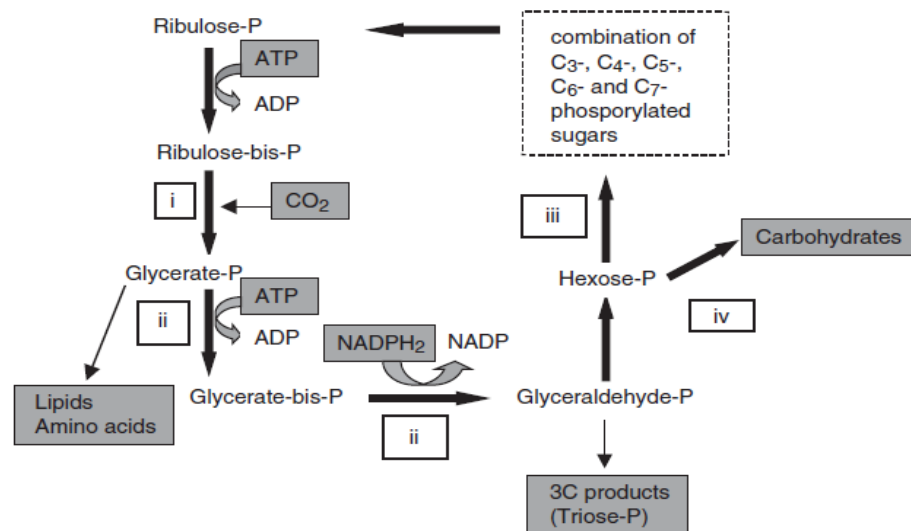
3.5.2 Reacciones de la fase oscura. La fijación del dióxido de carbono (CO_2) sucede en la fase oscura de la fotosíntesis mediante el ATP y NADPH_2 obtenido en la fase lumínica. La reacción puede expresarse como:



Para convertir la molécula de CO_2 se necesitan 2 moléculas de NADPH_2 y 3 de ATP, y se ha llegado a evaluar la eficiencia de producción de energía de la fotosíntesis hasta alcanzar a un valor de 10 quanta de luz absorbida por cada molécula de CO_2 transformada (Richmond, 2004).

Calvin y Benson (1948) formularon los mecanismos de la fase oscura de la fotosíntesis, mecanismo por el cual se transforma el CO_2 en azúcares y otros compuestos en 4 fases principales formando así el ciclo de Calvin-Benson (figura 5) como se muestra a continuación.

Figura 5. Ciclo de Calvin-Benson.



Fuente: Richmond (2004)

- i. Fase de Carboxilación: fase por medio de la cual el CO_2 se une a un azúcar de 5 carbonos llamado P-Ribulosa-bis, para formar dos moléculas de fosfoglicerato. Esta reacción es catalizada por una enzima denominada Rubisco.
- ii. Fase de Reducción: se realiza en dos partes. La primera comprende la fosforilación del fosfoglicerato para formar difosfoglicerato y ADP, la segunda parte

comprende la reducción del difosfoglicerato para formar fosfogliceraldehido. Este proceso se realiza para convertir el fosfoglicerato en productos de 3 carbonos.

- iii. Fase de Regeneración: se regenera el fosfato de Ribulosa por medio de una serie de reacciones que involucran azúcares de 3, 4, 5, 6 y 7 carbonos. Las reacciones se ven catalizadas por las enzimas aldolasa y transketolasa.
- iv. Fase de Producción: la fase en la que se culmina la producción de carbohidratos, los cuales son considerados los productos terminados de la fotosíntesis, pero también son producidos ácidos grasos, aminoácidos y ácidos orgánicos. Otros metabolitos pueden producirse según las condiciones ambientales a la cual sean sometidas las algas (Richmond, 2004).

3.6 MICROALGAS EN DEPURACIÓN DE AGUAS RESIDUALES

El uso de microalgas para la remoción de nutrientes en aguas residuales ha sido ampliamente estudiado debido a su potencial para remover nitrógeno y fósforo, su capacidad de absorber bacterias patógenas, metales y residuos peligrosos, su posible uso como fuentes de alimentos, etc. En la década de los 50's Oswald (1957) realizó experimentos en los que realizaba un cultivo de algas en un afluyente de agua residual y monitoreaba la concentración de nutrientes, lo cual sentó la base para las tecnologías de tratamiento terciario mediante el uso de microalgas. Sin embargo, el uso y expansión de otras tecnologías de tratamiento de aguas residuales, como lodos activados, han hecho que el uso de microalgas en éste campo se lleve a cabo únicamente a pequeña escala. Según Hoffman (1998), los tratamientos con microalgas logran las mismas eficiencias de remoción para fósforo que los tratamientos químicos convencionales, pero los tratamientos basados en microalgas representan menores costos gracias al ahorro de los productos químicos y al aprovechamiento de los metabolitos resultantes y el uso de la biomasa como fertilizante.

Las microalgas han sido ampliamente investigadas para fines de remediación biológica de aguas contaminadas, principalmente con nitrógeno, fósforo y altas concentraciones de materia orgánica, ya que posee gran capacidad para remover N y P durante su crecimiento, adicionalmente se han usado para absorber metales (Rodríguez, 2011) y acelerar los procesos de inactivación de bacterias patógenas (Chacón, 2004).

Se han llevado a cabo investigaciones por diversos autores en los cuales se inmovilizaron las microalgas en matrices sintéticas de diversos materiales como poliuretano, agar, quitosán, espumas, resinas, con el fin de eliminar nutrientes de muestras de agua (Mallick, 2002). Dichas matrices deben ser hidrófilas, fáciles de separar del agua tratada y resistente a los compuestos químicos usados en los procesos de cultivo (Barsanti, 2006).

Los microorganismos fotosintéticos pueden remover otros compuestos del agua residual aparte de los nutrientes gracias a su habilidad para acumular metales pesados mediante la adsorción química, el intercambio iónico, la quimisorción, reacciones redox o precipitación a la superficie de su pared celular (Barsanti, 2006), incluso se han reportado porcentajes de eliminación de iones metálicos como el hierro, aluminio, magnesio, manganeso y zinc entre el 56 y el 100% (Wang, 2009).

3.7 METABOLITOS DE VALOR AGREGADO

Las microalgas han logrado gran atención en las últimas décadas gracias a su capacidad de remover nutrientes del agua residual (Sawayama, 1998). También han sido estudiadas ampliamente debido a su potencial de producción de biocombustibles gracias a su elevado contenido de lípidos (Morweiser, 2010). Sin embargo no se ha logrado que los sistemas duales de producción de algas que combinen tanto el tratamiento de aguas residuales como la producción de biodiesel sea sustentables económicamente (Lundquist, 2010). Por tal razón, en los últimos años se han llevado a cabo numerosas investigaciones evaluando el potencial de producción de otros productos no combustibles como una estrategia de biorefinería para equilibrar los costos de producción (Olguín, 2012).

La composición algal es variable, la proporción de carbohidratos, proteínas y lípidos cambia de especie a especie y de las condiciones ambientales a las cuales se someta el alga. Según Grobbelaar (2004) la fórmula molecular de las microalgas es: $C_{116}H_{181}O_{45}N_{16}P$, lo cual significa que 1 kg de microalgas en peso seco contiene 523,9 g de carbono, 74,5 g de hidrógeno, 296,5 g de oxígeno, 92,2 g de nitrógeno y 12,76 g de fósforo. Según Ras & Lardon (2011) el contenido de 1 kg en peso seco de microalgas es: 367 g de carbono, 61g de nitrógeno, 8,1 g de fósforo y 6,6 g de potasio.

Como se ha mencionado previamente, la producción de lípidos en las microalgas es un fenómeno altamente estudiado principalmente por su potencial de producción

de biocombustibles. Los lípidos algales pueden ser de dos tipos: lípidos polares y lípidos apolares. Dentro de los lípidos polares encontramos las fosfogliceridas, glicosilgliceridas y esteroides, los cuales son un componente importante de las membranas biológicas. Algunos lípidos polares actúan como intermediarios en varias rutas metabólicas celulares. Los lípidos apolares actúan como reservorios de productos energéticos que pueden transformarse con fines metabólicos en energía (Moheimani, 2013). Las microalgas son organismos adaptados a una gran cantidad de condiciones ambientales, debido a ello existen distintos tipos de lípidos, ligados al tipo de alga y a las condiciones ambientales en las que se puedan encontrar (Grobbelaar, 2004). Existen varias investigaciones que han estudiado los efectos de la concentración de nitrógeno y los efectos que se producen en la producción de lípidos (Tornabene, 1983) en algas verdes. Las microalgas pueden llegar a tener un contenido lipídico de entre 20 y 50% en peso seco, debido a ello tienen un potencial de producción de biocombustibles mayor a las plantas mayores usadas para éste propósito. Se estima que poseen una capacidad de producción de aceites entre 10 a 20 veces mayor ($\text{ha}^{-1}\text{año}^{-1}$) que las plantas usadas tradicionalmente en esta industria (Moheimani, 2013).

Las microalgas pueden usar los nutrientes que se encuentran en las aguas residuales para sintetizar metabolitos tales como vitaminas (tocoferoles, vitamina B12 y provitamina A), polisacáridos, carotenoides (β -carotenos, astaxantinas, cantaxantinas y luteína), otros pigmentos (ficocianina y ficoeritrina), ácidos grasos (ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico), polisacáridos y proteínas (Moheimani, 2013). Debido a la producción de estos metabolitos, las algas han tenido una gran cantidad de aplicaciones antrópicas, desde la industria alimenticia humana, animal, la industria de los fertilizantes, cosméticos, suplementos terapéuticos, toxinas, etc. Su uso en la industria alimenticia se debe en gran parte a su composición, que aporta minerales, vitaminas, proteínas y fibra. Se han realizado estudios con *Wakame* (*U. Pinnatifida*) y *Kombu* (*L. japonica*) (Amin, 2002) en los cuales se ha evaluado su potencial nutricional y se determinó su contenido de fibra entre 35,3 y 37,3% en peso seco, su contenido proteínico en aproximadamente 20% en peso seco y su contenido de vitaminas como se puede ver a continuación en la tabla 4.

Las algas también poseen otras sustancias que son extraíbles y de gran valor en el mercado como el alginato (derivado del ácido algínico) principalmente extraídos de las algas pardas, el cual es un carbohidrato soluble en agua usado para espesar

soluciones acuosas, con el fin de darle algún grado de firmeza (texturas gelatinosas) para formar films solubles en agua y para estabilizar algunos productos.

Tabla 4. Contenido de vitaminas en el alga marina Wakame y Kombu en 100 mg peso seco

Vitaminas	Kombu	Wakame
B-caroteno	2,99 ± 0,009	1,30 ± 0,12
Retinol equivalente	0,481 ± 0,015	0,217 ± 0,006
Vitamina B ₁	0,24 ± 0,02	0,30 ± 0,04
Vitamina B ₂	0,85 ± 0,08	1,35 ± 0,09
Vitamina B ₆	0,09 ± 0,01	0,18 ± 0,02
Niacina	1,58 ± 0,14	2,56 ± 0,11

Fuente: Barsanti (2006)

3.8 DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE CHLORELLA VULGARIS

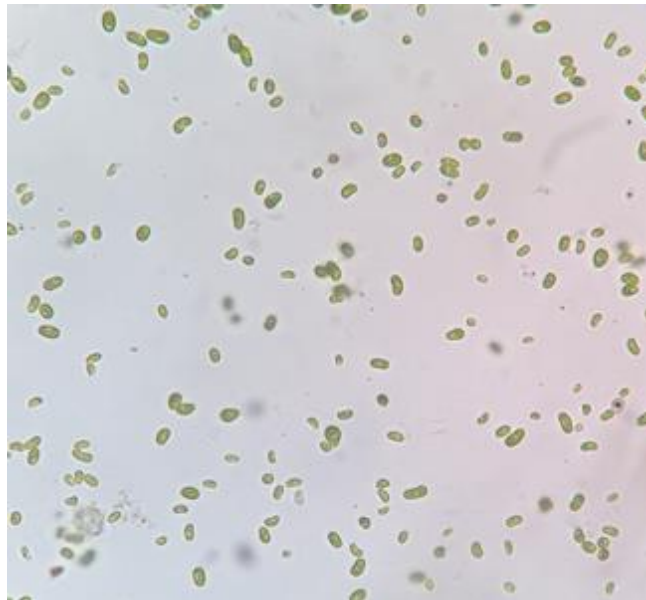
El género *Chlorella* comprende alrededor de 10 especies clasificadas genéticamente, que miden entre 2 y 12 µm esféricas o elipsoidales. Se pueden encontrar en el suelo y en los cuerpos de agua dulce y su propagación ocurre por medio de autoesporas inmóviles que se liberan en periodos de 8 a 24 horas aproximadamente (Barsanti, 2006).

Los individuos de la especie *Chlorella vulgaris* (figura 6) son algas verdes autótrofas con capacidad de producir carbohidratos a partir del CO₂ y luz solar. Pertenece al reino protista, filum *Chlorofita*, clase *Trebouxiophyceae* (Volker, 1999). Las investigaciones con *Chlorella* llevadas a cabo por Beijerinck (1890) sentaron las bases en el campo de la ficología; actualmente el género *Chlorella* es el más ampliamente estudiada debido a sus potenciales usos comerciales, su rápido crecimiento y distribución en gran parte del mundo, así como por su alto contenido lipídico y su versatilidad de manejo, lo cual las convierte en objeto de interés para investigaciones de su uso en la industria alimenticia y energética, así como en la obtención de pigmentos.

La especie *C. vulgaris* está compuesta por individuos unicelulares, sin motilidad, con pared celular lisa, forma esférica y un cloroplasto con forma de copa. Su reproducción se realiza mediante la formación de autoesporas y pueden encontrarse en colonias o grupos irregulares (Montes, 2012).

Los individuos de la especie *C. vulgaris* ha sido motivo de investigación en el campo de biocombustibles debido a su gran capacidad para la síntesis de lípidos, que han concluido que su contenido lipídico ha llegado a ser del 25% al 75% de su peso seco (Azeem, 1999). Dicha cantidad depende de la disponibilidad de nutrientes, pudiendo lograr una cantidad de lípidos entre el 28 y 32% (Sieg, 2008).

Figura 6. *Chlorella vulgaris*



Fuente: Autor

3.9 PARÁMETROS DE INFLUYEN EN EL CRECIMIENTO ALGAL

El crecimiento algal se ve afectado por varios factores ambientales (físicos, químicos y biológicos), y con frecuencia factores como la luz y la temperatura resultan inhibir el crecimiento del alga (Singh, 2014). Un cultivo necesita 3 componentes básicos: un medio de cultivo que sustente los microorganismos con los nutrientes suficientes para su crecimiento y reproducción, una muestra de biomasa que provea los microorganismos para el cultivo y una corriente de aire que

permita el intercambio de oxígeno y dióxido de carbono entre el reactor biológico y la atmósfera. Un alga autótrofa necesita únicamente luz, CO₂, nutrientes y elementos traza para producir cualquier compuesto bioquímico necesario para su supervivencia; pese a ellos muchas especies no poseen los mecanismos biológicos para sintetizar algunos compuestos bioquímicos como las vitaminas, en cuyo caso el medio de cultivo debe suplir las carencias de dichos compuestos. Las condiciones ambientales resultan ser decisivas a la hora de implementar un cultivo de algas, los factores más importantes a tener en cuenta son la cantidad y calidad de los nutrientes, pH, disponibilidad lumínica, turbulencia, salinidad y temperatura (Barsanti, 2006).

3.9.1 Temperatura. La temperatura en el cultivo es un factor que varía dependiendo de la especie. En un cultivo la temperatura debe ser lo más cercana al valor al cual era expuesta el alga al momento de ser recolectada. Existen organismos adaptados a condiciones ambientales muy variadas, entre ellos encontramos organismos polares (<10°C), organismos de zonas tropicales (15-20°C) y organismos tropicales (>20°C). Debido a la facilidad de su obtención y cultivo, las especies más investigadas son aquellas que toleran temperaturas entre los 16 y 27°C. En la mayoría de los cultivos se utilizan temperaturas entre 18 y 20°C, cualquier cambio de temperatura debe ser llevado a cabo mediante incrementos de máximo 2°C por semana. Temperaturas menores a 16°C resultan ser perjudiciales para el crecimiento algal mientras que temperaturas de más de 35°C pueden llegar a ser letales para un gran número de especies (Barsanti, 2006).

El género Chlorella se encuentra presente en climas templados (25-30°C), algunas cepas de *Chlorella* poseen temperaturas óptimas entre los 18 y 25°C. Se han reportado casos exitosos de cultivo de *Chlorella vulgaris* en temperaturas de hasta 36°C con temperaturas óptimas de 32,4°C (Mora, 2006).

3.9.2 Nutrientes. Según la ley de los mínimos de Liebeg (1828) el crecimiento de un cultivo no está dado por todos los nutrientes sino por los más escasos (Browne, 1942). En el caso de un cultivo de microalgas los nutrientes limitantes suelen ser el nitrógeno y el fósforo siempre y cuando se asegure un flujo adecuado de carbono inorgánico. Además de los nutrientes, los cultivos necesitan cierta cantidad de elementos traza, necesarios para el desarrollo de funciones celulares. Existen casos en la que el estrés de nutrientes permite cambios metabólicos que resultan favorables para la producción de lípidos, siempre y cuando haya disponibilidad de CO₂ y luz (Aslan, 2006).

Los requerimientos de nutrientes dependen de la especie a cultivar, existen especies con necesidades especiales de nutrientes. En algunos casos la relación N:P influye negativamente en la absorción de nutrientes, para éstos casos se deben replicar las condiciones ambientales en las cuales fueron obtenidas las algas. En el caso del género *Chlorella* la relación óptima N:P es de 8:1 según Aslan & Kapdan (2006).

