

Bioconversión de efluentes piscícolas para la producción de biomasa algal de alto valor  
agregado

Lynda Valentina Carreño Villarreal

Carlos Simón González Acevedo

Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de Ingeniero Químico

Director

Crisóstomo Barajas Ferreira

Ing. Químico, MSc. Ingeniería Química

Codirectora

Janet Bibiana García Martínez

Ing. Química, MSc., PhD (C) Ingeniería Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Físicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Bucaramanga

2019

### **Dedicatoria**

*A Dios por guiarme a lo largo de mi vida, por darme sabiduría, paciencia y paz en los momentos de angustia y preocupación.*

*A mis padres, Xiomara y William, los que hicieron todo esto posible, quienes confiaron en mí, me brindaron su apoyo y dedicación para forjar mi camino y darme la oportunidad para ser una profesional, además de apoyar siempre mis ideas locas y sueños.*

*A mis hermanos, Felipe y Oscar, mis compañeros de vida, por su cariño incondicional, me llenan de orgullo con todos sus triunfos y éxitos.*

*A toda mi familia, a mis abuelos, a mi abuela Emma, quién estoy segura está sonriéndome desde el cielo, a mis tíos y tías, primos, sobrinos, a mi padrastro, a mi tía Ligia, a Connie, y a todos aquellos que han expresado su felicidad y orgullo, y me han acompañado a lo largo de estos años.*

*A Simón, mi compañero de tesis, mi amigo incondicional, por ser la persona más leal que conozco, por estar en los días buenos y malos, por nunca rendirnos y estar cumpliendo este sueño juntos.*

*A mis compañeros y amigos de la universidad, Laura, Dayra, Valen, Caro, Mapis, Juliana, quienes me dejan los mejores recuerdos de la universidad.*

*A mi eterna amiga Erika, quién siempre ha estado conmigo incluso en la distancia y quién es una de las personas más talentosas e increíbles que conozco.*

*A CEIQ y al CIDES, quienes me enseñaron el valor del trabajo en equipo, el compañerismo, empeño y dedicación.*

*A mí, por la persistencia y el compromiso para terminar esta etapa de mi vida.*

***Lynda Valentina Carreño Villarreal***

### **Dedicatoria**

*A Dios por mostrarme el camino y permitirme siempre recoger el fruto de mis esfuerzos.*

*A mis padres Carlos y Pilar por siempre creer en mí, permitirme desarrollarme bajo mis decisiones y sus consejos, siempre atentos de mí.*

*A mis hermanos Eliana, Juan, y María quienes siempre me apoyaron a salir adelante, dándome bastantes consejos y ejemplos a seguir.*

*A mi cuñado Joseph, quien siempre me apoyó, me motivó y me mostró orgullo y valoración por mi desarrollo.*

*A mis compañeros y amigos del deporte, la selección de atletismo de la UIS y de la liga de Santander, con quienes atravesé mi carrera, penas, alegrías y esfuerzos extracurriculares que nos unieron e inculcaron varios valores de la vida.*

*A mi compañera de tesis Lynda, aquella con la que atravesé toda la carrera, que compartimos penas y glorias, con quien tuve un apoyo y a quien apoyar, y que nunca nos rendimos para culminar con este sueño compartido.*

*A mis amigos de toda la vida, aquellos que sé que perduraran hasta el final Martin, Panda, Paola, Daniel, Hernán, Ricardo, que hemos compartido desde la infancia y no hemos dejado que nada nos separe, sino que aprovechamos todo para unirnos más.*

*A mis compañeros y amigos de la universidad que atravesamos por los mismos senderos, y afrontamos varios retos juntos, y que hoy se crecen las amistades gracias a ello.*

*A mi profesora Paola, quien me motivo a ingresar a esta carrera, hoy concluyo que sabía lo que veía en mi profe.*

*A Danna, mi mascota que me vio madurar desde niño, y me acompañó en varias noches de estudio tardío, hasta sus últimos alientos siempre mi amiga fiel.*

*A mis abuelos Jorge, Matilde, Gonzalo, quienes desde arriba me acompañaron en este arduo camino, y no me abandonan.*

*A mi Abuela Martha, quien siempre me escucho, apoyo e impulso en mi desarrollo personal, profesional y espiritual.*

*A Kira, mi amiga fiel y alegre que siempre esta con su mejor animo presente.*

*A mis familiares tíos, primos, padrinos, y demás, que siempre estuvieron ahí para mí.*

*A Gabo, que sepas que tendrás siempre un tío que te aconseje en tu vida y que te apoyara como todos lo hicieron conmigo*

**Carlos Simón González Acevedo**

### **Agradecimientos**

Agradecemos a nuestra alma máter, la Universidad Industrial de Santander, nuestra segunda casa. A la Universidad Francisco de Paula Santander, a todo el personal, del Laboratorio INNOVALGAE y al Laboratorio de Calidad Ambiental de la UFPS, por su apoyo y sus conocimientos transmitidos para la realización del presente trabajo de grado.

A la Escuela de Ingeniería Química, a los profesores, profesionales, administrativos y estudiantes que hacen parte de esta comunidad, por sus enseñanzas, y su colaboración para nuestra formación tanto personal como profesional.

A nuestro director y profesor, Crisóstomo Barajas, por ser una excelente persona y confiar en nosotros para la realización de este proyecto. A nuestra codirectora Bibiana García, por su escucha, su dedicación, y su ayuda incondicional, al profesor Andrés Barajas por su apoyo, atención y guía.

A los jóvenes investigadores, Jefferson, Miguel y Jessica, a Leidy y Nicolas, por su colaboración, y amabilidad.

A Lyda, nuestra compañera co-tesista, por su compañía y palabras de aliento para el desarrollo de nuestros proyectos profesionales.

Agradecemos a nuestros padres, familiares, amigos, compañeros, y allegados, por su apoyo incondicional y por su cariño, y a todas aquellas personas que contribuyeron de una forma u otro para que lográramos culminar esta gran carrera.

**Tabla de Contenido**

Introducción.....	15
1. Objetivos.....	20
1.1. Objetivo General.....	20
1.2. Objetivos Específicos .....	20
2. Metodología.....	21
2.1. Balance de masa y agua en cultivos de Tilapia .....	21
2.2. Muestra de efluente .....	22
2.3. Cultivo de microalgas.....	22
2.4. Capacidad de crecimiento.....	23
2.4.1. Cuantificación de la biomasa.....	23
2.4.1. Cuantificación de proteínas. ....	24
2.7. Caracterización del agua post-cultivo.....	25
.2.7.1. Acidez.....	26
2.7.2. Alcalinidad. ....	26
2.7.3. Dureza.....	27
2.7.4. Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO <sub>5</sub> )..	27
2.7.5. Demanda Química de Oxígeno (DQO)..	27
3. Resultados y Discusión.....	29

3.1. Balance de masa y agua en cultivos de Tilapia .....	29
3.2. Caracterización del efluente piscícola .....	31
3.3. Evaluación de la capacidad de crecimiento de microalgas.....	32
3.4. Determinación del efecto de la fuente de carbono. ....	34
3.4.1. Valoración de la biomasa y contenido proteico.....	35
3.4.2. Remoción de nitratos y fosfatos en los distintos medios de cultivo. ....	37
3.5. Caracterización del agua residual de piscicultura post-cultivo .....	40
4. Conclusiones.....	44
5. Recomendaciones .....	46
Referencias Bibliográficas.....	47
Apéndices .....	55

**Lista de Tablas**

Tabla 1. Análisis de experimentos. ....	25
Tabla 2. Nomenclatura para balance de masa y agua de Tilapia de acuerdo a las etapas de cultivo.	29
Tabla 3. Resultados de modelo matemático para cultivo de Tilapia.....	30
Tabla 4. Caracterización inicial del efluente piscícola.....	31
Tabla 5. Productividad de biomasa. ....	36
Tabla 6. Parámetros de calidad del agua post-tratamiento.....	42

**Lista de Figuras**

Figura 1. Diagrama de flujo de metodología.....	21
Figura 2. Capacidad de crecimiento de las cepas de estudios en distintos medios de Control. Contenido de biomasa (A). Contenido de proteína (B).....	33
Figura 3. Reactores a distintas concentraciones de $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , tomadas en el día 10 (A) y día 30 (B).	34
Figura 4. Crecimiento de biomasa de <i>Chlorella</i> sp (A) y <i>Scenedesmus</i> sp (B) en medio de cultivo a distintas concentraciones de Carbonato de Sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ).....	35
Figura 5. Contenido de proteína para <i>Scenedesmus</i> sp. y <i>Chlorella</i> sp., a diferentes concentraciones de carbonato de sodio. ....	37
Figura 6. Concentración de nitratos en <i>Chlorella</i> sp. y <i>Scenedesmus</i> sp a diferentes concentraciones de carbonato de sodio. ....	38
Figura 7 . Concentración de fosfatos en las cepas de estudio. ....	39
Figura 8. Dureza total y dureza cálcica en el medio piscícola para cultivo de <i>Chlorella</i> sp. (A) y <i>Scenedesmus</i> sp. (B).....	41

**Lista de Apéndices**

Apéndice A. Ecuaciones para modelo matemático de cultivo piscícola .....	55
Apéndice B. Límites permisibles en aguas residuales.....	61
Apéndice C. Estudios previos.....	62
Apéndice D. Curvas patrón. ....	64

## Resumen

**Título:** Bioconversión de efluentes piscícolas para la producción de biomasa algal de alto valor agregado\*

**Autores:** Lynda Valentina Carreño Villarreal, Carlos Simón González Acevedo\*\*

**Palabras Clave:** Bioconversión, Piscicultura, Microalgas, Fitorremediación.

### Descripción:

Actualmente la técnica en auge de acuicultura posee una problemática ambiental al generar altos contenidos de desechos orgánicos con altas dosis de nitrógeno, fósforo y carbono disuelto que conducen a la eutrofización. Estudios reportan que las microalgas son viables para el tratamiento de estas aguas residuales, con la ventaja de una generación de biomasa aprovechable. En el presente trabajo se evaluó el crecimiento de *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. en un agua residual piscícola (ARP) proveniente de Zulia, Norte de Santander, en reactores de vidrio con agitación por entrada de aire pre-filtrado a 0.6 vvm, expuestos a ciclos de luz:oscuridad por 12:12 horas durante 30 días, comparando el medio de cultivo (medio de control BBM, medio estéril, medio no estéril), en donde *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. generaron 0.77 g/L y 0.68 g/L de biomasa y 51.6 %p/p y 53.8% p/p en proteína, en medio de cultivo no estéril respectivamente, superando el crecimiento en medio estéril .

Se realizó el estudio del efecto de la fuente de carbono en el medio ARP por 30 días de las cepas *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp., agregando carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) y variando la concentración desde 0.8 a 1.6 g/L. Donde se determinó que *Scenedesmus* sp. reportó su máxima productividad en biomasa de 23.83 mg/L/día en el medio de control, alcanzando porcentajes de remoción de 99.7% en nitratos y 89% de fosfatos. *Chlorella* sp. reportó su mejor productividad de biomasa (28 mg/L/día) en el medio al que se le adicionó  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 1.6 g/L.

Finalmente se caracterizó el ARP post-cultivo y se determinó que ambas cepas tuvieron la capacidad de disminuir la dureza total y la DQO, cumpliendo con la Resolución 631 del 17 de marzo de 2015 expedida por el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible para vertimiento de aguas residuales.

---

\*Trabajo de Grado

\*\*Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director Crisóstomo Barajas Ferreira. Codirectora Janet Bibiana García Martínez.

### Abstract

**Title:** Bioconversion of piscicultural wastewater effluents for the production of algal biomass of high added value\*

**Authors:** Lynda Valentina Carreño Villarreal, Carlos Simón González Acevedo \*\*

**Key Words:** Bioconversion, Pisciculture, Microalgae, Phycoremediation.

#### Description:

Currently, the growing aquaculture technique has an environmental problem by generating high levels of organic waste with high doses of nitrogen, phosphorus and dissolved carbon that lead to eutrophication. Studies report that microalgae are viable for the treatment of these wastewater, with the advantage of a generation of usable biomass. In the present work, microalgae growth was studied for *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. in a piscicultural wastewater (PW) from Zulia, North of Santander, in glass reactors with agitation by inlet of pre-filtered air at 0.6 vvm, exposed to light-dark cycles for 12:12 hours for 30 days, comparing the culture medium (BBM control medium, sterile medium, non-sterile medium), where *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. generated 0.77 g/L and 0.68 g/L of biomass and 51.6% w/w and 53.8% w/w in protein, in non-sterile culture medium respectively, surpassing growth in sterile medium.

The study of the effect of the carbon source on the PW medium was performed for *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp., during 30 days of cultivation, adding sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) and varying the concentration from 0.8 to 1.6 g/L. Where it was determined that *Scenedesmus* sp. reported its maximum biomass productivity of 23.83 mg/L/day in the control medium, reaching 99.7% removal rates in nitrates and 89% in phosphates. *Chlorella* sp. reported its best biomass productivity (28 mg/L/day) in the medium to which  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  was added at 1.6 g/L.

Finally, the post-cultivation PW was characterized and it was determined that both strains had the capacity to reduce total hardness and COD, complying with Resolution 631 of March 17, 2015 issued by the Ministry of Environment and Sustainable Development of Colombia for wastewater discharge.

---

\* Bachelor Thesis

\*\*Faculty of Physicochemical Engineering. School of Chemical Engineering. Director Crisóstomo Barajas Ferreira. Co-director Janet Bibiana García Martínez.

## Introducción

El crecimiento anual mundial de consumo de pescado se ha duplicado como consecuencia del crecimiento demográfico, poniendo de manifiesto que el sector pesquero es fundamental para alcanzar la meta de la Organización de las Naciones Unidas para Alimentación y la Agricultura - FAO de un mundo sin hambre ni malnutrición (FAO, 2018). En Colombia existe una autoridad política pesquera con fines de investigación, ordenamiento, administración, control y vigilancia de los recursos pesqueros denominada Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca (Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca, 2011), la cual en consenso con las demás actividades productivas de Colombia permite el desarrollo de una economía circular competente, promoviendo ambiciosos programas para la producción, tratamiento y disposición final de las aguas residuales, cumpliendo con los objetivos de desarrollo sostenible y generando posibles soluciones a problemáticas ambientales relacionadas con contaminación de las fuentes hídricas (“Plan nacional de manejo de aguas residuales en Colombia,” 2004).