Adicional al nitrógeno, fósforo y carbono orgánico se requieren otros macronutrientes en un cultivo de microalgas como el magnesio, calcio, azufre y potasio, así como de otros micronutrientes.

3.9.2.1 Nitrógeno. El rango promedio del nitrógeno dentro de las microalgas puede llegar a encontrarse entre el 1 y más del 10%, este valor depende de la disponibilidad y la fuente de nitrógeno con la cual sea alimentado el cultivo. Las microalgas pueden absorber nitrógeno de diversas moléculas: nitratos, nitritos, nitrógeno atmosférico, urea, amonio y en ocasiones óxidos de nitrógeno en bajas concentraciones. El nitrato es la fuente de nitrógeno más usada en los medios de cultivo, sin embargo existen investigaciones en las que se reporta mayor productividad con amonio como fuente de nitrógeno, seguido por urea y finalmente nitrato, aunque los resultados en términos de remoción son superiores en los cultivos alimentados con nitrato y urea (Xin, 2010)

El amonio resulta ser la especie de nitrógeno preferente para el cultivo de microalgas debido a que puede ingresar a su ciclo metabólico saltándose la reducción previa a la síntesis de aminoácidos directamente hasta la asimilación intracelular primaria de nitrógeno. Sin embargo, el amonio en grandes concentraciones puede ser tóxico para el fitoplancton, se estima que el umbral de toxicidad se encuentra alrededor de los 25 µM, debido a ello debe procurarse que sus concentraciones sean bajas (Barsanti, 2006), aunque el nivel de toxicidad del amonio depende de la especie de alga que sea cultivada. El amonio impide el funcionamiento del fotosistema II, el cual es el lugar en el que se ubican los

pigmentos fotosintéticos y se producen las reacciones, y sustituye al agua en las reacciones de oxidación.

3.9.2.2 Fósforo. El fósforo es esencial para el metabolismo algal puesto que sin él es imposible la síntesis de ácidos nucleicos, lo cual no permite la replicación del genoma o en la síntesis de ARN (Andersen, 2005). Adicionalmente, una baja disponibilidad de fósforo en un cultivo puede afectar las reacciones en el aparato fotosintético, lo cual deriva en la inhibición de la producción de proteínas y ocasiona problemas en la fase de fosforilación. Los efectos de la baja concentración de fosfatos en el cultivo sobre la síntesis de proteínas son similares a los encontrados en cultivos con carencia de nitrógeno, aunque dichos efectos son indirectos y a menos inmediatos. La baja disponibilidad de fósforo en el agua causa reacciones inmediatas en el ciclo de Calvin-Benson (1948) reduciendo la tasa de absorción de luz a la hora de fijar CO₂.

En la mayoría de cultivos son usados los ortofosfatos (P-PO₄³⁻) inorgánicos como fuente de fósforo, aunque también son usados glicero-fosfatos en algunas ocasiones. La mayoría de microalgas pueden producir enzimas en su superficie celular llamadas fosfatasas, las cuales les permiten usar varias fuentes de fósforo.

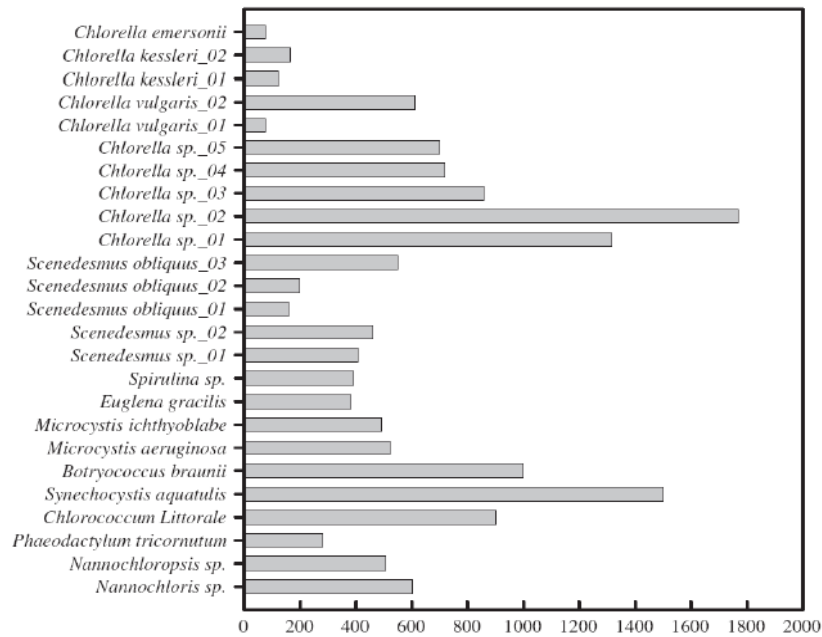
La concentración de ortofosfatos disponibles para el cultivo depende de los valores de pH, además existen otros factores que disminuyen la disponibilidad de fosfatos en el medio como algunos iones (magnesio, sodio, potasio, etc.).

3.9.2.3 Carbono inorgánico. La disponibilidad de carbono orgánico va ligada a la aireación del cultivo. El burbujeo facilita la mezcla y dispersión del carbono orgánico en el medio de cultivo, lo cual permite que haya una disponibilidad uniforme del mismo. La mayoría de microalgas pueden emplear el CO₂ atmosférico como fuente de carbono, así como los iones bicarbonatos por medio de la acción de una enzima llamada anhidrasa carbónica. En promedio las microalgas son capaces de soportar concentraciones de CO₂ cercanas a las 150.000 ppm, aunque ha habido estudios que indican que especies de algas verdes como en el género *Chlorella* pueden soportar concentraciones de alrededor de los 400.000 ppm. En algunos cultivos se inyecta aire enriquecido con CO₂ para aumentar su concentración y disponibilidad en el agua.

El consumo de CO₂ es un factor que varía de especie a especie (figura 7), normalmente se consideran valores de 200 a 600 mg/L de CO₂ diario, aunque en el caso del género *Chlorella sp* se han logrado valores de fijación entre 800 y 1000 mg CO₂/L*d.

Existen otros parámetros que se involucran en la disponibilidad de CO₂ como son la temperatura, la configuración del reactor, el medio de cultivo o la intensidad de la luz.

Figura 7. Consumo de dióxido de carbono por varias especies de microalgas



Fuente: Ho & Chen (2011)

3.9.3 pH y Alcalinidad. El pH es un parámetro que afecta directamente la disponibilidad de nutrientes. El rango de cultivo para la mayoría de las especies de microalgas se encuentra entre 7 y 9 unidades de pH, con un rango óptimo entre 8,2 y 8,7. Se puede llegar a causar el colapso de un cultivo por la falta de control en el pH debido a la inhibición de procesos celulares (Barsanti, 2006) . Valores de pH superiores a 10 causan la precipitación del hidróxido férrico y el sulfato férrico, mientras que valores de pH muy bajos ocasionan daños a nivel metabólico sobre los ácidos orgánicos, el ATP y el ADN. Así mismo, el carbono orgánico puede limitarse a valores de pH superiores a 9, mientras que al nitrógeno se volatiliza pudiendo causar resultados de remoción falsos. De igual manera, el pH también controla la solubilidad del CO₂ en el agua, para muchas especies valores por encima del 4% de CO₂ libre resultan ser tóxicos. (Andersen, 2005).

3.9.4 Disponibilidad lumínica. La radiación solar aporta la energía necesaria para la fotosíntesis, adicionalmente los organismos fotosintéticos pueden aprovechar fuentes lumínicas artificiales con una longitud de onda entre 400 y 700 nm para realizar sus funciones metabólicas. Para un cultivo óptimo deben tenerse en cuenta variables como el tipo de luz, la intensidad y calidad de la misma y los fotoperiodos luz/oscuridad. La demanda lumínica depende del tipo de alga y de las condiciones del cultivo (profundidad, densidad celular, etc.). Sobreexposición a la luz puede causar la fotoinhibición del cultivo, así como daño celular. La luz para el cultivo puede ser natural o artificial, siempre y cuando se controlen los niveles de exposición y la intensidad lumínica.

Para la luz artificial se recomiendan tubos fluorescentes que emitan luz en las longitudes de onda del azul o el rojo en espectro visible. Varias especies de microalgas no pueden adaptarse correctamente a la exposición continua a la luz, en esos casos se tienen en cuenta fotoperiodos de luz/oscuridad (LD) con valores máximos de 16:8 LD, usualmente 14:10 o 12:12 (Barsanti, 2006).

3.10 SISTEMAS DE CULTIVO Y TIPOS DE FOTOBIOREACTORES

Un fotobiorreactor es un sistema cerrado o abierto (estanques), que funciona como un recipiente artificial en el que se lleva a cabo un cultivo de organismos fotosintéticos, en el cual se pretenden lograr condiciones ambientales internas que puedan sustentar su crecimiento y procesos metabólicos.

Los criterios principales para el diseño de un fotobiorreactor son los que propenden por una alta productividad volumétrica y eficiencia de absorción lumínica de forma económicamente viable (Configuración geométrica, materiales que permitan el paso de la luz, agitación que permita uniformidad en el cultivo, relación superficie/volumen del reactor, orientación e inclinación sistema de desorción de gases, sistema de limpieza, regulación de temperatura y pH, facilidad de la operación y escalado).

La configuración de los sistemas de cultivos puede ser abierta o cerrada, cada una de las cuales presenta ventajas y desventajas (tabla 5), el sistema elegido depende de la finalidad del cultivo.

Tabla 5. Ventajas y desventajas de los cultivos abiertos y cerrados.

Parámetro	Sistemas Abiertos	Sistemas Cerrados
Riesgo de contaminación	Extremadamente alto	Bajo
Espacio requerido	Alto	Bajo
Pérdida de agua	Extremadamente alto	Casi nulo
Pérdida de CO₂	Alto	Casi nulo
Calidad de la biomasa	No susceptible	Susceptible
Diversidad de especies en cultivo	Posibilidades de producción restringidas	Pueden ser cultivadas gran variedad de microorganismos,
Flexibilidad de producción	No se puede hacer cambio de producción	Se puede hacer cambio de producción fácilmente
Reproducibilidad	Nula	Posible en ciertos rangos
Control del proceso	No hay control	Posible
Estandarización	No es posible	Posible
Dependencia del clima	Absoluta, la producción es imposible durante la lluvia.	Nula
Periodo de arranque luego de ser interrumpido	De 6-8 semanas aprox.	De 2-4 semanas aprox.
Concentración de la biomasa durante el proceso	Bajo, de 0,1 a 0,2 g/L	Alto, de 2-8 g/L
Eficiencia del proceso de tratamiento	Bajo	Alto

Fuente: Pulz (2001)

Los sistemas de cultivos abiertos son sistemas relativamente simples en los cuales el cultivo está expuesto a las condiciones atmosféricas y el aporte lumínico se hace por medio de la luz natural. Han sido diseñados una gran cantidad de reactores biológicos abiertos, aunque su densidad celular siempre es baja en comparación con los cerrados (Pulz, 2001).

3.10.1 Sistemas de cultivo cerrados. Los sistemas cerrados se caracterizan por poder controlar casi todos los parámetros que intervienen en el cultivo de microorganismo, además de poder percibir fácilmente las respuestas de una población ante la variación de las condiciones ambientales al interior del FBR. Adicionalmente los FBR cerrados brindan los siguientes beneficios en el cultivo (Pulz, 2001):

- Disminuyen el riesgo de contaminación externa en el cultivo de algas.
- No se presentan pérdidas de CO₂ al interior del FTB.
- Generan condiciones experimentales que pueden ser fácilmente reproducidas.
- Brindan un control de factores hidrodinámicos y de la temperatura.
- Tienen un diseño técnico sencillo.

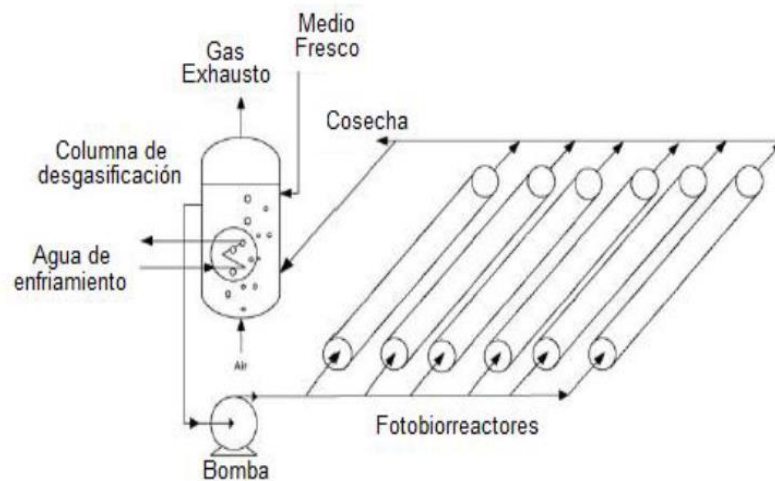
Los sistemas de cultivo de primera generación (tanques, recipientes plásticos) presentaron problemas al escalarse a valores superiores a 100 L debido a la baja penetración de la luz en el cultivo, por lo que se implementaron sistemas de iluminación interior, los cuales tuvieron relevancia solo para algunos cultivos y en general no tuvieron éxito en su aplicación. (Gerbsch, Rarbach, Walter, & Buchholz, 2000).

Los FBR pueden clasificarse según su diseño y modo de operación. Los más usados en cuanto a diseño son (Ugwu, 2007):

1. FBR tubulares: los reactores tubulares (figura 8) tienen una alta relación superficie iluminada/volumen del cultivo. Los reactores tubulares cuentan con un sistema de inyección de aire y un sistema de desgaseado, pero su misma configuración hace que se acumulen altas concentraciones de O₂ que resultan perjudiciales para el cultivo. Otro problema con el que cuentan son los bajos gradientes de mezcla que poseen.

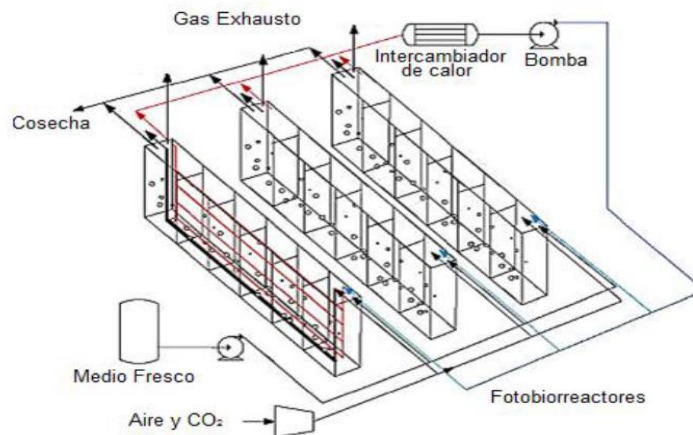
2. FBR de lámina o panel plano, inclinado o vertical: Los FBR de lámina plana (figura 9) poseen una gran superficie iluminada, bajas concentraciones de O_2 y alta eficiencia fotosintética. Su problema radica en la dificultad que supone su escalado, el poco control sobre la temperatura y el estrés hidrodinámico para ciertas especies

Figura 8. Esquema de un fotobiorreactor tubular



Fuente: Jorquera (2010).

Figura 9. Esquema de un fotobiorreactor de panel plano



Fuente: Jorquera (2010).

3. FBR de columna vertical: los FBR de columna vertical poseen inyección de aire desde el fondo y un sistema de desgaseo en su parte superior que funciona como agitación hidráulica, su uso representa costes relativamente bajos.

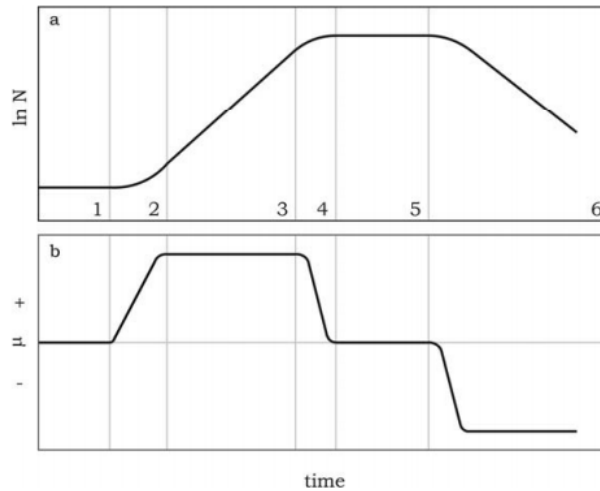
La elección del fotobiorreactor no debe hacerse sin un estudio previo de la especie que se pretende cultivar en materia de costos, condiciones ambientales, adaptabilidad del alga, esterilidad del cultivo, espacio, recursos hídricos, etc. (Ugwu, 2007).

3.10.1.1 Sistemas de cultivo tipo Batch. El sistema más usado para el cultivo de microalgas es el sistema tipo batch, debido a sus bajos costos de puesta en marcha y funcionamiento. Un cultivo tipo batch no posee entrada ni salida de nutrientes, es un sistema cerrado con volumen limitado, lo cual quiere decir que la disponibilidad de nutrientes es finita. En un cultivo tipo batch el crecimiento algal llega a un máximo antes de empezar a reducirse debido al agotamiento de los nutrientes disponibles. Los productos metabólicos de las algas en cultivo también incrementan en el medio de cultivo. Al no existir un caudal de entrada los microorganismos mueren por falta de nutrientes una vez éstos se consuman, a menos que se adicione medio de cultivo nuevamente. Los desechos metabólicos de los organismos en cultivo pueden aumentar los niveles de toxicidad en el medio. Se recomiendan realizar resiembras constantes de biomasa mediante la extracción de una alícuota pequeña de biomasa algal y su posterior mezcla con una mayor cantidad de medio de cultivo. Los cultivos tipo batch poseen un crecimiento típico (figura 10) en 6 fases (Barsanti, 2006), descritas en la tabla 6.