Según la FAO, la acuicultura se define como la cría de organismos acuáticos, comprendidos peces, moluscos, crustáceos y plantas (FAO, 2003). Esta organización indica que la técnica de acuicultura aporta casi el 50% de los productos pesqueros mundiales destinados a la alimentación, siendo posiblemente el sector de producción de alimentos de crecimiento más acelerado. También reporta que tan solo en el año de 2016, en Colombia se alcanzó una producción total de 96.970 toneladas de peces para consumo humano, desplazando a la práctica de la pesca nacional y de captura. El comercio de estos productos contribuyen al crecimiento económico de las zonas donde se realizan estas prácticas, que generalmente son zonas rurales y altamente vulnerables (Autoridad

Nacional de Acuicultura y Pesca, 2011). La acuicultura a pesar de ser práctica, eficaz y viable, genera desechos hídricos orgánicos que contienen altas dosis de compuestos nitrogenados (amoníaco, nitritos y nitratos), fósforo y carbono disuelto que conducen al deterioro ambiental en altas concentraciones generando el fenómeno de eutrofización (Lananan et al., 2014).

La compañía de tratamiento de aguas Aqualia (tercera más grande de Europa), informa que el uso de microalgas para tratamiento de aguas residuales de acuicultura, reduce el consumo de energía, pues éstas pueden ser usadas para producir biomasa debido a la similitud en la composición del medio de cultivo de los microorganismos (Acién, Gómez-Serrano, Morales-Amaral, Fernández-Sevilla, & Molina-Grima, 2016).

La elección de las especies a cultivar depende directamente de la finalidad que se le desea brindar a la biomasa resultante y/o si el cultivo es para ficorremediación (Hernández-Pérez & Labbé, 2014), que consiste en el uso de macro o microalgas para la remoción o biotransformación de contaminantes, incluidos nutrientes, xenobióticos y CO<sub>2</sub> del agua residual (Veuthey, 2018).

Las microalgas en un cultivo para ficorremediación deben cumplir con 3 condiciones: alta tasa de crecimiento; alta tolerancia a la variación estacional y diurna si es un sistema abierto; y buena capacidad para formar agregados para una cosecha por simple gravedad (Park, Craggs, & Shilton, 2011). Los géneros *Chlorella*, *Ankistrodesmus*, *Scenedesmus*, *Euglena*, *Chlamydomonas*, *Oscillatoria*, *Micractinium*, *Golenkinia*, *Phormidium*, *Botryococcus*, *Spirulina*, *Nitzschia*, *Navicula* y *Stigeoclonium* han sido registrados como microalgas para ficorremediación en aguas residuales desde distintas procedencias (Abdel-Raouf, Al-Homaidan, & Ibraheem, 2012; Borowitzka, 1999; Rawat, Ranjith Kumar, Mutanda, & Bux, 2011).

La acuicultura y las microalgas podrían formar una alianza prometedora donde las aguas residuales generadas en la acuicultura pueden utilizarse para la generación de biomasa, y la biomasa generada puede dirigirse hacia la producción de alimento para acuicultura. El uso de aguas residuales de acuicultura minimiza la dependencia del cultivo de microalgas en agua dulce y nutrientes químicos. La biomasa algal también tiene un amplio uso que va desde biofertilizante a producción de biocombustibles, alimentación animal y humana, y para la obtención de productos biotecnológicos con uso en medicina, farmacia y/o cosmética (Gómez-Luna, 2007). La coproducción de biodiesel y bioetanol a partir de *Scenedesmus* sp. ha demostrado un enfoque efectivo hacia el desarrollo sostenible de microalgas en biorrefinería (Pancha et al., 2016).

Hoy en día, las microalgas se comercializan en diferentes formas, como tabletas, cápsulas y líquidos. También se pueden incorporar en pastas, bocadillos, barras de caramelo o gomas y bebidas (Yamaguchi, 1996). El consumo humano de microalgas se limita a pocas especies debido al estricto control sobre seguridad alimentaria, factores comerciales, demanda del mercado y preparación específica. Los 3 géneros más destacados son *Chlorella*, *Spirulina* y *Dunaliella*, que se comercializan como suplementos alimentarios (Spolaore, Joannis-Cassan, Duran, & Isambert, 2006). Algunos compuestos que se pueden extraer de estas microalgas son los ácidos grasos esenciales como el Ácido araquidónico (ARA), Ácido eicosapentaenoico (EPA) y Ácido docosahexaenoico (DHA) que también son suplementos alimenticios usados en formulas infantiles y dietas. La *Chlorella* también se comercializa por su valor medicinal, ya que protege contra la insuficiencia renal y promoción del crecimiento de *Lactobacillus* intestinales. Además, favorece la disminución en concentraciones de colesterol sanguíneo (Hernández-Pérez & Labbé, 2014).

Otro tipo de sustrato de alto valor agregado que se puede obtener gracias a la biomasa microalgal son los denominados carotenoides, específicamente hablando de Astaxantina y Cantaxantina pigmentos utilizados en la coloración de carnes salmónidas, los cuales bajo ciertas condiciones pueden ser acumulados por algunas estirpes de *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus*, *Ankistrodesmus*, *Coelastrum* y *Dictyococcus*. (Guerrero et al., 1999); el color rosado de esta carne representa 100 millones de dólares anuales, representando un mercado de rápida expansión, este aditivo alimentario se produce por síntesis química y está disponible a un precio de 3000 US\$/kg (Ahmed, Li, & Schenk, 2012).

Además de su uso en nutrición humana, se pueden incorporar microalgas en el alimento para una amplia variedad de animales que van desde peces (piscicultura) hasta mascotas y animales de granja. De hecho, el 30% de la producción mundial de algas se vende para aplicaciones de alimentación animal (Becker, 2004), siendo esenciales en acuicultura, debido a que forman parte de la cadena alimenticia en cualquier estanque o criadero convencional. Cabe resaltar que la recuperación de biomasa aportaría de un 20% a 30% sobre los costos totales de producción en estanques piscícolas, si esta fuese recirculada durante todo el proceso (Molina Grima, Belarbi, Acién Fernández, Robles Medina, & Chisti, 2003).

Los parámetros iniciales para el crecimiento de los microalgas, como la intensidad de la luz, el control de la temperatura, la concentración de nutrientes y fuente de carbono, deben ser estudiados para adecuarlas al medio de cultivo y así evitar pérdidas económicas (Hernández-Pérez & Labbé, 2014). El control de estos parámetros de crecimiento del cultivo de microalgas toma relevancia en la cosecha de microalgas en aguas de desechos acuícolas, ya que ésta es una práctica poco

competitiva, debido a la baja tasa de crecimiento, la cual aumenta la retención en el tiempo (Gao et al., 2016).

El enfoque del presente proyecto de investigación es el de analizar las condiciones iniciales que permita el mayor crecimiento microalgal en un efluente piscícola, y posteriormente evaluar la capacidad de las microalgas para mantener los parámetros de calidad como pH, DQO, DBO, acidez, alcalinidad, dureza, nitratos y fosfatos, dentro de los límites establecidos por la normativa colombiana.

Esta iniciativa actualmente emergente y amigable con el medio ambiente, permitirá producir biomasa microalgal de amplia usabilidad y con alto valor agregado, disminuyendo las altas concentraciones de desechos orgánicos que afectan el ecosistema (Ansari, Singh, Guldhe, & Bux, 2017). Logrando con esto una tecnificación ecológica y eficiente de la agroindustria piscícola actualmente ascendente.

## **1. Objetivos**

### **1.1. Objetivo General**

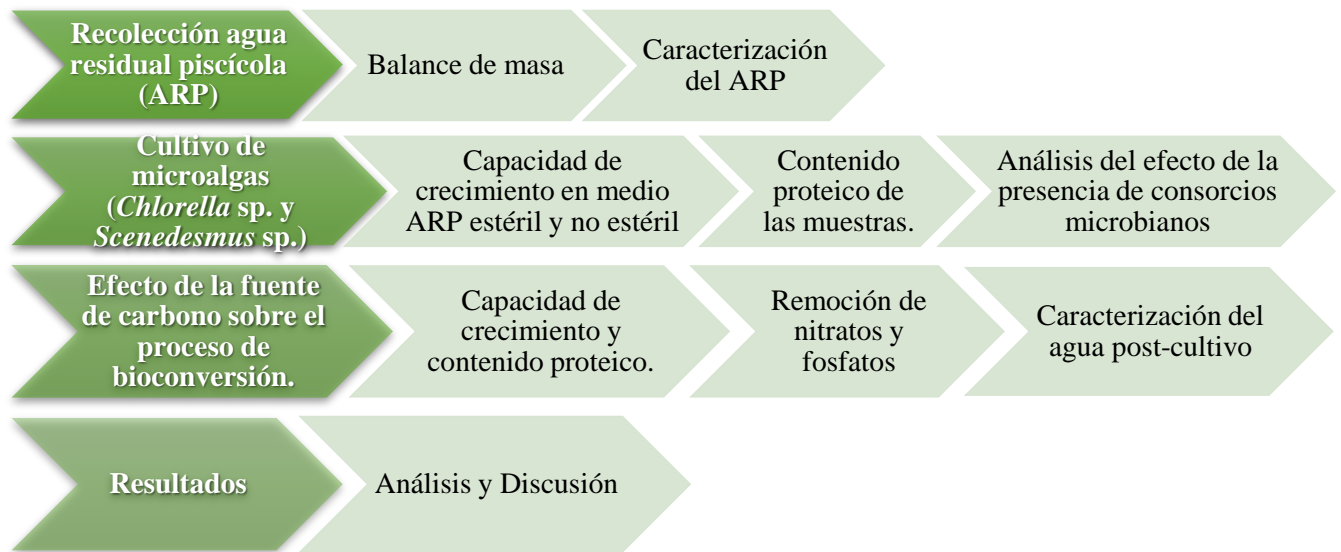
Desarrollar un sistema de bioconversión de efluentes piscícolas para la producción de biomasa microalgal de alto valor agregado a escala de laboratorio.

### **1.2. Objetivos Específicos**

- Determinar la producción de efluentes generados de un sistema de producción piscícola mediante balance de masa con el fin de identificar las cantidades generadas de residuos y demanda de recurso hídrico.
- Analizar el efecto de la presencia de consorcios microbianos de los efluentes piscícolas en la producción de biomasa algal.
- Determinar la concentración de carbonato de sodio como fuente de carbono del medio de cultivo, mediante métodos de caracterización que favorezca la producción de la biomasa algal.

## 2. Metodología

En la *Figura 1* se resume el esquema de la metodología para la realización de este proyecto, con las distintas fases.



*Figura 1.* Diagrama de flujo de metodología.

### 2.1. Balance de masa y agua en cultivos de Tilapia

Se realiza un balance de masa basado en un modelo para la siembra de 40.000 alevines de Tilapia, según lo expuesto en el Manual de Producción y Consumo Sostenible Gestión del Recurso Hídrico en ambientes convencionales (González Valencia et al., 2016). En donde se determinaron los parámetros para calcular el indicador de consumo de agua, el suministro de alimento, la

producción de sedimentos por las heces de los peces y por el desperdicio de alimento que no se consume.

## 2.2. Muestra de efluente

La muestra de agua de piscicultura fue recolectada en la piscícola El Manantial, ubicada en el municipio de Zulia (Norte de Santander), en donde se cultiva *Oreochromis sp*, una especie de Tilapia. Las muestras se tomaron teniendo en cuenta la Norma NTC-ISO 5667-3 (ICONTEC, 2004). Para lo anterior se emplearon frascos ámbar de borosilicato con tapa GL-45 de 500 mililitros, previamente esterilizados. Una vez tomadas las muestras se guardaron en contenedores térmicos a 5°C y se transportaron para determinar los siguientes análisis: pH, conductividad, temperatura, sólidos totales (ST), sólidos sedimentables (SSED), sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV), demanda bioquímica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>), demanda química de oxígeno (DQO), dureza total, dureza cálcica, nitratos (NO<sub>3</sub>) y fosfatos (PO<sub>4</sub>).

## 2.3. Cultivo de microalgas

Se evaluó la capacidad de crecimiento de dos microalgas (*Scenedesmus sp* y *Chlorella sp*) en efluentes de piscicultura. Las cepas fueron obtenidas del cepario de la Universidad Francisco de Paula Santander. Las microalgas se mantuvieron en medio Bold Basal Modificado (BBM) (Andersen, 2005). Cada cepa se mantuvo de forma axénica (mono algal) en reactores de vidrio de 2 L con un volumen de cultivo de 1 L, acoplado a un sistema de aireación filtrado a un flujo de 0.6 vvm. Para mantener el alga en fase exponencial, una vez cada 15 días 25 mL (10% v/v) de alga se

re-inocularán en 225 mL de medio de cultivo fresco. En cada uno de los pases programados se revisará la presencia de contaminantes en el cultivo mediante la inoculación de medio sólido.

## **2.4. Capacidad de crecimiento**

2 litros de agua post-consumo fue filtrada empleando papel filtro cuantitativo (para remover material particulado), luego 1 litro se esterilizó a 120 psi y 30 minutos. Para probar cada una de las cepas, 200 mL de medio estéril (medio de control BBM) fue inoculado de forma axénica en cámara de flujo laminar con 50 mL de las cepas seleccionadas. El medio no estéril se inoculó de forma igual que el control (200 mL de medio y 50 mL de la cepa) en cámara de flujo laminar para evitar contaminación cruzada de las cepas a estudiar. Cada uno de los reactores (2 con medio estéril y 2 sin medio estéril) estuvieron acoplados a un sistema de aireación filtrado a un flujo de 0.6 vvm y mantenidos en un ciclo de luz:oscuridad de 12:12 horas. Cada uno de los experimentos tuvo una duración de 30 días.

**2.4.1. Cuantificación de la biomasa.** Una vez cada 10 días durante 30 días se tomaron 35 mL de medio de cultivo, los cuales se filtraron utilizando filtros Whatman GF/C pre-combustionados durante 1 hora a 100°C. Una vez terminado el proceso, los filtros fueron llevados a horno durante 12 horas a 100°C, seguido por 1 hora en desecador hasta alcanzar peso constante (Borowitzka & Moheimani, 2013). Para optimizar el secado de los filtros, éstos fueron montados dentro de Cajas de Petri con esferas de Silica Gel en el fondo. La cantidad de biomasa (g) se determinó a partir de la siguiente ecuación:

$$CB = \text{Peso seco} + \text{microalga después de desecador} - \text{Peso seco del filtro} \quad (\text{Ec.1})$$

**2.4.2. Cuantificación de proteínas.** Los filtros con la biomasa seca obtenidos de la fase anterior se almacenaron en ultracongelación para posteriormente realizar la cuantificación de proteínas según la metodología propuesta por Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951; Slocombe, Ross, Thomas, McNeill, & Stanley, 2013. Se usó un espectrofotómetro (UV-1800 SPECTROPHOTOMETER) para realizar la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm de la muestra. Realizando previamente la curva de medición estándar correspondiente con albumina de suero bovino. La concentración de proteína en mg/L se relacionó con la densidad óptica (DO) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$CP = DO_{600nm} * 2629 \quad (\text{Ec.2})$$

## **2.5. Efecto de la fuente de carbono para la producción de biomasa.**

Para determinar el efecto de la concentración de carbonato de sodio como fuente de carbono en la producción de biomasa algal de *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp., se empleó una variación de la concentración de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) entre 0.8 a 1.6 g/L, como se muestra en la Tabla 1; **Error! No se encuentra el origen de la referencia..** Como control se empleó un reactor sin adición de fuente carbono. Los experimentos se desarrollaron en ocho reactores de vidrio de 2 L con volumen de trabajo de 1 L, de los cuales 100 mL corresponden al inóculo y 900 mL es el agua residual piscícola (ARP). La salida del reactor se conectó de forma axénica a un sistema de agitación por entrada de aire pre-filtrado a un flujo de 0.6 vvm y ciclo de luz oscuridad 12:12 horas. Cada uno de los experimentos tuvo una duración de 30 días.