Luego del inóculo inicial, el cultivo no necesariamente entra en fase exponencial debido a que el medio de cultivo, aunque pueda llegar a ser apto para el crecimiento algal, no siempre brinda las condiciones adecuadas para la división celular.

Se necesita un intervalo de tiempo para que las algas se adapten a las condiciones al interior del reactor. El periodo de adaptación depende de las condiciones dentro del reactor y de la especie de alga. Durante la fase de adaptación el alga se somete a cambios metabólicos (producción de enzimas, etc), por lo cual se recomienda usar microalgas que previamente se encuentren en su etapa de crecimiento exponencial a la hora de la puesta en marcha de un reactor biológico.

Figura 10. a, Curva de crecimiento de una población algal en un medio de cultivo; b- variación de la tasa de crecimiento del mismo.



Fuente: Barsanti (2006).

Tabla 6. Descripción de las fases de crecimiento algal en un cultivo tipo batch

Fase	Crecimiento	Interpretación del crecimiento	Descripción
1	Latencia	Cero	Adaptación fisiológica a las condiciones del inóculo.
2	Aceleración	Incremento	Crecimiento poblacional en las condiciones iniciales.
3	Exponencial	Constante	El crecimiento poblacional cambió las condiciones del ambiente.
4	Retardación	Decrecimiento	Aparecen los efectos del cambio de condiciones.
5	Estacionaria	Cero	Uno o más nutrientes (o la luz) escasean hasta el nivel crítico de las células.
6	Declinación	Negativa	La duración de la fase estacionaria o la tasa de decrecimiento dependen directamente del tipo de organismos.

Fuente: Barsanti (2006)

4 METODOLOGÍA

4.1 DISEÑO Y MONTAJE DE UN MÓDULO DE CULTIVO TIPO BATCH

El desarrollo del proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Agua Potable en la Universidad Pontificia Bolivariana, seccional Bucaramanga, ubicada en el municipio de Floridablanca, Santander. La investigación se encuentra en curso, debido a que se desarrollarán otros proyectos a futuro para comparar diferentes tipos de algas en los mismos parámetros que se miden a lo largo de éste proyecto, para finalmente poder determinar las mejores especies para diferentes aplicaciones.

El módulo de cultivo comprende fotobiorreactores de sistema cerrado, con el fin de tener el mayor control de las condiciones de crecimiento y evitar contaminación externa y pérdidas de CO₂ (Pulz, 2001).

Para el diseño del sistema de cultivo se tuvieron en cuenta distintos factores ambientales que influyen en el crecimiento algal. El primero fue la densidad celular, la cual fue determinada a través de la curva de crecimiento algal. Se prestó atención al pH y temperatura como factores críticos, debido a su influencia sobre la concentración de nutrientes disueltos en el agua residual. Otro factor importante fue la fuente de iluminación; la cual se eligió para que no causara daño a nivel celular, ni que emitiera longitudes de onda UV que no fuesen cuantificados. Los fotoperiodos usados se eligieron mediante la revisión bibliográfica de autores que habían tratado previamente el alga a investigar. La adecuación del sistema de gases e iluminación fue un punto clave en el diseño, puesto que debían garantizarse concentraciones mínimas de CO₂, rangos de exposición lumínica y el control de parámetros dinámicos como el burbujeo y la agitación.

4.2 OBTENCIÓN DE MICROORGANISMOS

La cepa de *C. vulgaris* fue suministrada por el laboratorio de Biomasa de la Universidad Industrial de Santander (UIS), cuyo volumen inicial fue de 500 mL, preservado en un frasco Schott Duran translúcido de tapa azul.

La cepa fue conservada en un medio de cultivo Bold Basal (Ver tabla 7) y se almacenó en el laboratorio de Tratamiento de Agua Potable de la Universidad

Pontificia Bolivariana, seccional Bucaramanga, manteniéndose con aireación constante y luz artificial con una iluminancia de 4700 Lux por medio de unas lámparas fluorescentes de luz blanca.

Tabla 7. Composición del medio de crecimiento Bold Basal (BB).

Componente	Solución Stock (g·L ⁻¹ dH ₂ O)	Cantidad Usada	Concentración en Medio Final (M)
(1) NaNO ₃	25.00	10 mL	
(2) CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.50	10 mL	2.94 × 10 ⁻³
(3) MgSO ₄ ·7H ₂ O	7.50	10 mL	1.70 × 10 ⁻⁴
(4) K ₂ HPO ₄	7.50	10 mL	3.04 × 10 ⁻⁴
(5) KH ₂ PO ₄	17.50	10 mL	4.31 × 10 ⁻⁴
(6) NaCl	2.50	10 mL	1.29 × 10 ⁻³
(7) Solución EDTA Alcalina	1 mL		4.28 × 10 ⁻⁴
EDTA	50.00		
KOH	31.00		1.71 × 10 ⁻⁴
(8) 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
(9) Solución de Boro	1 mL	1 mL	
H ₃ BO ₃	11.42		
(10) 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).

4.3 CULTIVO Y CONSERVACIÓN DEL INÓCULO

Cada resiembra se hizo con una proporción de 200 mL de biomasa algal y 800 mL de medio de cultivo, aunque en algunos casos se usaron frascos de 2000 mL, en los cuáles se duplicaron los volúmenes mencionados. Los materiales usados fueron previamente esterilizados, al igual que el medio de cultivo usado. Los cultivos semilla fueron mantenidos durante la totalidad del estudio con aireación constante y luz artificial con una iluminancia de 4700 Lux a una distancia de 5 y 10 cm, por medio de unas lámparas fluorescentes de luz blanca, a temperatura ambiente en un rango de 22 a 26 °C. La iluminancia se midió por medio de un luxómetro digital EXTECH mod. 407026 con 4 tipos de iluminación (tungsteno, fluorescente, de sodio y de mercurio) y una precisión de ± 4 %, una escala de medición de 0 a 50.000 Lux y una tasa de muestreo de 0,4 segundos aproximadamente. Estos inóculos fueron reservados con el fin de proporcionar biomasa en caso de ser necesaria.

El nivel de agua fue compensado con agua destilada para reponer la pérdida por evaporación en los reactores semilla. Periódicamente se le agregó medio de cultivo y fueron resembrados para evitar el agotamiento de nutrientes y el estrés lumínico.

4.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se implementó un diseño factorial 3^2 , el cual consta de dos factores, cada uno con tres niveles. El diseño 3^2 se implementó con el fin de evaluar la significancia de los factores y de cada nivel en la remoción de nutrientes y la producción de metabolitos de valor agregado. Los factores seleccionados fueron concentración inicial de biomasa en el cultivo y la concentración inicial de nutrientes en el agua residual. Los niveles de la concentración de biomasa fueron 100, 400 y 600 mg/L, mientras que los niveles elegidos para la concentración inicial de nutrientes fueron 71,6, 49,8 y 55 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$. Para éste diseño factorial las variables de respuesta o dependientes fueron: concentración final de biomasa en el cultivo, concentración final de los metabolitos de valor agregado, como lo son las proteínas, carbohidratos, lípidos y clorofila a y b, la concentración final de $\text{NH}_3\text{-N}$ y P-PO_4 . Los ensayos se realizaron por quintuplicado, con el fin de tener una mayor replicabilidad. 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 respuesta. Posteriormente se hizo un análisis lineal general de medidas repetidas para evaluar los cambios de las variables de respuesta en el tiempo.

4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.5.1 Determinación de biomasa en peso seco. La metodología usada para la determinación de la biomasa en peso seco fue una variación de la metodología propuesta por Moheimani (2013), que contempla la estandarización del crecimiento algal por medio de una curva de crecimiento que relaciona el crecimiento en peso seco y la absorbancia de una muestra de algas de 1 cm³ por medio de una medición espectrofotométrica, la cual se basa en la interacción de la transmitancia (nm) del haz de luz con la absorbancia de una cantidad de microalgas correspondiente a la muestra problema (número de células/mL). La curva se realizó por duplicado, y el resultado es una ecuación que determina la concentración de las células del cultivo. Para la determinación de biomasa en peso seco se utilizaron filtros GF/C. Se tomaron 1 mL de alícuota de algas en un filtro que se encontrase completamente seco y previamente pesado y se secó el filtro con la muestra durante 1 hora a una temperatura de 104 °C, posteriormente se llevó a desecador durante 30 minutos y se pesó nuevamente en una balanza analítica. El proceso se realizó diariamente durante 21 días, durante ese mismo tiempo se tomaron mediciones diarias de absorbancia a 500, 550, 580 y 610 nanómetros en un espectrofotómetro Thermo serie GENESYS 10UV. Para el cálculo del peso seco se utilizó la siguiente relación:

El peso seco (DW) = (Peso del filtro seco con la muestra) – (Peso del filtro previamente secado).

Para evaluar el crecimiento del cultivo de microalgas se calcularon la tasa de crecimiento y la tasa específica de crecimiento por medio de las siguientes ecuaciones:

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

En donde N_1 y N_2 son las densidades celulares y t_1 y t_2 son los tiempos.

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

4.5.2 Determinación de la producción de clorofila. Para la determinación de la producción de clorofila se siguió una variación de la metodología propuesta por N.R Mohemani (2013). Se centrifugaron 10 ml de muestra a 3600 rpm durante 10 minutos, al pellet formado en el fondo del tubo, se le agregaron 10 mL de etanol al 100%, se puso a baño maría por 15 minutos, se dejó enfriar 5 minutos y se procedió a centrifugar nuevamente la muestra a 3600 rpm por 10 minutos para remover cualquier material particulado. Posteriormente se midió la absorbancia al sobrenadante a diferentes longitudes de onda para aplicar las ecuaciones correspondientes. Las longitudes de onda fueron 664 nm, 647 nm, 630 nm y 691 nm en un espectrofotómetro Thermo serie GENESYS 10UV. Las ecuaciones usadas fueron:

(a) Ecuaciones de Jeffrey y Humphrey (1975):

$$\text{Clorofila } a = 11,9E_{664} - 1,93E_{647}$$

$$\text{Clorofila } b = 20,36E_{647} - 5,50E_{664}$$

(b) Ecuaciones de Ritchie (2008) (2006):

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

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

4.5.3 Determinación de la producción de carbohidratos. Para la determinación del contenido de carbohidratos se realizó una variación al método del ácido fenol-sulfúrico planteado por Kochert (1978). Se usó una solución de glucosa como stock de 0,1 g. L⁻¹ para la curva estándar de carbohidratos, una solución stock de fenol 50 g. L⁻¹, una solución al 1M de H₂SO₄ y H₂SO₄ concentrado.

La muestra de algas se sometió a una extracción mediante centrifuga a 3600 rpm por 10 minutos, al pellet resultante se le agregaron 5 mL de H₂SO₄ 1M, se procedía a mezclarlo en vórtex y se sometía a baño maría durante 1 h. Posteriormente se dejaba reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos y se centrifugaba 3600 rpm por 10 minutos. Se extraían 2 mL de sobrenadante y se colocaban en un tubo de vidrio resistente a ácido, al cual se le agregaba 1 mL de solución de fenol, se agitaba por medio del vórtex, se le agregaban 5 mL de H₂SO₄ concentrado, se

agitaba nuevamente con el vórtex y se dejaba reposar 30 minutos hasta enfriarse. Una vez transcurrido el tiempo se mezclaba la muestra manualmente y se procedía a medir la absorbancia a 485 nm en un espectrofotómetro Thermo serie GENESYS 10UV, en el cual se tenía la curva de calibración previamente realizada con glucosa.

4.5.4 Determinación de la producción de lípidos. Para la determinación de lípidos se utilizó una modificación del método de Bligh & Dyer (1959), el método de extracción usado fue la centrífuga a 3600 rpm por 10 minutos. Al pellet resultante de la extracción se le agregó 5,7 mL de reactivo de Bligh & Dyer, compuesto por metanol: cloroformo: agua desionizada en una proporción 2:1:0,8. Posteriormente se mezcló por medio del vórtex hasta lograr resuspender la biomasa, se procedió a centrifugar la muestra y el sobrenadante se transfirió a un tubo de vidrio de 20 mL, para la segunda extracción se tomó el pellet de la anterior extracción, se le agregó de nuevo 5,7 mL de solvente y se llevó a vórtex hasta que se resuspendió el material, luego se sometió a centrifugación la muestra bajo los mismos parámetros de la primera extracción y el sobrenadante se almacenó en el mismo tubo de vidrio. Los sobrenadantes se mezclaron bien mediante vórtex. Se agregaron 3 mL de agua desionizada al tubo de vidrio y se llevó a vórtex, luego se agregaron 3 mL de cloroformo al tubo de vidrio y se llevó a vórtex nuevamente. La muestra se refrigeró a 5°C durante 24 horas en la oscuridad para la fase de separación. Una vez las 24 horas finalizaron se procedió a retirar la capa de etanol y agua (la fase superficial) por medio de una pipeta Pasteur. La capa de cloroformo (fase inferior) fue trasvasada a una caja Petri previamente llevada a peso constante. La caja Petri fue sometida a extracción continua mediante una cabina de extracción hasta que la capa de cloroformo se había evaporado por completo dejando en la caja Petri el contenido de lípidos. La caja Petri fue almacenada en un desecador y pesada posteriormente en una balanza analítica. El contenido de lípidos fue determinado por la siguiente expresión:

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

4.5.5 Determinación de nitrógeno. La determinación del contenido de Nitrógeno amoniacal se hizo por medio del Grow Master para el análisis de Nutrientes HI 83225 de HANNA instruments. La metodología seguida fue la propuesta por el manual de instrucciones del equipo, que consiste en una adaptación del método Nessler, D1426-92 (Wirth & Robinson, 1933) tomado de ASTM Manual of Water and Environmental Technology. La reacción llevada a cabo por los reactivos A y B tornaron la muestra de un color amarillento que luego fue medido en el equipo mediante un diodo en una fotocelda.

Los reactivos usados fueron el reactivo A, HI 93715A-0 que es una solución acuosa y el reactivo B, HI 93715B-0 compuesto por hidróxido de sodio (> 5% - < 20%) y Yoduro de Mercurio (II) (> 2.5% - < 10%) (HANNA Instruments, 2008). La muestra utilizada era el sobrenadante de la alícuota de alga centrifugada a 3600 rpm por 10 minutos. A la muestra diluida, se le agregaban 4 gotas de reactivo A, se agitaba, 4 gotas de reactivo B, se agitaba y se introducía en el equipo, en donde transcurrían 3 minutos y medio de reacción antes de la lectura.

4.5.6 Determinación de ortofosfatos. La determinación de fósforo se hizo mediante la medición de los ortofosfatos presentes en las muestras por medio del método colorimétrico del ácido Vanadomolibdofosfórico 4500-P C (APHA, 2005). Para dicho procedimiento se preparó el reactivo vanadato-molibdato mediante la mezcla de dos soluciones, una solución (A) para la cual se disolvieron 25g de molibdato de amonio, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, en 300 mL de agua destilada, una solución (B) para la cual se diluyeron 1,25g de metavanadato de amonio, NH_4VO_3 mediante calentamiento en 300 mL de agua destilada. Se dejó enfriar y se le agregaron 330 mL de HCl. Al mezclarse las soluciones (A) y (B) se aforaron a 1L. Para la curva de calibración se utilizaron disoluciones de una solución estándar de fosfatos, que se preparó diluyendo en agua destilada 219,5 mg de KH_2PO_4 anhidro y se diluyó a 1000 mL; la concentración de la solución patrón fue: 1 mL = 50,0 $\mu\text{g PO}_4^{3-}\text{-P}$.

La muestra utilizada era el sobrenadante de la alícuota de alga centrifugada a 3600 rpm por 10 minutos. La medición se realizó tomando 35 mL de muestra a la cual se le agregaron 10 mL de reactivo vanadato-molibdato y se aforó en un balón de 50mL con agua destilada. Se dejó reposar durante 10 minutos y se midió en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 470nm en el espectrofotómetro. Para los patrones el procedimiento fue el mismo, salvo que se usaron 35 mL de solución de $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$.

4.5.7 Determinación de la producción de proteínas. Para la medición de la producción de proteínas se usó una variación de la metodología planteada por Lowry et al (1951), para la cual se preparó el reactivo de Biuret con las siguientes soluciones stock:

(a) $\text{Na}_2\text{CO}_3 = 200 \text{ g.L}^{-1}$

(b) $\text{NaOH} = 40 \text{ g.L}^{-1}$

(c) NaK Tartrato = 200 g.L^{-1}

(d) $\text{CuSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O} = 50 \text{ g.L}^{-1}$

Para la preparación del reactivo se usaron las soluciones stock en las siguientes proporciones: 20 mL de (a) + 20 mL de (b) + 160 mL de agua desionizada, 2 mL de (c) + 2 mL de (d). La curva estándar de proteínas se hizo a partir de una solución stock de suero de albúmina bovina (BSA): $2,5 \text{ mg BSA L}^{-1}$. El procedimiento para las soluciones patrón fue igual al de la alícuota de alga, la cual se sometió a la extracción por centrifuga a 3600 rpm por 10 minutos (en el caso de la alícuota se agregaron 5 mL de Biuret adicionalmente). Posteriormente se tomaron 5 mL de reactivo de Biuret y se agregaron al tubo de ensayo con el pellet o la solución BSA. El tubo con la muestra se sometió a baño maría durante 1h, posteriormente se agregaron 0,5 mL de Folin-fenol a la muestra aún caliente mientras se mezclaba mediante el vórtex, después la muestra se sometió a un baño de hielo durante 20 minutos y luego se dejó reposar a temperatura ambiente por 15 minutos. La muestra luego fue centrifugada a 3600 rpm por 10 minutos y el sobrenadante fue extraído para medirle la absorbancia a una longitud de onda de 660nm en el espectrofotómetro.