Tabla 1.

*Análisis de experimentos.*

Variable	Nivel		
	-1	0	1
Carbonato de sodio (g/L)	0.8	1.2	1.6

A estos tres (3) niveles junto con el nivel de control se les realizó la respectiva cuantificación de biomasa y proteínas.

## 2.6. Cuantificación de nitratos y fosfatos

Una vez cada 10 días durante 30 días se tomaron 35 mL del volumen de cultivo, previamente filtrados para la medición de la concentración de nitratos y fosfatos, empleando curvas patrón realizadas en el laboratorio INNOVALGAE (Laboratorio de Innovación y Desarrollo en Microalgas y Cianobacterias) de la Universidad Francisco de Paula Santander, sede de Campos Elíseos, Norte de Santander. Los métodos usados, las ecuaciones ajustadas y la preparación de las curvas se describen en el Apéndice D.

## 2.7. Caracterización del agua post-cultivo.

Una vez terminados los 30 días de cultivo se realizó la caracterización del medio de cultivo en el Laboratorio de Calidad Ambiental de la UFPS. Para recolectar las muestras se emplearon frascos ámbar de borosilicato con tapa GL-45 de 500 mL, previamente esterilizados, luego el agua de

cultivo fue centrifugada a 30°C durante 15 minutos a 3600 rpm y posteriormente filtrada al vacío haciendo uso de una bomba de vacío BOECO R-300, la cual ofrece un vacío máximo de 670 mmHg. Posteriormente, se realizaron mediciones de pH, alcalinidad, acidez, DBO<sub>5</sub>, DQO, dureza total y dureza cálcica, siguiendo los protocolos del Laboratorio de Calidad Ambiental.

**.2.7.1. Acidez.** Se tomaron 50 mL de cada una de las muestras las cuales se llevaron a un Erlenmeyer de 250 mL, se adicionaron 3 gotas de fenolftaleína como solución indicadora, y se valoró la muestra con Hidróxido de Sodio (NaOH), 0.02 N hasta que la solución pasó de ser incolora a un rosado tenue, y se registró la cantidad de volumen de reactivo gastado en mL. La ecuación que relaciona la acidez con los mL de NaOH gastados es:

$$\frac{mg}{L} CaCO_3 = \frac{V(mL) * N \left( \frac{meq}{mL} \right) * Meq \left( \frac{g}{meq} \right) * 1000 \left( \frac{g}{mg} \right)}{Volumen de la muestra (L)} \quad (Ec. 3)$$

**2.7.2. Alcalinidad.** 50 mL de cada una de las muestras se llevaron a un Erlenmeyer de 250 mL, se adicionaron 4 gotas de indicador mixto (Rojo de Metilo-Verde de Bromocresol) como solución indicadora, y se valoró la muestra con Ácido Sulfúrico H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.02 N hasta que la solución pasó de ser color verde a un color rojo ladrillo, y se registró la cantidad de volumen de reactivo gastado en mL. La ecuación que relaciona la alcalinidad con los mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gastados es la Ecuación 3.

**2.7.3. Dureza.** Se tomaron 100 mL de muestra, de los cuales 50 mL se usaron para medir dureza cálcica, estos se llevaron a un Erlenmeyer de 250 mL, se adicionaron 2 esferas de NaOH y se disolvió la muestra, luego se agregó una pequeña cantidad de Murexide en polvo como solución indicadora (la solución se tornó de color rosado), y se tituló la solución con EDTA 0.2 N hasta que la solución viró a color morado y se registró el volumen consumido de EDTA.

Los 50 mL restantes de muestra se utilizaron para medir Dureza Total, a los cuales se le adicionaron 2 mL de amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) concentrado y se agitó hasta homogenizar la solución. Posteriormente, se le agregó el indicador el cual consiste en una pequeña cantidad de negro de Eriocromo (la solución se tornó color vino) y se tituló con EDTA 0.2 N hasta que la solución tornó a color azul. Los mililitros gastados de EDTA, se relacionan con la dureza de la muestra mediante la Ecuación 3.

**2.7.4. Demanda Bioquímica de Oxígeno ( $\text{DBO}_5$ ).** Para la determinación de oxígeno disuelto se siguió el procedimiento descrito por Gaitán, 2004; Orjuela, 2013. Para este caso se airearon 4 reactores de 4 litros con agua destilada, debido a que se realizaba una alícuota de 30 mL de muestra y se requería aforar un mínimo de 8 Winklers hasta 300 mL cada uno. Las muestras se titularon y se calculó la demanda bioquímica de oxígeno según lo descrito por la Ecuación 4.

$$DBO_5 \left[ \frac{mg}{L} O_2 \right] = \frac{(OD_5 - OD_1) * 300}{Vm (mL)} \quad (\text{Ec.4})$$

**2.7.5. Demanda Química de Oxígeno (DQO).** Se determinó la demanda química de oxígeno a partir de la metodología propuesta por Chica, Galvis, & Acevedo, 2007; Rodríguez, 2007. En

donde se tomó una muestra de 2.5 mL, a la cual se le adicionó 1.5 mL de reactivo digestor y 3.5 mL de reactivo de ácido sulfúrico luego se dejó en vortex y posteriormente los tubos se dejaron en digestor durante 2 horas. Finalmente, se dejaron enfriar las muestra y se calibró el blanco en un espectrofotómetro (UV-1800 SPECTROPHOTOMETER) a 610 nm, luego se leyó la absorbancia para luego hallar la concentración en mg/L de O<sub>2</sub> de acuerdo a la ecuación(Ec.5) realizada a partir de la curva de calibración.

$$DQO \left[ \frac{mg}{L} O_2 \right] = DO_{610nm} * 3462 \quad (Ec.5)$$

### 3. Resultados y Discusión

#### 3.1. Balance de masa y agua en cultivos de Tilapia

Para el cultivo de Tilapia se dividió las etapas de crecimiento en: crianza, pre-engorde, y engorde. se requieren conocer los parámetros del cultivo establecido o deseado y las dimensiones de los estanques en los cuales el acuicultor realizara su proceso. En la Tabla 2 se especifican los parámetros recomendados por el Manual de Producción de Tilapia con Especificaciones de Calidad e Inocuidad (Sagarpa, 2008).

Tabla 2.

*Nomenclatura para balance de masa y agua de Tilapia de acuerdo a las etapas de cultivo.*

Parámetros	Etapa 1 (CRIANZA)	Etapa 2 (PRE- ENGORDE)	Etapa 3 (ENGORDE)	Etapa final (COSECHA)
Unidades de Tilapia (Ut)	Unidades de Alevines	Unidades de Tilapia pre-engorde	Unidades de Tilapia de engorde	Unidades para comercializar.
Temperatura media anual del agua de cultivo [°C]	4-22°C			
Mortalidad estimada (Me) [%]		3-5%		Despreciable
Talla promedio (Tp) [cm]	5	10	17	26
Peso promedio (Pp) [g]	1-5	5-80	80-600	600
Tiempo de duración (t) [meses]	1	2	4-5	N/A
Recambios de agua/hora RAH, (1 día =24h)	6	8	3	N/A
% Recambio de agua al día	10-15	5-10	40-50	
Densidad con aireación ( $\rho_a$ ) [peces/m <sup>3</sup> ]	100-150	20-50	12-30	
Densidad sin aireación ( $\rho_s$ ) [peces/m <sup>3</sup> ]	50-60	20-50	1-12	
%Proteína	45	45	45	N/A
%Biomasa	5%	3.5%	1.50%	N/A
Número de estanques (Nt)	Dependiendo de la disposición del espacio de cultivo por etapa.			

El volumen útil del estanque puede calcularse gracias a la densidad recomendada por Sagarpa, 2008 para cada etapa de cultivo y, de esta forma, tener un valor de volumen mínimo que debería contener cada estanque de cultivo de la siguiente forma:

$$V = \frac{Ut}{\rho_a/\rho_s} [m^3] \quad (\text{Ec. } 6)$$

Los cálculos referidos a los consumos de agua y alimento en cada etapa de crecimiento se realizan haciendo uso de las ecuaciones presentadas en el Apéndice A., para un cultivo modelo de cuarenta mil alevines de Tilapia, se obtendrían los siguientes valores reportados en la Tabla 3.

Tabla 3.

*Resultados de modelo matemático para cultivo de Tilapia.*

<b>Unidades de alevines de Tilapia</b>	40000
<b>Consumo total de agua [m<sup>3</sup>]</b>	952216
<b>Consumo total de alimento para todas las etapas (ton)</b>	330
<b>Total de Sedimentos (Desechos de alimentos + Heces) (ton)</b>	70.9

Estos resultados están acordes con los reportados por el Manual de Producción y Consumo Sostenible Gestión del Recurso Hídrico en ambientes convencionales (González Valencia et al., 2016).

Con los resultados expuestos en la Tabla 3 se puede evidenciar el consumo de agua para cultivo de Tilapia, en donde se generan más de 900 mil m<sup>3</sup> para casi 8 meses de cultivo, y una producción de 70 toneladas de desechos, en donde se encuentran grandes cantidades de partículas orgánicas de carbono y nitrógeno, que son fuentes de alimento para las microalgas que podrán bio-consumir estos desechos, aumentando su biomasa, con la cual se podrán producir metabolitos de interés.

### 3.2. Caracterización del efluente piscícola

La muestra de agua de piscicultura presenta los siguientes parámetros fisicoquímicos, medidos en el Laboratorio de Calidad Ambiental de la Universidad Francisco de Paula Santander:

Tabla 4.

*Caracterización inicial del efluente piscícola.*

PARÁMETRO	UNIDADES	RESULTADO
<b>pH</b>	Unidades de pH	6.22
<b>Temperatura</b>	°C	26.3
<b>Conductividad</b>	μs	212
<b>DBO<sub>5</sub></b>	mg O <sub>2</sub> /L	3.6
<b>DQO</b>	mg O <sub>2</sub> /L	100
<b>Sólidos sedimentables (SSED)</b>	mg/L	<0.1
<b>Sólidos totales (ST)</b>	mg/L	52
<b>Sólidos suspendidos totales (SST)</b>	mg/L	<b>52</b>
<b>Sólidos suspendidos volátiles (SSV)</b>	mg/L	33.33
<b>Dureza cálcica</b>	mg CaCO <sub>3</sub> /L	53.33
<b>Dureza total</b>	mg CaCO <sub>3</sub> /L	71.33
<b>Nitratos (NO<sub>3</sub>)</b>	mg NO <sub>3</sub> /L	<b>150</b>
<b>Fosfatos (PO<sub>4</sub>)</b>	mg PO <sub>4</sub> /L	<b>100</b>

La actividad de piscicultura no se encuentra en ningún capítulo de la Resolución 631 de 2015 del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de Colombia (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de Colombia, 2015), en donde se establecen los parámetros y los valores límites máximos permisibles de vertimiento de aguas. Sin embargo, en el Artículo 15 de esta resolución define los parámetros para actividades industriales, comerciales o de servicios que no pertenecen a ninguna de las categorías. Éstos valores límites se resumen en el Apéndice B.

Los parámetros fisicoquímicos que no se encuentran dentro de los límites máximos permitidos para vertimiento en fuentes hídricas se resaltan en la Tabla 4. Los sólidos suspendidos totales

(SST), superan de manera insignificante los límites permitidos, estos pueden ser removidos por medios mecánicos, como por ejemplo filtración en vacío o centrifugación, lo cual a escala de laboratorio no representa mayor complicación.

Se evidencia que en el agua de piscicultura se encuentran altas concentraciones de nitratos y fosfatos. Estudios previos han demostrado que compuestos nitrogenados presentes en exceso son responsables de generar eutrofización, lo cual interrumpe el equilibrio del ecosistema acuático y podría conducir a una masiva mortalidad de fauna acuática (Lananan et al., 2014). El exceso de materia orgánica en el agua también estimula el crecimiento de hongos *Branchiomyces* causantes de la enfermedad branquiomicosis en cultivos de Tilapia reduciendo el flujo sanguíneo y causando necrosis en los tejidos de las branquias del pez (Jimenez Guzman et al., 1988); por lo tanto, es necesario mejorar las condiciones del agua residual piscícola (ARP) y aprovecharla en el cultivo de microalgas realizando el tratamiento de ficorremediación.

### **3.3. Evaluación de la capacidad de crecimiento de microalgas**

Pasados los 30 días de cultivo de las cepas de microalgas se pudo analizar el crecimiento de *Scenedesmus sp.* y *Chlorella sp.* en el medio de control (BBM), el medio piscícola estéril y medio piscícola no estéril como se observa en la Figura 2.

La cepa *Chlorella sp.* demuestra un crecimiento en efluente piscícola no estéril semejante al medio BBM, obteniendo 0.73 (g/L) y una concentración de proteínas de 58.5 (%p/p), en el medio BBM; el medio no estéril se le acerca con valores de 0.68 (g/L) y 53.7 (%p/p), en biomasa y contenido proteico respectivamente.

La Figura 2 también evidencia la capacidad de crecimiento de *Scenedesmus* sp., la cual es mayor a la cepa *Chlorella* sp. en medio no estéril, reportando concentración de biomasa de 0.77 g/L, con un contenido proteico de 51.6% p/p evidenciando una factibilidad de crecimiento de ambas cepas en medio sin esterilización en competencia con otros consorcios microbianos, es decir que este medio presenta condiciones adecuadas en nutrientes para el crecimiento de ambas cepas.