4.5.8 Determinación de la concentración de nitratos. Para la determinación de la concentración de nitratos se utilizó el método de proyección espectrofotométrica ultravioleta 4500-NO₃-B (APHA, 2005). Para el método se preparó una solución stock de nitrato, para la cual se secó nitrato de potasio (KNO₃) en un horno a 105°C por 24 h; Se disolvieron 0,7218 g en agua hasta llevarlo a 1000 mL; 1.00 mL = 100µg NO₃⁻-N, con la solución preparada se realizaron diluciones de 10 µg. Se usó también una solución de HCl, 1N. Se realizaron patrones de 0 a 7 mg/L de NO₃⁻-N y se creó una curva de absorbancia tomando como el valor cero al agua destilada y tomando como longitudes de onda de medida 220nm y 275nm con el fin de determinar la interferencia debido a la materia orgánica disuelta. Mediante el procedimiento hasta aquí explicado se realiza una curva, cuya ecuación permitirá conocer la concentración de nitratos a partir de la resta de las absorbancias. Se utilizó un espectrofotómetro UV-VIS DR5000 HACH con una celdilla de cuarzo para permitir el paso de luz UV.

5.1 DISEÑO DE UN MÓDULO DE CULTIVO TIPO BATCH A ESCALA LABORATORIO

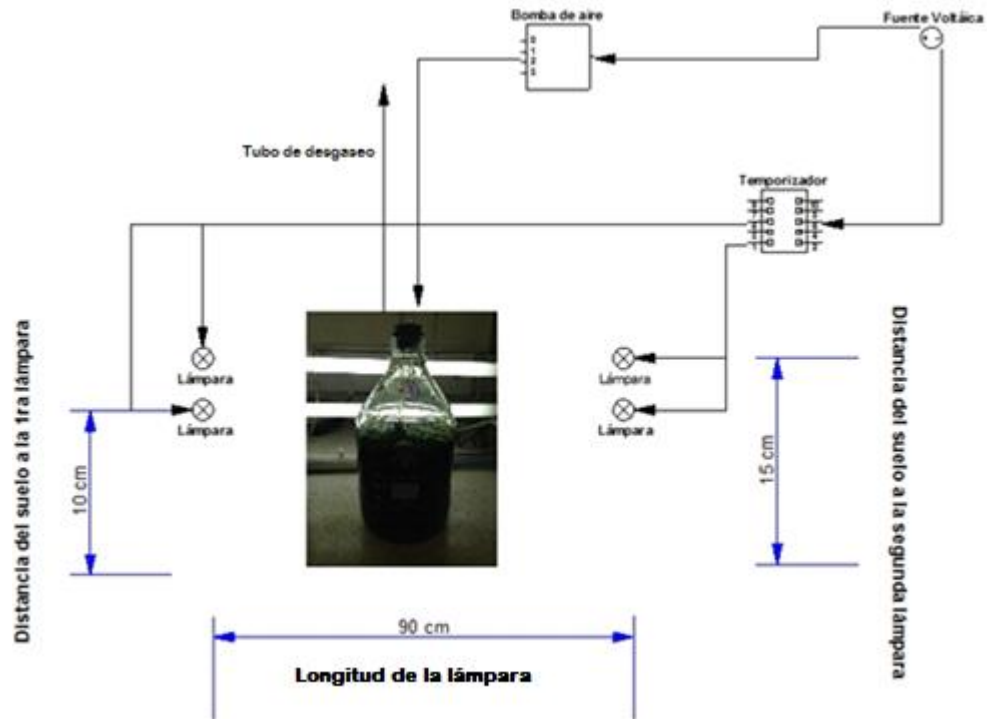
El diseño se hizo tomando como base un fotobiorreactor tubular vertical, con un dispositivo de desgaseado, sin agitación mecánica impulsado por un soplador de aire. La agitación se realizó mediante un sistema de inyección de aire desde el fondo (Ugwu, 2007).

El montaje experimental del módulo de cultivo tipo batch a evaluar contó con inyección de aire e iluminación artificial. El CO₂ fue aportado por una bomba de aire, a su vez se posicionó un filtro de material particulado para evitar contaminación externa en los fotobiorreactores, mientras que la luz provenía de dos lámparas fluorescentes de 90 cm cada una ubicadas 5 y 10 cm respectivamente. La inyección de aire se realizó 24 horas al día, 7 días a la semana, para la luz se manejaron fotociclos de luz/oscuridad de 12/12 horas, por medio de un temporizador.

Las mediciones realizadas con el luxómetro mostraron que la iluminación natural en el laboratorio era muy baja, por lo cual se consideró despreciable. Los valores de medición del luxómetro reportaron un nivel de iluminación o luminancia promedia de 4700 Lux (lm/m²) ($\approx 90 \mu\text{mol.quanta/m}^2.\text{s}$) aproximadamente. Se usaron frascos Schott Duran translúcidos de tapa azul de 1000 mL (101 mm de diámetro, 230 mm de altura) para el montaje de los fotobiorreactores. Los experimentos fueron conducidos en un laboratorio a temperatura ambiente ($27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) por 10 días, periodo durante el cual no recibió ningún aporte de nutrientes adicional. En la figura 11 se presenta el diagrama esquemático del montaje experimental que se usó durante el estudio.

Para el sistema de iluminación se diseñó una estructura en forma de arco metálico de acero inoxidable con dos luces frías fluorescentes, como se muestra en la figura 12, con el fin de brindar la mayor cantidad de luz para que fuese absorbida por el cultivo. La luminancia es una magnitud que expresa la densidad del flujo lumínico que incide sobre una superficie. Para que las condiciones de iluminancia cumplieran los requisitos del cultivo, se realizaron mediciones en la superficie del reactor.

Figura 11. Diagrama esquemático del montaje experimental para el presente estudio



Fuente: Autor

Se diseñó un sistema de iluminación en el cual se fijaron dos focos tipo tubo fluorescente trifósforo lineal T8 de 30W con capacidad de 2350 Lumens (lm) de 26 mm de diámetro, 895 mm de largo, temperatura de color de 6500 (°k) exento de radiación UV marca OPALUX que brinda una vida nominal de 20000 horas, a un marco de acero inoxidable. Inicialmente se manejó una altura de 15 y 25 cm con respecto a la base, pero posteriormente se realizaron ajustes para lograr una mejor iluminancia, por lo cual se decidió usar una altura de 5 y 10cm, como se puede ver en la figura 13.

Figura 12. Montaje preliminar del sistema de iluminación



Fuente: Autor

Figura 13. Configuración final del sistema de iluminación en funcionamiento.

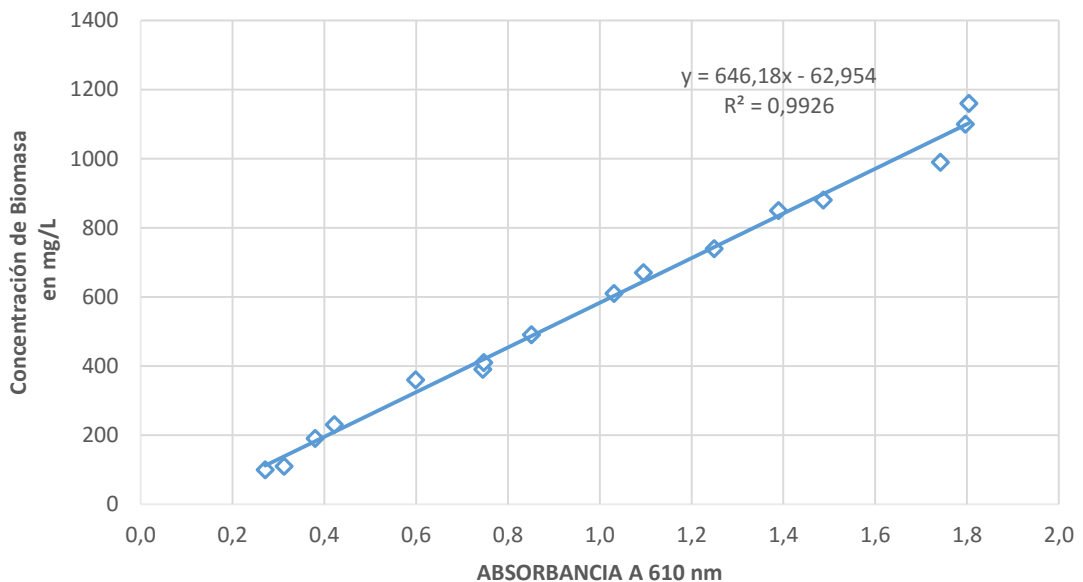


Fuente: Autor

5.2 CRECIMIENTO DE LA BIOMASA

Para la evaluación del crecimiento de la biomasa a través del tiempo en el estudio se realizaron graficas de correlación entre la concentración de algas expresada en su absorción a una longitud de onda determinada vs tiempo y la concentración de la biomasa seca vs tiempo. El resultado de relacionar las tablas mencionadas anteriormente fue una ecuación que relacionó la concentración de biomasa en peso seco y la absorbancia, la cual fue evaluada a 4 longitudes de onda. Sin embargo se eligió trabajar con la longitud de onda de 610 nm pues fue la que presentó un comportamiento linealizado con una mejor constante de correlación R^2 . En la figura 14 se muestra la curva de correlación entre la concentración de biomasa medida como peso seco y la absorbancia a 610 nm. Como se puede apreciar, los valores de correlación describieron un comportamiento lineal, el cual se tomó como base para estandarizar los valores de absorbancia y poder relacionarlos con el crecimiento en peso seco de los cultivos experimentales.

Figura 14. Curva de correlación entre la concentración de biomasa y la absorbancia



Fuente: autor

Como se puede observar la relación de crecimiento vs absorbancia tiene un comportamiento lineal, el cual se adapta a los modelos reportados anteriormente

por diversos autores para algas verdes (Abdel-Raoufa, 2012) (Becker, 1994) (Bold & Wynne, 1978).

5.3 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE BIOMASA EN LA REMOCIÓN DE NUTRIENTES

La remoción de nutrientes se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Remoción} = \frac{\text{Concentración inicial} - \text{Concentración final}}{\text{Concentración inicial}} * 100$$

La remoción promedio de nitrógeno y fósforo según la concentración inicial de biomasa puede verse a continuación en la tabla 8 y 9 respectivamente:

Tabla 8. Porcentaje de remoción de NH₃-N según la concentración inicial de biomasa

Niveles	% Remoción de NH ₃ -N	Desv. ESTA
100 mg/L	78,5	8,3
400 mg/L	81,7	14,8
600 mg/L	86,2	7,4

Fuente: autor

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

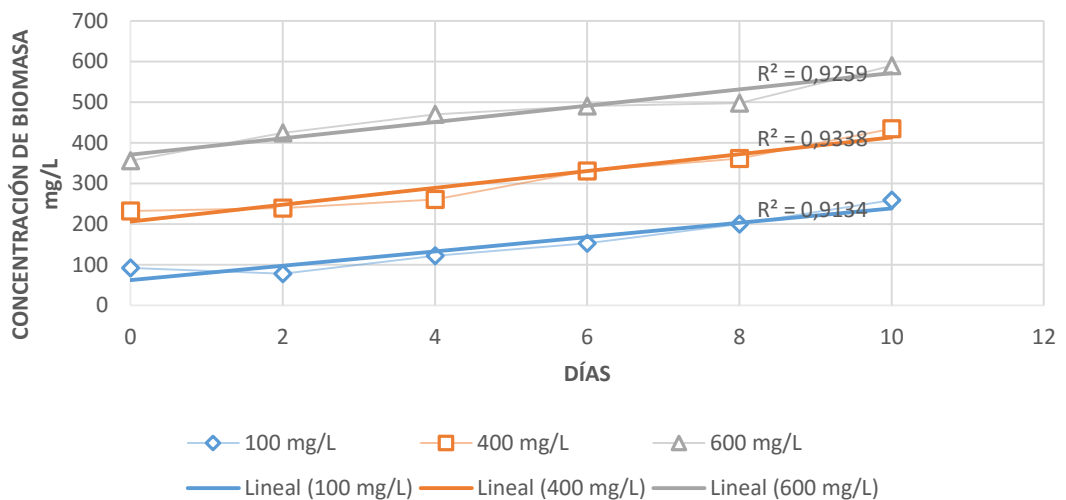
Niveles	% Remoción P-PO ₄	Desv. ESTA
100 mg/L	56,3	17,6
400 mg/L	43,9	11,4
600 mg/L	38,8	12,5

Fuente: autor

Como se puede observar en la tabla 8, la mejor remoción de $\text{NH}_3\text{-N}$ se obtuvo a 600 mg/L de biomasa inicial en peso seco, lo cual nos indica que la remoción de nitrógeno estuvo ligada con los requerimientos nutricionales por parte del alga para su sustento, pues al ser mayor la densidad de algas en el cultivo fue mayor la actividad fotosintética. La tabla 9 muestra una remoción de ortofosfatos superior en los biorreactores que tenían una concentración inicial de 100 mg/L de biomasa seca, es decir que los porcentajes de remoción de ortofosfatos fueron inversamente proporcionales a la concentración de biomasa inicial, a diferencia del nitrógeno que es directamente proporcional. El comportamiento de la concentración de nitrógeno y ortofosfatos con relación a la concentración inicial de biomasa se estudiará más adelante en éste capítulo.

En la figura 15 se presenta la dinámica de crecimiento de la biomasa en el agua residual a diferentes concentraciones de biomasa inicial.

Figura 15. Comportamiento de la concentración de Biomasa a diferentes concentraciones iniciales de biomasa



Fuente: Autor

Como se puede observar, todas las concentraciones siguen el mismo patrón de crecimiento con una tendencia lineal. Las concentraciones iniciales tienen relación directa con las concentraciones finales en los fotobiorreactores después de 10 días, lo cual se puede confirmar con el ANOVA presentado en el anexo A, el cual muestra que todos los factores (biomasa, nutrientes y la interacción biomasa*nutrientes)

tienen una significancia alta ($p < 0,05$). A continuación, en la tabla 10, se presentan los resultados de la tasa de crecimiento en el cultivo a diferentes concentraciones iniciales de biomasa, con el fin de poder apreciar la diferencia en el crecimiento de las microalgas en relación con su concentración inicial.

Tabla 10. Tasas de crecimiento en el cultivo a diferentes concentraciones iniciales de biomasa

Concentración Mg/L	K promedio	μ Promedio	T gen Promedio
100	0,10	0,14	4,78
400	0,06	0,08	7,77
600	0,04	0,06	10,11

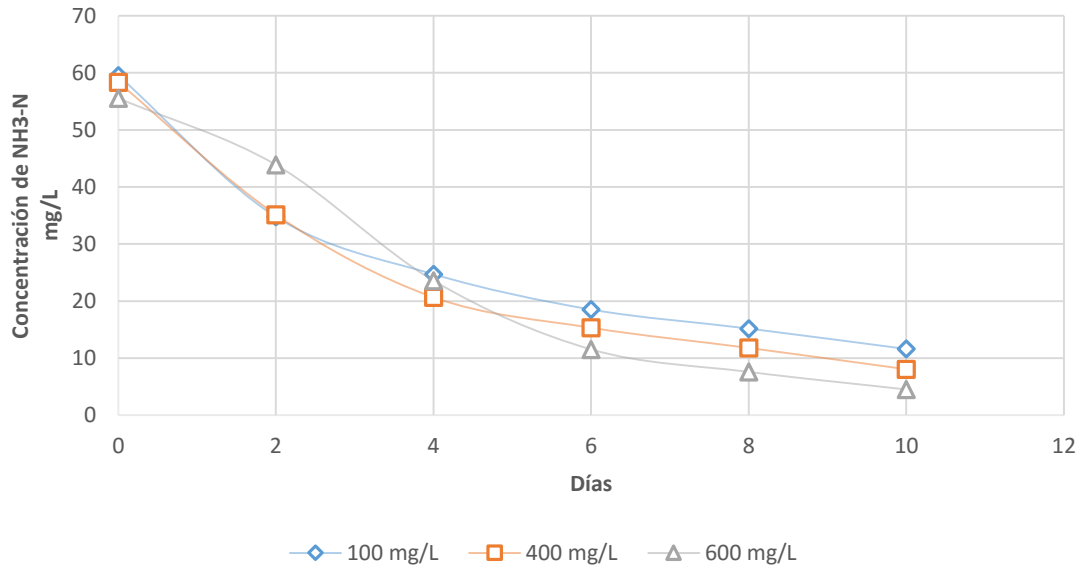
Fuente: Autor

La constante de crecimiento promedio fue mayor en la concentración de 100 mg/L, la cual es la menor concentración inicial de biomasa; la tasa de crecimiento específico también fue mayor y por tanto el tiempo de generación fue menor. Todo estos resultados apuntan a una menor competencia entre los individuos, permitiendo aumentar la actividad metabólica y facilitando el crecimiento, es decir, el crecimiento específico del alga es inversamente proporcional a la concentración inicial de biomasa en el fotobiorreactor

Los niveles iniciales de amonio encontrados en el agua residual fueron altos en comparación con otros experimentos que se llevaron a con otras aguas residuales domésticas (Zhijie, 2013, Changfu, 2012, Ruiz Martinez, 2012), debido las características del agua residual y a la conversión de nitrógeno orgánico en el tratamiento secundario (Travieso, 2002). El agua residual usada es un agua institucional proveniente de una universidad con horario diurno, cuyo mayor aporte se deriva de las baterías de baños (e inodoros), lo cual hace que los niveles de amonio en el agua sean mayores que en un agua doméstica típica.