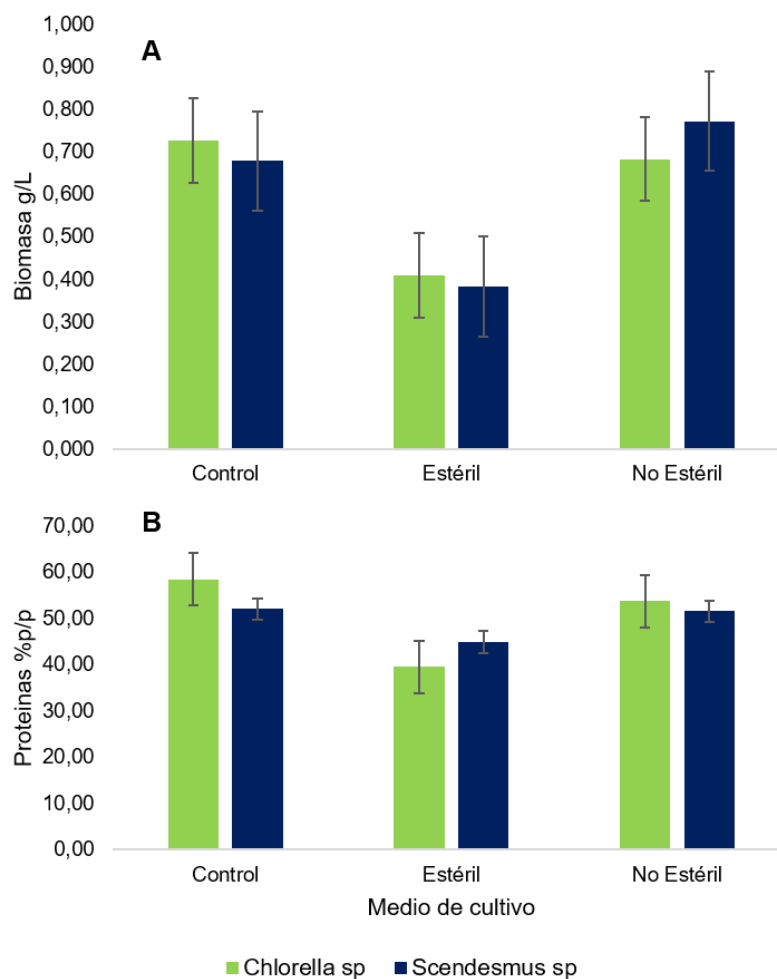


Figura 2. Capacidad de crecimiento de las cepas de estudios en distintos medios de Control. Contenido de biomasa (A). Contenido de proteína (B).

Es importante resaltar que el cultivo en medio no estéril genera mayor probabilidad de presencia de otros microorganismos en el medio de cultivo y en el ambiente. Por esta razón se decidió realizar los estudios posteriores del presente trabajo en medio esterilizado, lo que permitió caracterizar individualmente la capacidad de crecimiento y ficorremediación realizada por las microalgas.

### 3.4. Determinación del efecto de la fuente de carbono.

En la Figura 3, se muestra la disposición de los ocho reactores con capacidad de 2 L, en los días 10 y 30 de cultivo.

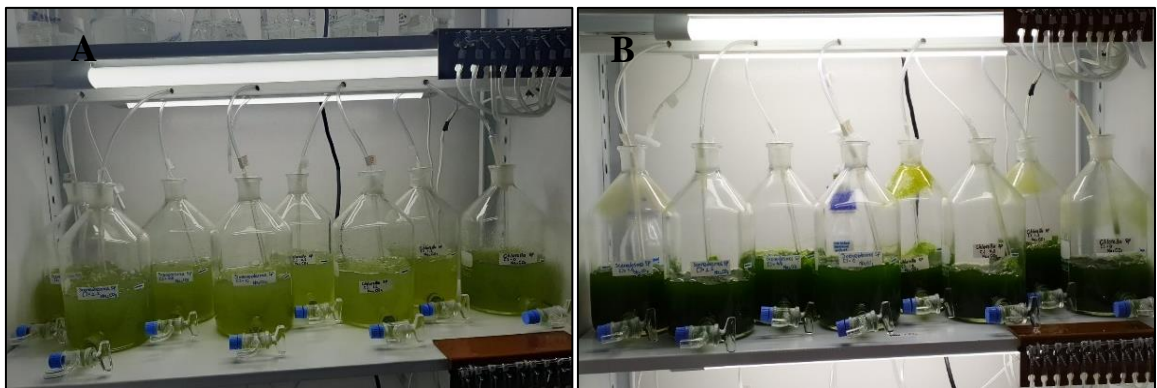


Figura 3. Reactores a distintas concentraciones de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , tomadas en el día 10 (A) y día 30 (B).

La tonalidad en el cultivo de *Scenedesmus* sp., es de un verde más claro que el de *Chlorella* sp., en el día 30 la tonalidad en ambas cepas torna a un verde oscuro, sinónimo del crecimiento de biomasa y también se evidenció acumulación de biomasa en las paredes de algunos reactores, debido a partículas dispersas por acción de aireación. Se resalta que ninguna de las cepas presentó inhibición aparente de biomasa por la interacción del carbonato de sodio a distintas concentraciones en el ARP.

### 3.4.1. Valoración de la biomasa y contenido proteico.

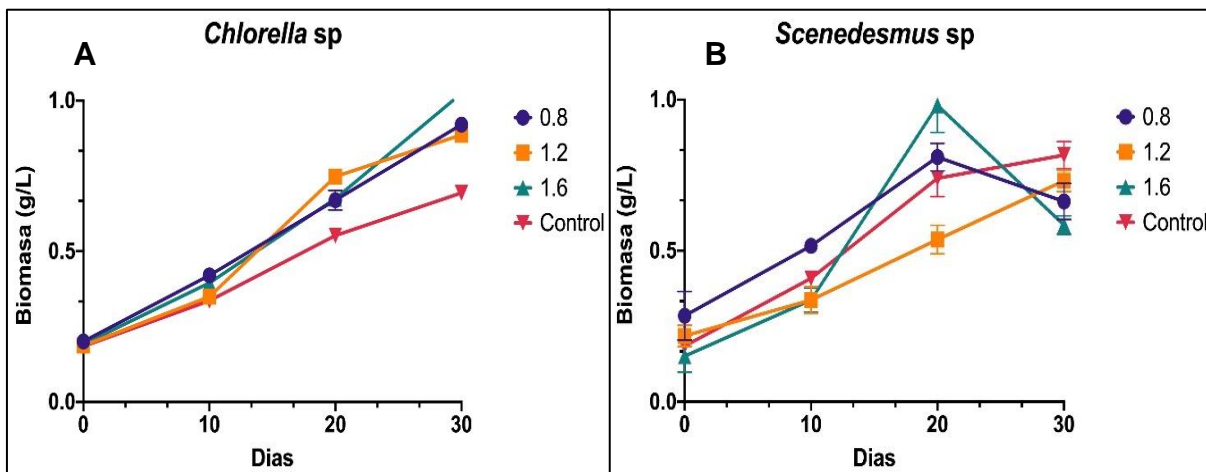


Figura 4. Crecimiento de biomasa de *Chlorella* sp (A) y *Scenedesmus* sp (B) en medio de cultivo a distintas concentraciones de Carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>).

De la Figura 4 se puede evidenciar que la biomasa creció exponencialmente en los primeros 20 días sin reportar etapa de latencia, indicando la riqueza de macronutrientes en el agua de piscicultura; posteriormente del día 20 al día 30 *Scenedesmus* sp., presenta una disminución de concentración de biomasa en los medios de cultivo con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> de 0.8 y 1.6 g/L, así mismo lo reportó *Chlorella* sp., en concentraciones de 1.2 g/L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. La mayor producción de biomasa en la cepa *Scenedesmus* sp., se reportó en el día 20 (1.09 g/L), en el medio de cultivo con carbonato de sodio de 1.6 g/L; para la cepa *Chlorella* sp., se reporta su mayor producción de biomasa en el día 30 (1.00 g/L), en el medio de cultivo con concentración de carbonato de sodio de 1.6 g/L.