En la figura 16 puede observarse el comportamiento de la concentración de $\text{NH}_3\text{-N}$ en el agua residual a diferentes concentraciones de biomasa inicial, en la cual se aprecia que el comportamiento de la concentración de nitrógeno es similar para todas las concentraciones iniciales de biomasa, sin diferencias resaltables.

Figura 16. Concentración de nitrógeno amoniacal a diferentes concentraciones iniciales de biomasa



Fuente: Autor

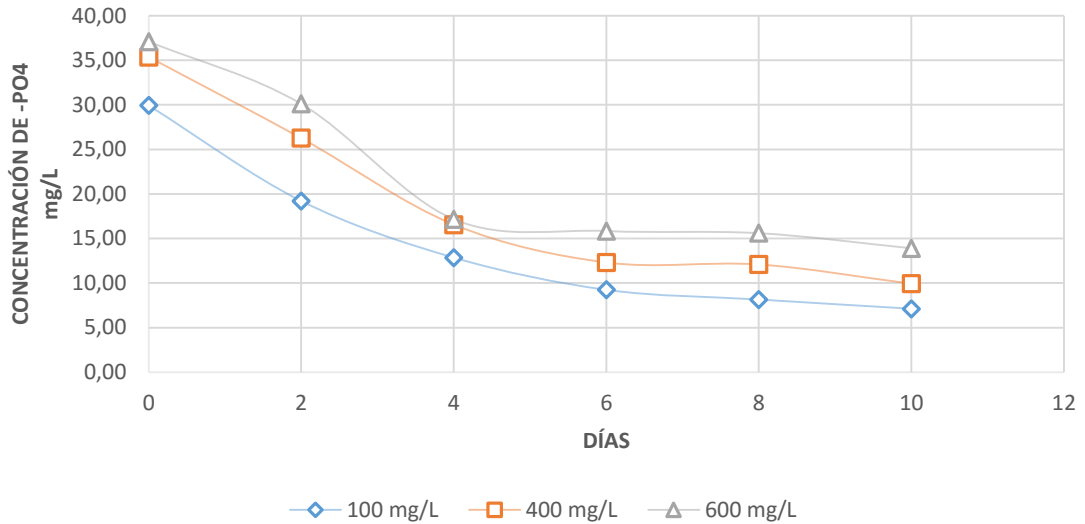
5.3.1 Influencia de la concentración inicial de biomasa en la remoción de nitrógeno. El nitrógeno es un macronutriente importante para la producción de biomasa, se ha estimado que representa entre el 1 al 10% del peso seco de la microalga (Becker, 1994), por ende hay una relación directa entre la cantidad de biomasa y la remoción de nitrógeno y de la remoción de nitrógeno y la cantidad de nitrógeno disponible. Sin embargo, se puede apreciar en la anexo B que la biomasa inicial no posee significancia en la remoción de nitrógeno ($P > 0,05$), lo cual concuerda con lo dicho por L. Barsanti (2006), quien reportó que las microalgas que encuentran aún en etapa de adaptación se somete a cambios metabólicos, durante los cuales la asimilación de nutrientes, división celular y crecimiento algal pueden verse afectados por los niveles de nitrógeno en el medio, ya que los altos niveles de amonio pueden ser tóxicos para el alga restringiendo la fotosíntesis y la producción de oxígeno (Pearson, 1992). Debido a ello, la biomasa resulta un factor significativo desde el segundo día y hasta el cuarto día solamente, momento después del cual los niveles de nutrientes han disminuido hasta concentraciones en las que las algas deben someterse a un mayor estrés para lograr asimilarlo, lo cual hace que la biomasa ya no tenga significancia ($p < 0,05$) para los días posteriores.

5.3.2 Influencia de la concentración inicial de biomasa en la remoción de ortofosfatos. El fósforo es un nutriente esencial para el crecimiento algal, así como para muchos procesos celulares como la síntesis de ácidos nucleicos y la transferencia de energía (Chen, 2011). En un ambiente sin fósforo las microalgas no pueden reproducirse, asimismo la producción de biomasa se ve beneficiada por concentraciones de ortofosfatos moderadamente altas, siempre y cuando no se llegue a los límites tóxicos para el alga, los cuales varían de especie a especie (Barsanti, 2006). Debido a ello todos los factores tuvieron significancia ($p < 0,05$), como puede apreciarse en el anexo C, lo cual quiere decir que la remoción de ortofosfatos en el agua estuvo determinada por la concentración inicial de biomasa, la concentración inicial de $\text{NH}_3\text{-N}$ y la relación entre biomasa y nutrientes durante la duración total del experimento.

La figura 17 muestra el cambio en la concentración de ortofosfatos con el tiempo. Se puede observar que en el día 4 hubo un cambio en la pendiente, lo cual sugiere que a partir de éste día los ortofosfatos fueron fijados por el alga a una menor velocidad, lo cual se asemeja a lo reportado por Lloyd et al (2003).

La remoción de ortofosfatos lograda no fue alta, de ahí que se registraran niveles de salida altos si se comparan con la remoción de nitrógeno. El aumento en la acumulación de ortofosfatos en la célula se logra mediante un mecanismo que se activa al someter la célula a estrés de nutrientes (Kaplan, 1986). Las algas usadas en este estudio no se encontraban en condición de escases de nutrientes, debido a ello la remoción no alcanzó niveles más altos, por lo que se esperarían mejores resultados bajo periodos con cantidades mínimas de nutrientes previos (Riegman, 2000), lo cual podría ser efectivo para evitar la colmatación de nutrientes en el alga. Las algas tienen la habilidad de fijar una cantidad mayor al fósforo que necesitan para sus actividades metabólicas. Sin embargo, en éste estudio no se lograron esos niveles de remoción debido a las relativamente altas concentraciones de fósforo en el efluente anaerobio y a las relaciones N:P, lo cual cuerda con lo reportado por (Xu, 2014).

Figura 17. Concentración de ortofosfatos en agua residual a diferentes concentraciones iniciales de biomasa



Fuente: Autor

5.4 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE NITRÓGENO EN LA REMOCIÓN DE NUTRIENTES

A continuación se muestran las tablas 11 y 12 en donde se presentan los porcentajes de remoción de nitrógeno amoniacal y ortofosfatos respectivamente, según la concentración inicial de $\text{NH}_3\text{-N}$:

Tabla 11. Porcentaje de remoción de $\text{NH}_3\text{-N}$ según la concentración inicial de nutrientes

Niveles	71,6 mg/L	49,8 mg/L	55,6 mg/L
% Remoción de $\text{NH}_3\text{-N}$	71,3	83,9	91,2
Desv. ESTA	6,3	6,1	3,3

Fuente: Autor

Tabla 12. Porcentaje de remoción de P-PO₄ según la concentración inicial de nutrientes

Niveles	71,6 mg/L	49,8 mg/L	55,6 mg/L
% Remoción de P-PO ₄	33,3	53,0	52,7
Desv. ESTA	3,7	20,3	6,1

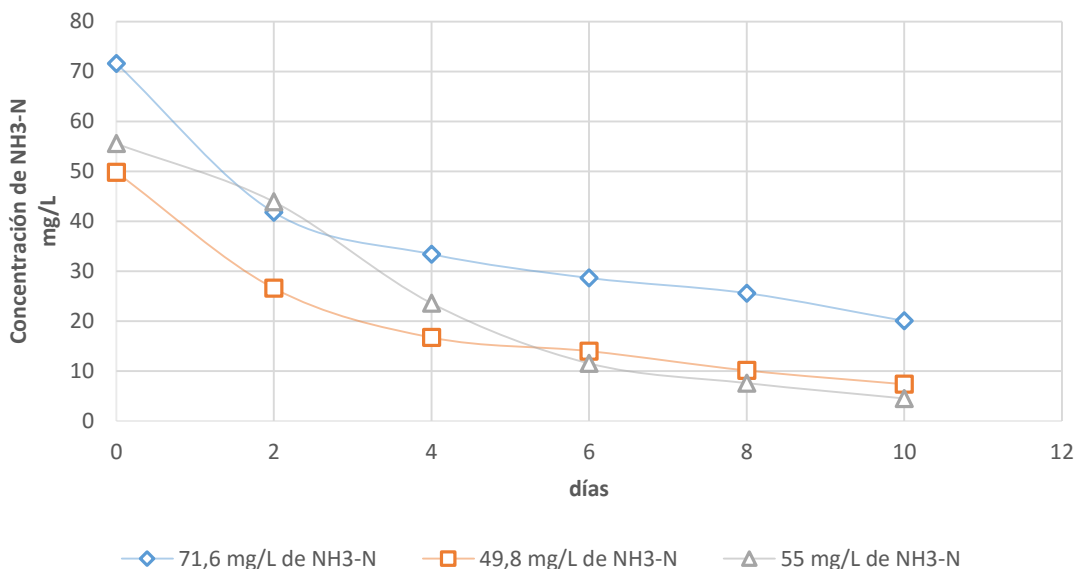
Fuente: Autor

Como se puede observar, el porcentaje de remoción de nitrógeno es mayor en la concentración media, lo cual nos indica que posiblemente bajo dicha concentración se haya presentado una adaptación más rápida de las algas. Sin embargo, en cuanto a la remoción de fósforo se puede observar que la remoción más alta se logró en la concentración inicial de NH₃-N más baja, contrario a lo esperado ya que a mayor concentración de N mayor es la remoción de P (Beuckels, 2015).

5.4.1 Influencia de la concentración inicial de nutrientes en la remoción de nitrógeno. Para la determinación de la influencia de la concentración inicial de nutrientes en la remoción de nitrógeno se tomó en cuenta como variable de respuesta la concentración de NH₃-N a través del tiempo. Sin embargo, para la concentración inicial de nutrientes solo se hará referencia al nitrógeno puesto que tuvo mayor variabilidad y un comportamiento más constante que el fósforo. En la figura 18 se presenta el comportamiento del nitrógeno amoniacal teniendo en cuenta los valores iniciales de nitrógeno.

Las microalgas tienen una relación de nutrientes que fue estimado por Redfield (1958) para algas de agua salada, el cual fue de 106:16:1 C:N:P expresado en moles. Sin embargo, las relaciones para algas de agua dulce son variables y pueden verse afectados por el aporte de los nutrientes en el medio. Las microalgas tienen la capacidad de modificar su contenido de nitrógeno y fósforo para ajustarse a las condiciones del ambiente, logrando una concentración alta cuando los nutrientes del medio son altos y baja cuando dichos nutrientes empiezan a decaer (Geider, 2002).

Figura 18. Concentración de nitrógeno amoniacal a diferentes concentraciones iniciales de nitrógeno



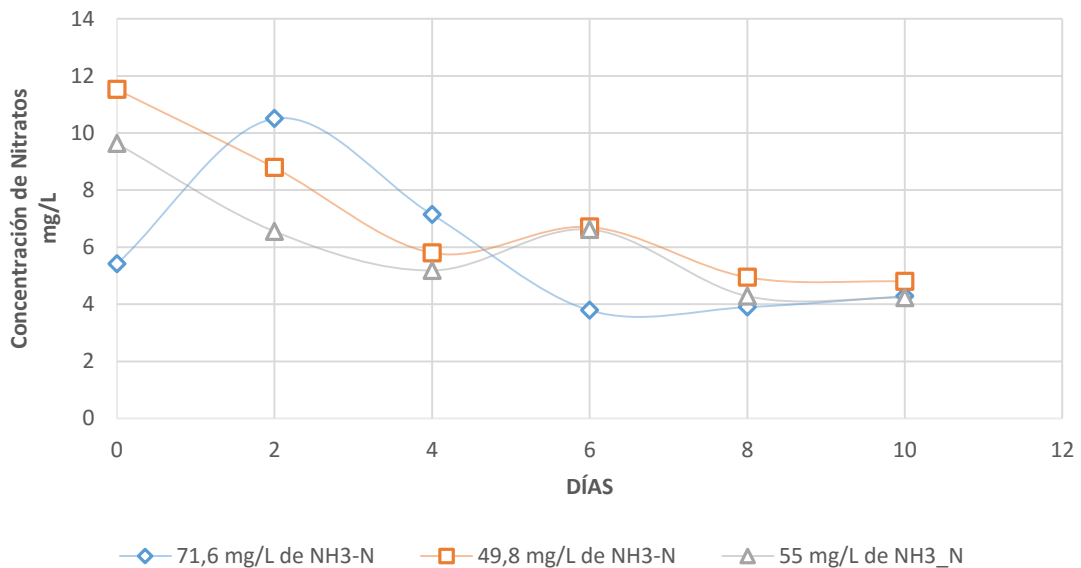
Fuente: Autor

La concentración de nitrógeno en el presente estudio estuvo definida por la concentración inicial de nitrógeno amoniacal en el medio, lo cual puede comprobarse con un factor de significancia ($p < 0,05$) para todos los días del experimento, lo cual concuerda con lo reportado por Beuckels (2015). La remoción de nitrógeno depende de la cantidad de nutrientes en la biomasa de la microalga, que a su vez depende de la cantidad de nutrientes que se tengan disponibles en el medio de cultivo.

Una forma de evaluar indirectamente la fijación de nitrógeno en la biomasa del alga es por medio del seguimiento de la concentración de nitratos. Los nitratos son un compuesto químico que puede ser transformado por organismos quimiolitotrofos como Nitrosomonas y Nitrobacter, a partir de nitrógeno amoniacal o nitritos (Lolmede, 2000); a partir de la medición de los nitratos se puede tener un panorama claro de la fijación de nitrógeno, al poder medir la transformación de nitrógeno que se pueda llevar a cabo por las bacterias previamente mencionadas. Como se puede ver en la figura 19, la concentración de nitratos disminuyó en el tiempo, lo cual quiere decir que el proceso de fijación de nitrógeno en la biomasa algal se está llevando a cabo. Otra manera de comprobarlo es por el aumento en la concentración de proteínas al interior del alga, la cual será explorada más adelante.

Se puede observar que solo la concentración de 71,6 mg/L de $\text{NH}_3\text{-N}$ aumentó del día cero al día dos, posteriormente disminuyendo su concentración. Lo anterior se debe a que hasta el día 2 las algas no estaban fijando el nitrógeno sino transformando el nitrógeno del medio en nitratos debido a su abundancia y luego empezó el proceso de fijación cuando la concentración de $\text{NH}_3\text{-N}$ comenzó a disminuir, permitiendo al alga fijarlo en su biomasa en forma de proteínas principalmente. Luego del segundo día se produce una disminución de la concentración de nitratos en todos los fotobiorreactores, observándose un leve aumento el día 6, en los reactores correspondientes a las concentraciones iniciales más bajas, volviendo a decaer posteriormente. Éste pico de producción se debe a un cambio en la actividad metabólica debido a que los niveles de nutrientes decayeron hasta el punto en que el nitrógeno se volvió el nutriente limitante.

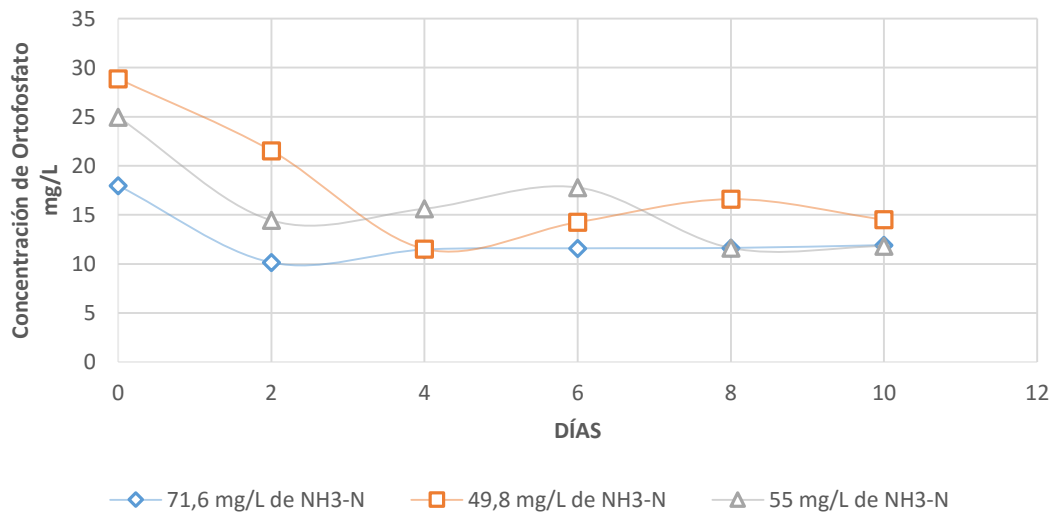
Figura 19. Concentración de nitratos a diferentes concentraciones iniciales de nitrógeno



Fuente: Autor

5.4.2 Influencia de la concentración inicial de nutrientes en la remoción de fósforo Para la remoción simultanea de nitrógeno y fósforo es necesario que la microalga ajuste las concentraciones internas de N y P que componen su biomasa con las concentraciones que se suministran en el sustrato, en este caso el agua residual, como lo afirma Beuckels et al (2015). La concentración de fósforo en la microalga es del 0,03% al 3% en peso seco (Reynolds, 2006). A continuación se puede observar en la figura 20 el comportamiento de la concentración de ortofosfatos a diferentes concentraciones iniciales de nitrógeno.

Figura 20. Concentración de ortofosfatos a diferentes concentraciones iniciales de nitrógeno



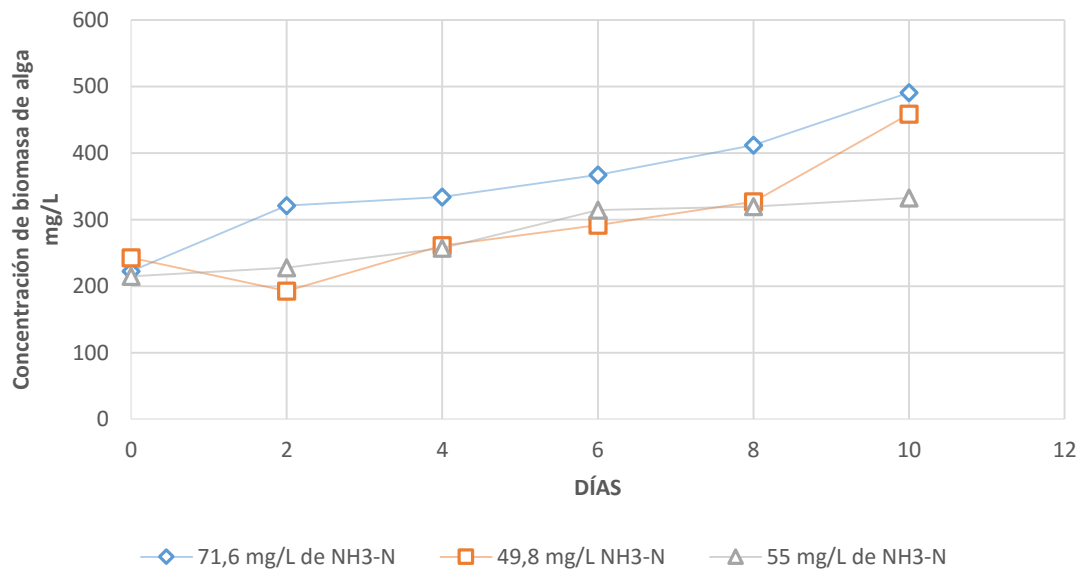
Fuente: Autor

Como se puede observar, las relaciones de nitrógeno y fósforo no fueron constantes pues la mayor concentración inicial de nitrógeno tuvo la menor concentración de inicial ortofosfatos, y la menor concentración inicial de nitrógeno tuvo la mayor concentración inicial de ortofosfatos. Sin embargo, en cada una de las concentraciones iniciales de nitrógeno hubo remoción de ortofosfatos. La remoción se vio afectada por la concentración inicial de nitrógeno según la significancia de los datos, con una significancia ($p < 0,05$) para cada uno de los factores (nitrógeno, biomasa y la interacción nitrógeno*biomasa). El comportamiento de la concentración de ortofosfatos en el tiempo revelan un punto de saturación de las

algas, luego del cual la producción de ortofosfatos fue mayor que la fijación del mismo, de nuevo concordando con lo reportado por Lloyd et al (2003).

5.4.3 Influencia de la concentración inicial de $\text{NH}_3\text{-N}$ sobre la biomasa. La concentración inicial de nutrientes puede influir tanto positiva como negativamente en el crecimiento algal, pues si bien es una fuente de nutrientes, niveles altos de nitrógeno pueden ser tóxicos para las microalgas (Barsanti, 2006) causando así problemas en su metabolismo. En la figura 21 muestra el comportamiento de la biomasa algal dependiendo de la concentración inicial de nitrógeno amoniacal.

Figura 21. Concentración de microalgas según la concentración inicial de $\text{NH}_3\text{-N}$



Fuente: Autor

Como puede notarse, en este caso la concentración inicial de nutrientes no fue lo suficientemente alta para llegar a los umbrales de toxicidad (Becker, 1994), por lo que desde el día uno empezaron a reproducirse las algas, sin presentarse una fase de aclimatación prolongada. Así mismo no se logró llegar a un estado de escases de nutrientes lo suficientemente prolongado para observar un cambio en el metabolismo seguido de una disminución en la población de algas.

En éste caso no se presentó una diferencia clara entre las tendencias de crecimiento de la biomasa algal a las concentraciones iniciales de nitrógeno, lo cual nos lleva a pensar que para poder observar diferencias más significativas hay que tomar

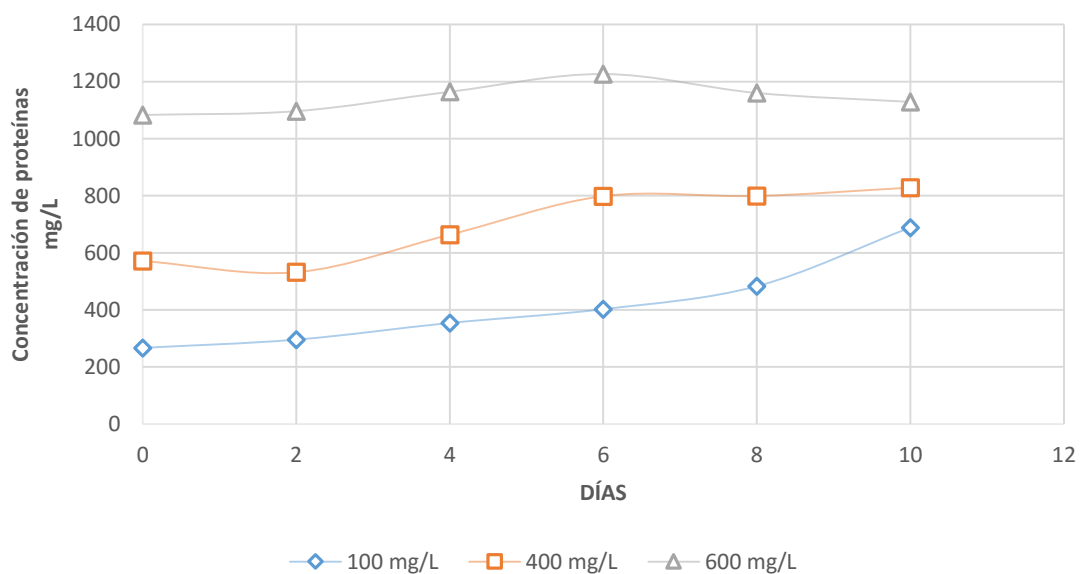
concentraciones nitrógeno inicial más altas y más bajas, para poder explorar el rango de adaptación de la especie *Chlorella vulgaris*.

5.5 PRODUCCIÓN DE METABOLITOS DE VALOR AGREGADO

La producción de metabolitos de valor agregado a partir de la biomasa de microalga ha sido ampliamente estudiada debido a que ellos constituyen una forma de amortización de costos asociados a los tratamientos de agua residual (Barsanti, 2006). Como se planteó en la metodología, el presente estudio tuvo en cuenta la producción de proteínas, carbohidratos, lípidos, clorofila a y clorofila b.

5.5.1 Producción de proteínas. Las algas constituyen una importante fuente alimenticia que se ha venido explorando debido a su potencial nutricional, el cual se basa en el aporte de proteína, vitaminas, carbohidratos y ácidos grasos, que la convierten en un alimento apto para el consumo de animales y seres humanos. En la figura 22, se presenta el comportamiento de la concentración de proteínas en el cultivo a diferentes concentraciones de biomasa inicial.

Figura 22. Concentración de proteínas en el cultivo a través del tiempo a diferentes concentraciones iniciales de biomasa

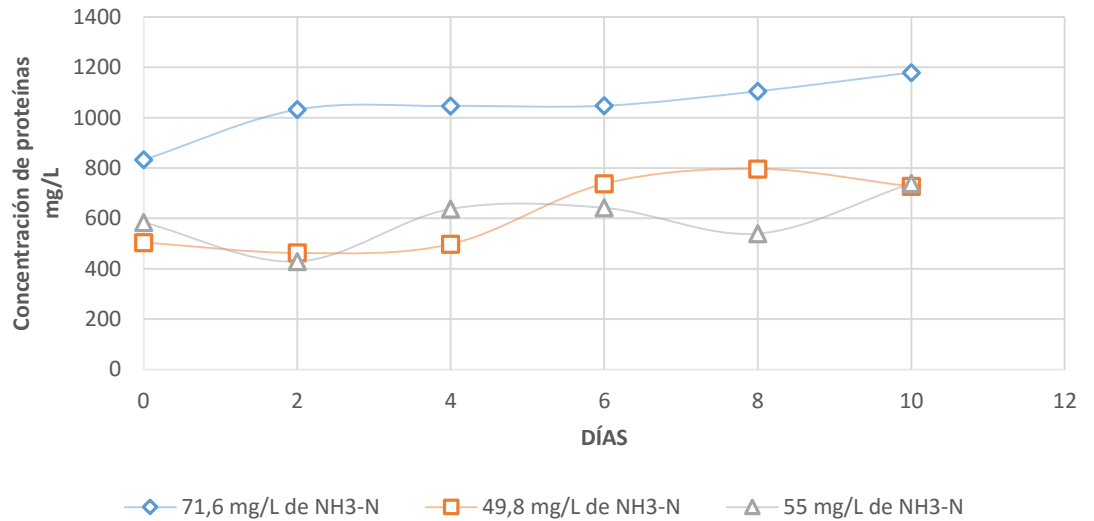


Fuente: Autor

Como se puede observar, la concentración de proteínas tendió a aumentar en todos los casos, alcanzando su mayor tendencia con la menor concentración inicial de biomasa y viceversa. Lo anterior se debe a la competencia entre algas por el sustrato, pues la concentración de nitrógeno en el cultivo determina la síntesis de proteínas como lo reportan Beuckels et al (Beuckels, 2015). La producción de proteínas también refleja la incorporación de nitrógeno a la biomasa del alga, el cual tiende a disminuir, lo cual corrobora los resultados anteriores de la remoción de nitrógeno y la disminución de los nitratos en el medio, afirmando que un alto contenido de nitrógeno contribuye a la síntesis de proteínas.

En la figura 23 se puede observar el comportamiento de la concentración de proteínas en el cultivo a diferentes concentraciones iniciales de nitrógeno amoniacal. La producción de proteínas aumentó en todos los casos, siendo mayor cuando tenía más disponibilidad de nutrientes, lo cual respalda lo encontrado por el análisis ANOVA que mostró una significancia ($p < 0,05$) en cada uno de los factores (nutrientes, biomasa y la interacción biomasa*nutrientes) para las proteínas, es decir que cada factor tuvo una relación directa con la producción de proteínas, lo cual concuerda con lo reportado previamente por Moheimani et al. (Moheimani, 2013). Hay que tener en cuenta que en los cultivos no necesariamente se encontraba la misma concentración inicial de proteínas por los regímenes de nutrición que tuvieron las algas y por la composición biológica del agua residual.

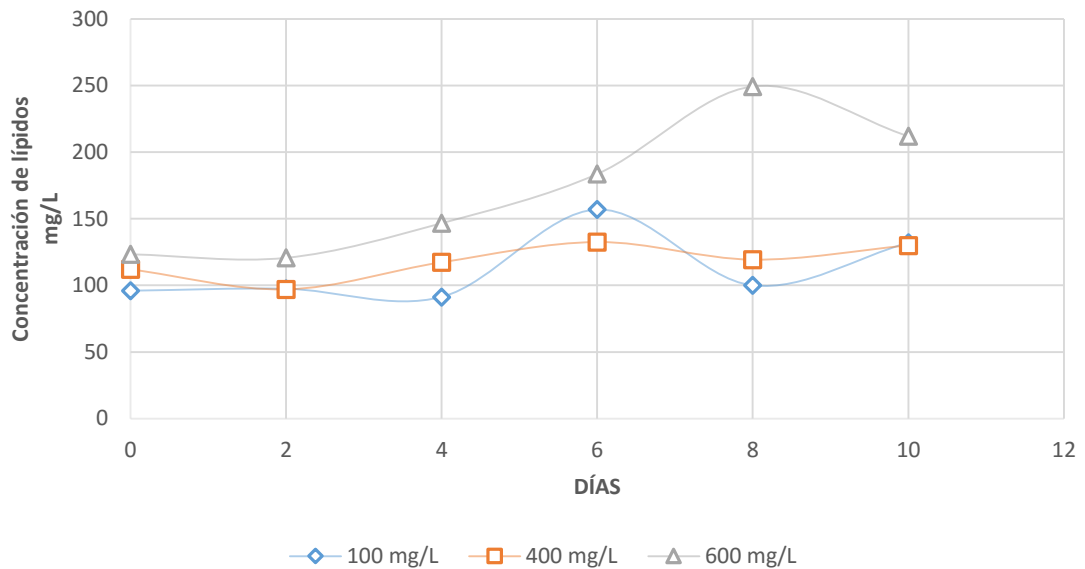
Figura 23. Concentración de proteínas en el cultivo a través del tiempo a diferentes concentraciones iniciales de nitrógeno amoniacal



Fuente: Autor

5.5.2 Producción de Lípidos. La producción de lípidos en la producción de microalgas ha sido estudiada ampliamente debido a su aplicación en la industria de los hidrocarburos. Existen dos clases de lípidos en las microalgas: los lípidos no polares y los lípidos polares, los cuales pueden llegar a constituir entre el 20% y el 50% del peso seco de la biomasa algal (Moheimani, 2013). En la figura 24 se muestra la producción de lípidos a través del tiempo a diferentes concentraciones iniciales de biomasa.

Figura 24. Concentración de lípidos en el cultivo a través del tiempo a diferentes concentraciones iniciales de biomasa

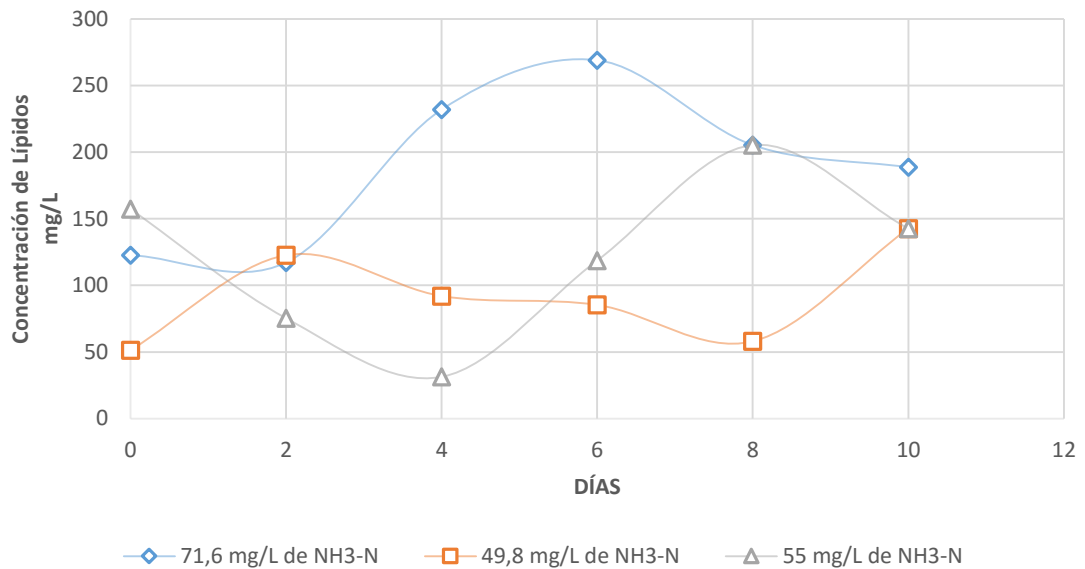


Fuente: Autor

Como puede observarse, los valores de la concentración de lípidos fluctúan bastante, en los cuales los valores iniciales de lípidos no están determinados por la concentración de biomasa, sin embargo la biomasa sí tiene una relación directa con la producción de lípidos, con una significancia ($p < 0,05$).

Al pasar los días la producción de lípidos aumentó más en la concentración de biomasa inicial más alta, no obstante en la curva de 400 mg/L y 600 mg/L de biomasa algal las concentraciones finales de lípidos fueron iguales. Para poder tener una mejor perspectiva de los fenómenos ocurridos se presenta a continuación, en la figura 25, el comportamiento de la concentración de lípidos en el cultivo a diferentes concentraciones iniciales de nitrógeno.

Figura 25. Concentración de lípidos en el cultivo a través del tiempo a diferentes concentraciones iniciales de nitrógeno amoniacal

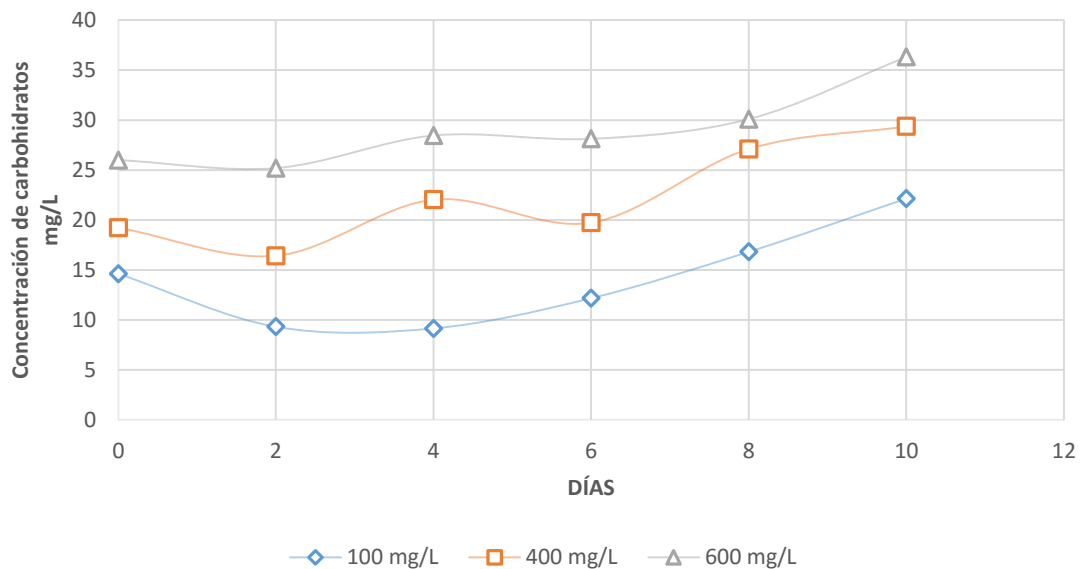


Fuente: Autor

Se puede observar que diferentes concentraciones iniciales de $\text{NH}_3\text{-N}$ correspondieron a diferentes concentraciones de lípidos en las microalgas, corroborando su significancia ($p < 0,05$), lo que en primera instancia contradice lo reportado por otros autores, que indican que la abundancia de nitrógeno permite que sustancias como las proteínas y los pigmentos fotosintéticos aumenten, pero que sustancias como los lípidos y los carbohidratos no se sintetizan con la misma facilidad (Beuckels, 2015). No obstante, hay que tener en cuenta que las algas con las que se realizaron los experimentos no se encontraban previamente bajo las mismas condiciones; los experimentos se hicieron por separado y cada uno de los experimentos a diferentes concentraciones iniciales de nitrógeno amoniacal se realizaron en diferentes fechas, lo cual quiere decir que estaban sometidas a diferentes regímenes alimenticios, encontrándose algunas bajo escases de nutrientes y otras en abundancia de ellos, lo que alteró radicalmente la producción de lípidos y carbohidratos los días siguientes. Sin embargo en todos los casos se observa una tendencia al aumento cuando los nutrientes empiezan a escasear, lo que ratifica lo reportado por otros autores (Barsanti, 2006) (Moheimani, 2013) (Becker, 1994).

5.5.3 Producción de carbohidratos. La producción de carbohidratos en el presente estudio estuvo relacionada directamente con la concentración inicial de biomasa y la concentración inicial de nutrientes, con una significancia ($p < 0,05$) en los factores nutrientes y biomasa, sin embargo no fue significativo en la interacción biomasa*nutrientes. Para poder apreciar dichas interacciones se presentan los comportamientos de las concentraciones de carbohidratos en las figuras 26 y 27.

Figura 26. Concentración de carbohidratos en el cultivo a través del tiempo a diferentes concentraciones iniciales de biomasa

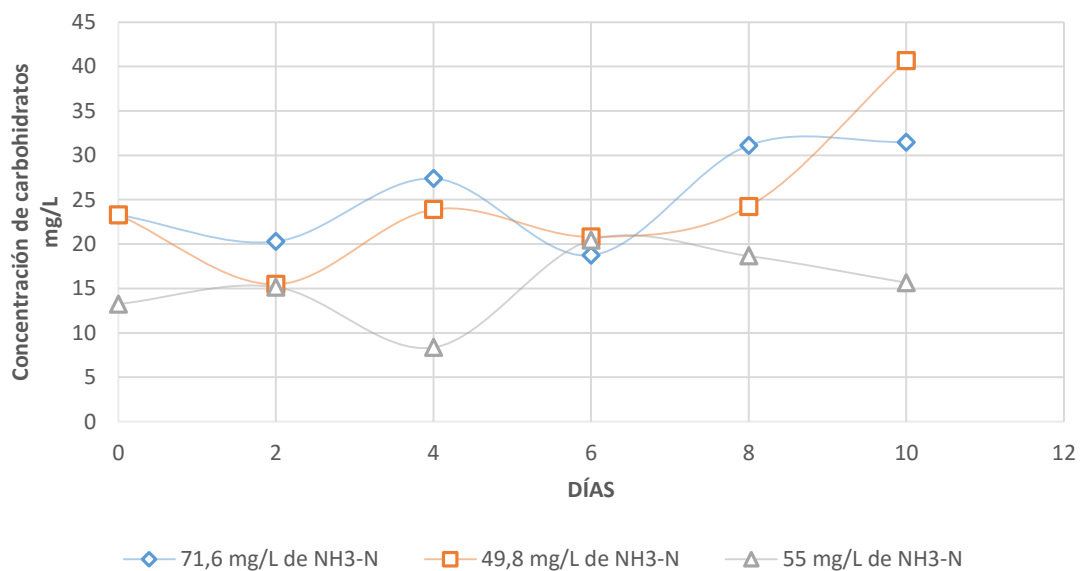


Fuente: Autor

Los niveles iniciales de biomasa determinaron la concentración de carbohidratos en cada uno de los biorreactores, comprobándose con una significancia ($p < 0,05$). La concentración de biomasa está relacionada con la tendencia a aumentar en los carbohidratos, lo cual nos permite saber que el contenido celular de carbohidratos tiende a tener un crecimiento constante y no existe un crecimiento acelerado que pueda indicar un cambio en la tasa de fijación de metabolitos con alto contenido de carbono, es decir que la biomasa no estuvo en condiciones de escases de nutrientes durante los 10 días de estudio.

La figura 27 muestra el comportamiento de la concentración de carbohidratos en el tiempo teniendo en cuenta las concentraciones iniciales de nitrógeno amoniacal. Las curvas resultantes no parecen tener un comportamiento definido más allá de que todas tienen una tendencia al crecimiento. Una tendencia poco clara al crecimiento contradice lo propuesto por otros autores que reportan que la disponibilidad de N y P determina la composición bioquímica de las microalgas. No obstante, si el cultivo hubiese permanecido más tiempo, los carbohidratos hubiesen comenzado a aumentar ya que cuando se limitan los nutrientes, las microalgas tienden a acumular metabolitos ricos en carbono como los carbohidratos y los lípidos (Gonzalez-Fernandez, 2012), por ello se tiene certeza de que las condiciones previas al experimento fueron diferentes en los 3 casos y que el contenido de carbohidratos en el agua residual fue diferente también.

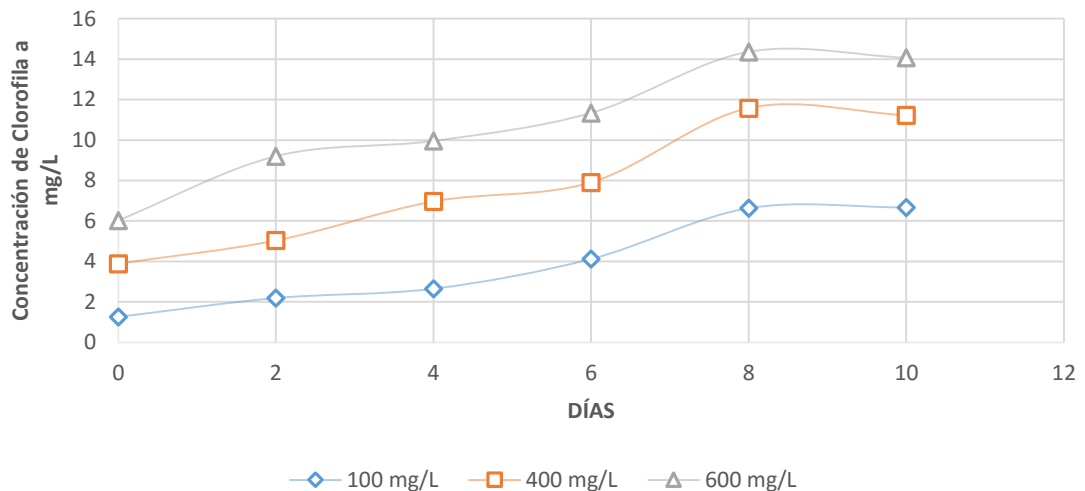
Figura 27. Concentración de carbohidratos en el cultivo a través del tiempo a diferentes concentraciones iniciales de nitrógeno amoniacal



Fuente: Autor

5.5.4 Producción de clorofila a y b. La producción de clorofila es derivada de la actividad fotosintética del alga, por ésta razón está ligada a la biomasa presente y es sensible a la concentración celular y a la irradiancia promedio (McGriff, 1972). La irradiancia se mantuvo constante en el estudio, entonces los cambios de concentración de la clorofila se debieron a la concentración inicial de biomasa sembrada, lo cual se comprueba con una significancia ($p < 0,05$) tanto para clorofila a como clorofila b en el factor biomasa. El comportamiento de la concentración de clorofila a y b se pudo ver en las figuras 28 y 29, respectivamente:

Figura 28. Concentración de clorofila a en el cultivo a través del tiempo a diferentes concentraciones iniciales de biomasa

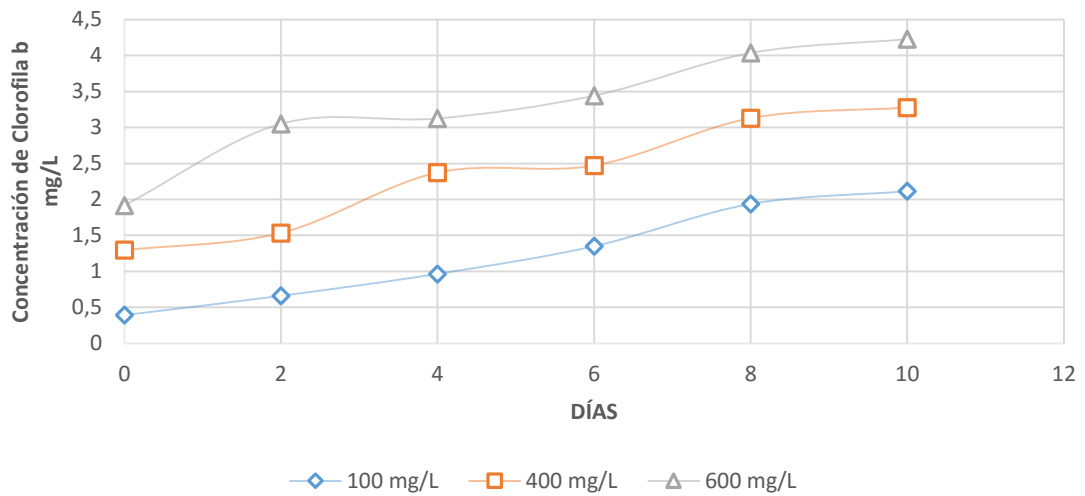


Fuente: Autor

Los comportamientos de la concentración de clorofila a y b son muy similares, pero las magnitudes de las concentraciones de la clorofila a son mayores que las b, como ocurre normalmente en las algas verdes (Barsanti, 2006). Se puede observar que la tendencia de la clorofila fue a aumentar, sin embargo, no es posible asegurar que las condiciones del estudio fueron adecuadas o si la irradiancia a la cual se sometió fue la irradiancia óptima (OCD , en células⁻¹), en la cual se presentan los mayores picos de productividad y eficiencia fotosintética (Moheimani, 2013). La irradiancia óptima es una magnitud que depende de la especie del alga, la irradiancia a la que se someta y la temperatura, si se deseara hallar dicha irradiancia habría que hacer

una curva de temperatura y otra de irradiancia con el alga que se desee (Sukenik A, 1991).

Figura 29. Concentración de clorofila b en el cultivo a través del tiempo a diferentes concentraciones iniciales de biomasa



Fuente: Autor

Estadísticamente, tanto en la clorofila a como en la clorofila b fue significativo ($p < 0,05$) el factor concentración inicial de nutrientes. La significancia en éste factor se debe a que las algas que tienen mayor disponibilidad de nutrientes, es decir las que menos competencia tuvieron, en este caso la concentración menor, pudieron aumentar el número de su colonia más fácilmente, lo cual modificó la irradiancia promedio afectando también la producción de clorofilas a y b.

6 CONCLUSIONES

- Se realizó el diseño y puesta en marcha de un módulo de cultivo con fotobiorreactores tubulares verticales tipo batch a escala laboratorio, con una cepa de *Chlorella vulgaris*, que contó con un sistema de bombeo de aire que constituyó la fuente de CO₂ y aportó la agitación. Adicionalmente, contó con un sistema de desgaseado, para evitar la concentración de gases al interior del reactor. El reactor tuvo una iluminancia promedio de 4700 Lux (lm/m²) ($\approx 90 \mu\text{mol}\cdot\text{quanta}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) aportado por dos luces frías fluorescentes, sin aporte de radiación UV no cuantificable y no tuvo aporte lumínico de fuentes naturales. El fotoperiodo utilizado fue de 12/12 horas, controlado por medio de un temporizador.
- La concentración inicial de biomasa influyó positivamente en la remoción de nitrógeno, siendo la concentración de 600 mg/l la de mayor remoción con un porcentaje promedio de $86,2\% \pm 7,4$. No obstante, todas los porcentajes de remoción fueron superiores a $78\% \pm 8,3$. La concentración inicial de biomasa influyó negativamente en la remoción de ortofosfatos, debido a que los ortofosfatos se produjeron a una tasa cercana a la tasa de remoción, lo cual se manifestó en que mayores concentraciones de biomasa estuvieron relacionadas con mayores concentraciones de ortofosfatos y la mejor remoción se logró a una concentración inicial de 100 mg de biomasa/L, con un porcentaje de remoción de $56,3\% \pm 17,6$. Se encontró que el crecimiento específico fue inversamente proporcional a la concentración inicial de biomasa, siendo las de 100 mg/L las que menor tiempo de generación presentaron.
- La concentración inicial de nutrientes influyó positivamente en el crecimiento de la biomasa, siendo la concentración de 71,6 mg/L la de mayor producción algal. En cuanto a la remoción de ortofosfatos, la concentración inicial de nitrógeno amoniacal fue inversamente proporcional a la remoción de fosfatos, siendo mejores las remociones obtenidas a una concentración inicial de 49,8 mg NH₃-N/L, con una remoción de $53\% \pm 6,1$. La mejor remoción de nitrógeno se presentó a una concentración inicial de 55,6 mg NH₃-N/L con una

remoción de $91,2\% \pm 3,3$; no obstante todas las remociones fueron mayores al 71%.

- La producción de metabolitos de valor agregado fue positiva, las concentraciones de proteínas y clorofilas aumentaron a medida que transcurrió el tiempo, sin embargo los carbohidratos y lípidos no tuvieron una clara tendencia debido a las condiciones en las que se encontraban previas al experimento. No obstante, los metabolitos de valor agregado demostraron ser un campo en el cual es posible realizar nuevas investigaciones y generar nuevas técnicas de producción y cultivo con el fin de llevarlo a una mayor escala.

7 RECOMENDACIONES

- Para futuros estudios variar las condiciones iniciales de biomasa con el fin de conocer el efecto de mayores concentraciones de biomasa en la remoción de nutrientes y en la producción de metabolitos de valor agregado a una mayor escala.
- Se debe tener en cuenta la administración de nutrientes al cultivo en los días previos al inicio de los experimentos con el fin de obtener un comportamiento más homogéneo durante el cultivo experimental.
- Hay que evaluar la remoción de N y P con otras microalgas con el fin de poder realizar un estudio comparativo, así como evaluar los metabolitos de dichas algas, con el fin de detectar posibles usos para su implementación biotecnológica.
- Es necesario estudiar más a fondo la relación entre los escasos de nutrientes y la posterior remoción de nitrógeno y fósforo.
- Se sugiere que si se desean llevar a cabo otros estudios en los que se pretenda obtener una mayor producción de lípidos y carbohidratos se debe someter el alga a una fase previa de escasos de nitrógeno.
- Se debe realizar un estudio en el que se evalúe la relación entre los niveles de intensidad/fotoperiodos y la actividad fotosintética, lo cual repercutirá en la remoción de nutrientes.
- Se aconseja tener en cuenta que los ratios C:N:P permanezcan constantes en caso de querer evaluar la forma de aumentar la producción de metabolitos de manera independiente a la concentración de nutrientes.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Raoufa, N., Al-Homaidanb, A. A., & Ibraheemb, I. B. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 257–275.
- Agudelo, R. J. (2010). Removal of dissolved organic carbon in pilot wetlands of subsuperficial and superficial flows. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*, 21-28.
- Amin, I. a. (2002). Antioxidant activity of selected commercial seaweeds. *Malaysian Journal of Nutrition*, 8, 167–177.
- Andersen, R. (2005). Algal culturing techniques. *Elvieser Academic Press*, 33-55, 323.
- APHA, A. P. (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 21th Edition*. Washington: American Public Health Association.
- Aslan, S., & Kapdan, I. K. (2006). Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal for syntethic wastewater by algae. *Ecological Engineering*, 28, 64-70.
- Azeem, A., Neelagud, Y. F., & Rathod, V. (1999). Fatty acid composition of microbial oil plant foods for Human Nutrition. *Biotechnological production of oil*, 381-386.
- Bacteria, A. n. (1989). Prosser, J. 1989. Rose, A. and Tempest, D. (Eds.) *Advances in microbial*, 125-181.
- Banemann, J. R. (1990). The future of microalgae biotechnology. *Cresswell RC, Rees TAV, Shah N (eds). Agal Biotechnology, Longman* , 317-337.
- Barsanti, L. (2006). *Algae, Anatomy, biochemistry & Biotechnology*. CRC Press.
- Becker, E. W. (1994). *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Beijerinck, M. W. (1890). Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. *Botanische Zeitung*, 725-739, 741-754, 757-768, 781-785.
- Bellinger , E. G., & Sigeo, D. C. (2015). *Freshwater Algae. Identification, Enumeration an Use as Bioindicators*. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- BENSON, A. A., & CALVIN, M. (1948). The path of carbon in photosynthesis. III. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 6-10.

- Beuckels, A. S. (2015). Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. *Water Research* Vol 77, 98-106.
- Bischoff, H. W., & Bold, H. C. (1963). *Phycological Studies. IV. Some Algae from Enchanted Rock and Related Algae Species*. University of Texas Publications number 6318, 1–95.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 37:911–917.
- Bold, H. C., & Wynne, M. J. (1978). *Introduction to the algae: structure and reproduction*. New Dehli: Prentice-Hall of India Pvt. .
- Boussingault, J. B. (1864). *Agronomie*.
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 557-577.
- Brock, T. a. (1991). *Microbiología* 8a. ed. México: Prentice Hall Hispanoamérica.
- Browne, C. A. (1942). Liebig and the law of the minimum. *Liebig and after Liebig*. Publication, 71-82.
- Chacón, C. A. (2004). Uso de la *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp. en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela. *Boletín de Investigaciones Biológicas de la Universidad del Zulia* Vol. 38, 94-108.
- Changfu, W., Xiaoqing, Y., Hong, L., & Jun, Y. (2012). Nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater by green algae *Chlorella* sp. *Journal of Environmental Biology*, 34; 421-425.
- Chen, C. K. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. *Bioresource technology*, 102; 71–81.
- Conil, P. (2006). *El tratamiento anaerobio de las aguas residuales en Colombia: histórico, posibilidades, limitaciones, situación actual y perspectivas*. Bogotá, DC.
- Corredor, F. V. (2008). *BIOTECNOLOGÍA: La “Superciencia” Moderna*. Entre Ciencia e Ingeniería, 82-89.
- Fair, G. M. (1984). Purificación de aguas y tratamiento y remoción de aguas residuales. En G. M. Fair, *Ingeniería sanitaria y de aguas* (pág. 1a. ed.). LIMUSA.
- Fritsch, F. (1935). *The Structure and Reproduction of the Algae*. Cambridge, Cambridge University Press, xvii+791 p.

- Fritsch, F. (1942). The algal life cycle. *Ann Bot NS*, 553-563.
- Geider , R. J., & La Roche, J. (2002). Redfield revisited: variability of C: N: P in marine microalgae and its biochemical basis. *Eur. J. Phycol.*, 37, 1-17.
- Gerbsch, N., Rarbach, M., Walter, C., & Buchholz, R. (2000). Photobioreactors for the monoseptic cultivation of microalgae. Abstracts of the 4th European workshop on biotechnology of microalgae.
- Gonzalez-Fernandez, C. B. (2012). Linking microalgae and cyanobacteria culture conditions and key-enzymes for carbohydrate accumulation. *Biotechnol. Adv.* 30, 1655-1661.
- Green, F. B. (1998). The energetics of Advanced Integrated Wastewater Pond Systems. Energy and Resources Group. Univ. Calif., Berkeley.
- Grobbelaar, J. U. (2004). Algal Nutrition. En A. Richmond, *Handbook on microalgal culture*, (págs. 97-115). Blackwell Sci.
- HANNA Instruments. (2008). Hoja de Seguridad HI 93715B-0 / HI 93715A-0.
- Helena Curtis, N. S. (2000). *Biología*. Editorial Médica Panamericana.
- Ho, S. H., & Chen, C. Y. (2011). Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems: A review . *Biotechnology Advances*, 29, 189-198.
- Hoffman, J. (1998). Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae. *Journal of Phycology*, 34, 757-763.
- Jeffrey , S. W., & Humphrey, G. F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural. *Biochem Physiol P fl anz*, 167:191–194.
- Jorquera, O. K. (2010). Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. 1406-1413.
- Kaplan, D. Z. (1986). Optimal growth conditions for *Isochrysis galbana*. *Biomass*, 9; 37–48.
- Knowles, R. (1982). Denitrification. *Microbiol. Rev* , 46:43-70.
- Kochert, G. (1978). Carbohydrate determination by the phenol-sulphuric acid method. Carbohydrate determination by the phenol-sulphuric acid method, pp 95–97.
- Lee, R. E. (1989). *Phycology*. Cambridge University Press, 645 pp.

- Lloyd, J. (2003). Microbial reduction of metals and radionuclides. *FEMS Microbiol. Rev.*, 27; 411–425.
- Lopez, F., & Rojas, R. C. (2010). Diseño y montaje de un fotobiorreactor a escala laboratorio para la producción de microalgas. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander - UIS.
- Lowrey , O., Rosenbrough, N., Farr, A., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1983:265–275.
- Lundquist, I. W. (2010). A realistic technology and engineering assessment of algae biofuel production. Energy Biosciences Institute, University of California, Berkeley, USA .
- Mallick, N. (2002). Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. *BioMetals* 15, 377–390 .
- Maris, S. (15 de Septiembre de 2012). Universidad Nacional de Colombia. Obtenido de <http://cienciastella.com/fotosintesis.html>
- Markou, G., & Georgakakis, D. (2011). Cultivation of filamentous cyanobacteria (bluegreen algae) in agro-industrial wastes and wastewater: A review. *Applied Energy*, in press.
- McGriff, J. M. (1972). The removal of nutrients and organics by activated algae. *Water Research* 6, 1155-1164.
- Moheimani, N. R. (2013). Standard Methods for Measuring Growth of Algae and Their Composition. En N. R. Moheimani, M. Borowitzka, A. Isdepsky, & S. Fon Sing, *Algae for biofuels and energy* (págs. 265-284). Springer Science+Business Media Dordrecht.
- Mora , R., Moronta, R., Ortega, J., & Morales, R. (12 de 06 de 2006). Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. *Revista Facultad de Agronomía, Universidad de Caracas*, 28-43. Obtenido de <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182006000100003&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0378-7818.
- Morweiser, O. K. (2010). Developments and perspectives of photobioreactors for biofuel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 8, 1291–1301.
- Mulder A., A. v. (1995). Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol. Ecol*, 16:177-184.

- Olguín, E. J. (2012). Dual purpose microalgae–bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a biorefinery. *Biotechnol. Adv.* 30, 1031–1046.
- Oswald, W. J. (1963). Light efficiency of algae grown in sewage. *Trans. Am. Soc. Civil Engng*, 128; 47-83.
- Oswald, W. G. (1957). Photosynthesis in sewage treatment. American Society of Civil Engineers, Paper No. 2849.
- Oswald, W. J. (1962). The coming industry of controlled photosynthesis. *Am. J. Publ. Health*, 52:2.
- Pavlostathis, S. G.-G. (1991). Kinetics of anaerobic treatment. *Water Science & Technology*, 24(8), 35-59.
- Pearson, H. M. (1992). Removal of nitrogen and phosphorus by immobilized cells of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus bijugatus* isolated from soil. *Enzymol Microbial Technol*, 14; 656–8.
- Pestana, R. M., & Pestana, R. (2012). Producción de microalgas *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 usando como sustrato glicerol residual a escala laboratorio. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander - UIS.
- Porras, L. T., & Prada, C. E. (2012). Efectos del tiempo de cultivo en la productividad de metabolitos de valor agregado en *Chlorella vulgaris* UTEX 1803. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander - UIS.
- Pulz, O. (2001). Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 57:287–293.
- Ramalho, R. S. (1983). Tratamiento de Aguas Residuales. Quebec, Canadá: REVERTÈ, S.A.
- Ras, M., & Lardon, L. (2011). Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella Vulgaris*. *Bioresource Technology*, 102, 200-206.
- Redfield, A. (1958). The biological control of chemical factors in the environment. *Am. Sci.*, 46, 205–221.
- Reynolds, C. S. (2006). The ecology of phytoplankton. Cambridge University Press, 535.
- Richmond, A. (2004). Handbook of microalgae culture: Biotechnology and applied phyecology. *Analytical Biochemistry* 296(2).

- Riegman, R. C. (2000). Long-term phytoplankton-nutrient interactions in a shallow coastal sea: Algal community structure, nutrient budgets, and denitrification potential. *Limnology and Oceanography*, 45; 131-144.
- Ritchie, R. J. (2006). Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynth Res*, 89:27–41.
- Ritchie, R. J. (2008). Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, and d and total chlorophylls in natural assemblages of. *Photosynthetica*, 46:115–126.
- Rodríguez, Y., & García, A. (2011). Estimación cuantitativa preliminar de índices de producción de biomasa microalgal a partir de la reacción de fotosíntesis. *Rev. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas*, 4-6.
- Romero, J. A. (1999). Tratamiento de aguas residuales. Teoría y principios de diseño. Santafé de Bogotá: Centro Editorial, Escuela Colombiana de Ingeniería.
- Ruiz Martinez, A., Martin Garcia, N., Romero, I., Seco, A., & Ferrer, J. (2012). Microalgae cultivation in wastewater: Nutrient removal from anaerobic membrane bioreactor effluent. *Bioresource Technology*, 126; 247-253.
- Sánchez Tuirán, E. L. (2012). Desarrollo de un proceso para el aprovechamiento integral de microalgas para la obtención de biocombustibles. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander - UIS.
- Sawayama, K. R. (1998). Nitrate and phosphate ion removal from water by *Phormidium laminosum* immobilized on hollow fibres in a photobioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 463–468.
- Sharma, O. P. (1986). Textbook of algae. Tata McGraw-Hill Education.
- Sieg, D. (2008). Making Algae Biodiesel at Home. *Algae* °1, 33-68.
- Singh, S. P., & Priyanca, S. (2014). Effect of CO₂ concentration on algal growth: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 172–179.
- Solano, A. F. (2011). Evaluación del efecto de la relación carbono/nitrógeno en la deposición de pigmentos fotosintéticos presentes en *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 para la valorización de la biomasa. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander - UIS.
- Solano, A. F. (2013). Desarrollo de una metodología para el cultivo semi-continuo de *Chlorella vulgaris* utex 1803 para la producción de metabolitos de valor agregado. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander - UIS.

- Solano, A. F. (2013). Desarrollo de una metodología para el cultivo semi-continuo de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 para la producción de metabolitos de valor agregado. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander - UIS.
- Sukenik A, L. R. (1991). Optimizing algal biomass production in an outdoor pond – a simulation model. *J Appl Phycol* 3, 191–201.
- Superintendencia de Servicios Públicos Domiciliarios. (2012). Informe Técnico sobre Sistemas de Tratamiento de Aguas Residuales en Colombia. Bogotá DC: Imprenta Nacional de Colombia.
- Tornabene, T. G. (1983). Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans*. *Enzyme and Microbial Technology*, 5(6), 435-440.
- Travieso, A. P. (2002). Bioalga reactor: preliminary studies for heavy metals removal. *Biochem. Eng. J.* 12, 87–91.
- Ugwu, C. U. (2007). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 4021–4028.
- Villalobos, A. C. (2007). Evaluación por método ecométrico de agar obtenido de algas rojas colombianas. *Universitas scientiarum*, 12, 57-65.
- Volker A. R. Huss, C. F. (1999). Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella sensu lato (chlorophyta)*. *Journal of Phycology*, 587-598.
- Wang, L. M. (2009). Cultivation of Green Algae *Chlorella sp.* in Different Wastewaters from Municipal Wastewater Treatment Plant. *Applied Biochemical Biotechnology*.
- Watanabe, K., & Kouzuma, A. (2015). Exploring the potential of algae/bacteria interactions. *Current Opinion in Biotechnology*, 125–129.
- Wirth, H. E., & Robinson, R. J. (1933). Photometric investigation of the Nessler reaction and Witting method for determining ammonia in seawater. *Ind. Eng. Chem*, 293–296.
- Xin, L., & Hong-yin, H. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of freshwater microalga *Scenedesmus sp.* *Bioresource Technology*, 101, 5495-5500.
- Xu, M. B. (2014). Algae-facilitated chemical phosphorus removal during high-density *Chlorella emersonii* cultivation in a membrane bioreactor. *Bioresource Technology*, 153; 383–387.

Zhijie, L. a., Yan , L. a., Fei , G. a., & Yin, X. (2013). Efficiency assessment and pH effect in removing nitrogen and phosphorus by algae-bacteria combined system of *Chlorella vulgaris* and *Bacillus licheniformis*. *Chemosphere*, 92; 1383-1389.

9 ANEXOS

Anexo A. Resultados ANOVA de la concentración de biomasa a través de los días

VARIABLES	Crecimiento1		Crecimiento2		Crecimiento3		Crecimiento4		Crecimiento5		Crecimiento6	
	Coef	SIGN	Coef	SIGN	Coef	SIGN	Coef	SIGN	Coef	SIGN	Coef	SIGN
MODELO CORREGIDO	536553,300a	7E-32	1195311,512a	8E-29	1188059,825a	2E-24	1107923,829a	0	924053,240a	0	1259684,941a	0
INTERSECCIÓN	2310771,49	3E-47	2748212,1	3E-39	3633231,67	6E-37	4736284,1	0	5599628,3	0	8054617,7	0
BIOMASA	522521,552	9E-35	903114,01	9E-30	920917,19	1E-25	855533,58	0	663069,17	0	820983,84	0
NUTRIENTES	6244,54127	8E-06	132175,9	9E-16	56164,0343	1E-07	45465,215	0	79139,544	0	249545,54	0
BIOMASA*NUTRIENTES	7787,20702	1E-05	160021,6	8E-16	210978,6	7E-14	206925,04	0	181844,53	0	189155,56	0
ERROR	6788,67203		22554,639		39817,7678		132641,74		125754,11		94963,744	
TOTAL CORREGIDO	543341,972		1217866,2		1227877,59		1240565,6		1049807,4		1354648,7	
R2	0,988		0,981		0,968		0,893		0,88		0,93	
R2 AJUSTADA	0,985		0,977		0,96		0,869		0,854		0,914	

Fuente: Autor

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

VARIABLES	Concentración N1		Concentración N2		Concentración N3		Concentración N4		Concentración N5		Concentración N6	
	Coef.	SIGN	Coef.	SIGN	Coef.	SIGN	Coef.	SIGN	Coef.	SIGN	Coef.	SIGN
MODELO CORREGIDO	3482,711 _a	0,000	3788,711 ^a	,000	3025,511 ^a	,000	3259,911 ^a	,000	3559,200 ^a	,000	2567,644 ^a	,000
INTERSECCIÓN	161760,089	0,000	67900,089	,000	29388,889	,000	15980,089	,000	10215,200	,000	5555,556	,000
BIOMASA	104,844	0,084	389,911	,007	541,111	,010	279,511	,065	244,133	,079	212,578	,055
NUTRIENTES	3109,644	0,000	2547,511	,000	2113,378	,000	2609,244	,000	2899,200	,000	2042,978	,000
BIOMASA*NUTRIENTES	268,222	0,019	851,289	,001	371,022	,148	371,156	,121	415,867	,075	312,089	,076
ERROR	711,2		1213,200		1845,600		1702,000		1611,600		1212,800	
TOTAL	165954		72902,000		34260,000		20942,000		15386,000		9336,000	
TOTAL CORREGIDO	4193,911		5001,911		4871,111		4961,911		5170,800		3780,444	
R2	0,830		0,757		0,621		0,657		0,688		0,679	
R2 AJUSTADA	0,793		0,704		0,537		0,581		0,619		0,608	

Fuente: Autor

Anexo C. Resultados ANOVA de la concentración de fósforo a través de los días

VARIABLES	Ortofosfatos 1		Ortofosfatos 2		Ortofosfatos 3		Ortofosfatos 4		Ortofosfatos 5		Ortofosfatos 6	
	Coef.	SIGN	Coef	SIGN	Coef	SIGN	Coef.	SIGN	Coef.	SING	Coef.	SIGN
MODELO CORREGIDO	2000,080 ^a	,000	2517,614 ^a	,000	876,347 ^a	,000	1455,277 ^a	,000	1217,481 ^a	,000	1093,838 _a	,000
INTERSECCIÓN	25799,660	,000	10652,097	,000	7463,960	,000	9525,390	,000	7948,776	,000	7322,123	,000
BIOMASA	842,407	,000	873,554	,000	579,172	,000	942,422	,000	559,167	,000	695,786	,000
NUTRIENTES	913,895	,000	994,469	,000	170,327	,000	290,351	,000	246,823	,000	69,634	,002
BIOMASA*NUTRIENTES	243,779	,000	649,592	,000	126,848	,000	222,504	,000	411,490	,000	328,417	,000
ERROR	225,302		147,371		144,596		97,029		234,738		167,335	
TOTAL	28025,042		13317,083		8484,903		11077,696		9400,995		8583,296	
TOTAL CORREGIDO	2225,382		2664,986		1020,943		1552,306		1452,220		1261,173	
R2	0,899		0,945		0,858		0,937		0,838		0,867	
R2 AJUSTADA	0,876		0,932		0,827		0,924		0,802		0,838	

Fuente: Autor

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

VARIABLES	Nitratos1		Nitratos2		Nitratos3		Nitratos4		Nitratos5		Nitratos6	
	Coef.	SIGN	Coef.	SIGN	Coef.	SIGN	Coef.	SIGN	Coef.	SIGN	Coef.	SIGN
MODELO CORREGIDO	300,382 ^a	,000	127,505 ^a	,000	39,668 ^a	,000	104,937 ^a	,000	49,839 ^a	,000	31,749 ^a	,040
INTERSECCIÓN	3526,312	,000	3337,594	,000	1642,495	,000	1463,115	,000	861,428	,000	885,961	,000
BIOMASA	6,328	,000	,262	,786	1,193	,117	15,270	,015	40,429	,000	22,920	,003
NUTRIENTES	293,309	,000	117,688	,000	30,132	,000	82,734	,000	8,422	,033	2,961	,429
BIOMASA*NUTRIENTES	,745	,552	9,555	,005	8,344	,000	6,932	,381	,989	,925	5,868	,497
ERROR	8,712		19,455		9,411		57,795		40,167		61,449	
TOTAL	3835,406		3484,554		1691,574		1625,847		951,434		979,160	
TOTAL CORREGIDO	309,094		146,960		49,079		162,732		90,006		93,199	
R2	0,972		0,868		0,808		0,645		0,554		0,341	
R2 AJUSTADA	0,966		0,838		0,766		0,566		0,455		0,194	

Fuente: Autor