De lo anterior se puede concluir que la concentración de la fuente de carbono en el medio interfiere en el crecimiento y velocidad de éste de forma diferente para cada cepa; para el caso de *Chlorella* sp., un aumento en la concentración de carbono revela un crecimiento microalgal para todos los casos, mayor al medio de control; la concentración máxima de carbonato de sodio (1.6

g/L) inyectado al medio favorece un aumento aparentemente lineal de crecimiento de la biomasa. Por su parte la microalga *Scenedesmus* sp., no requiere de fuente de carbono externa para tener una tasa de crecimiento aceptable, alcanzando su máxima concentración de biomasa al final del experimento para este medio de control, por lo cual esta cepa es capaz de crecer correctamente utilizando la carga de carbono que le otorga el medio piscícola. Se realizaron cálculos de productividad promedio de biomasa en mg/L/día como el cambio de biomasa en el tiempo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Productividad de biomasa} \left[ \frac{\text{mg}}{\text{L} * \text{día}} \right] = \frac{X_2 - X_1}{t_2 - t_1} \quad (\text{Ec.7})$$

Donde  $X_2$  corresponde a la concentración de biomasa seca en el día 30 ( $t_2$ ) y  $X_1$  es la biomasa seca inicial ( $t_1$ ).

En la Tabla 5 se resaltan los valores máximos de productividad para cada una de las cepas, los cuales corroboran el efecto que tiene la adición de carbonato de sodio en el medio de cultivo en el crecimiento microalgal, mencionado anteriormente.

Tabla 5.

*Productividad de biomasa.*

Concentrac ión de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (g/L)	Cepas de estudio	
	Productividad de <i>Scenedesmus</i> sp (mg/L/día).	Productividad de <i>Chlorella</i> sp (mg/L/día).
0	<b>23,83</b>	16,67
0.8	16,33	27,17
1.2	20,17	21,17
1.6	14,00	<b>28,00</b>

La Figura 5 muestra el contenido proteico al final del experimento para cada cepa en cada medio de cultivo, en esta se puede evidenciar que a altas concentraciones de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  las cepas tienen un contenido similar de proteínas; además, la cepa *Scenedesmus* sp. contiene más proteína que la cepa *Chlorella* sp. en los medios de cultivos de baja concentración de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , siendo la concentración de 0,8 g/L la más favorable para ambas cepas en la acumulación del contenido proteico.

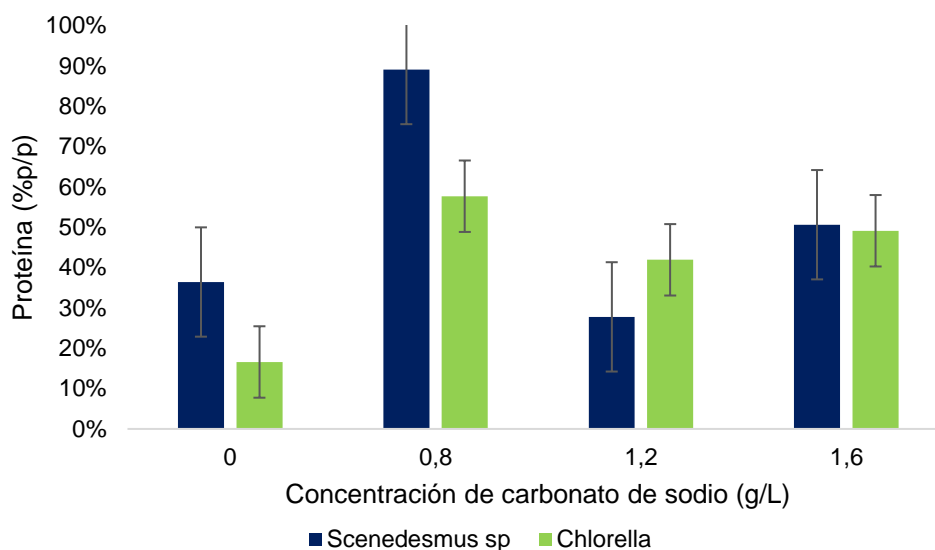


Figura 5. Contenido de proteína para *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp., a diferentes concentraciones de carbonato de sodio.

### 3.4.2. Remoción de nitratos y fosfatos en los distintos medios de cultivo.

Se determinó la concentración de nitratos para cada una de las cepas de estudio en los distintos medios de cultivo con los distintos niveles de inyección de carbonato de sodio durante los 30 días de cultivo como se puede observar en la Figura 6.

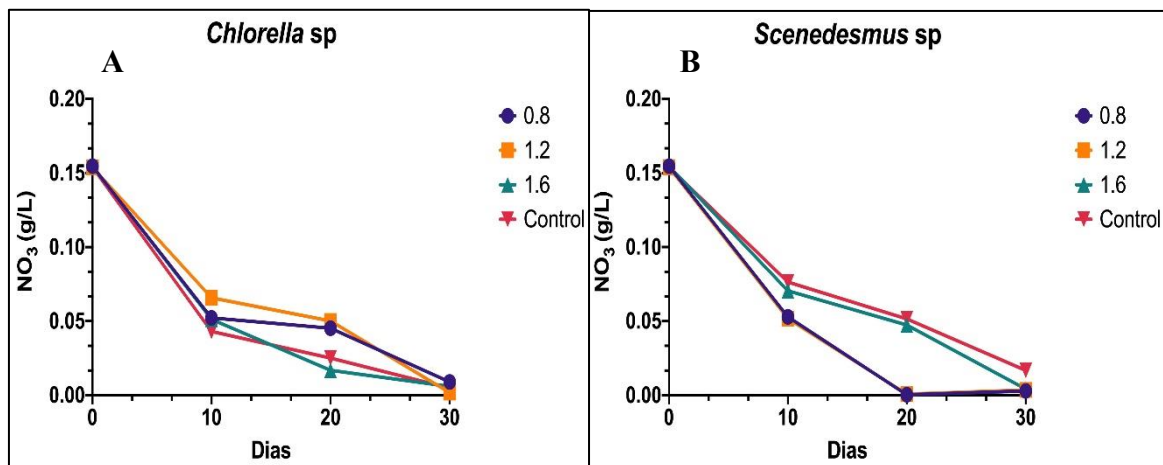


Figura 6. Concentración de nitratos en *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.* a diferentes concentraciones de carbonato de sodio.

De la anterior figura se puede afirmar que las cepas de estudio tuvieron un consumo de nitratos acelerado en los primeros diez días de cultivo, removiendo la concentración de nitratos hasta valores cercanos a cero (0 g/L).

Adicional a esto se puede evidenciar la influencia en la concentración de la fuente de carbono en la velocidad de consumo de nitratos, tiempo para que la curva tome valores próximos a cero, para cada cepa; siendo a menores concentraciones de fuente de carbono favorable para *Scenedesmus sp.*, a las cuales reportó porcentajes de remoción de NO<sub>3</sub> aproximadamente de 99%; en la cepa *Chlorella sp.* se obtiene el mayor porcentaje de remoción de nitratos del 98% a un nivel alto (1.6 g/L) de carbonato de sodio.

Estos valores son congruentes con los porcentajes de remoción obtenidos en varios procesos de cultivo de microalgas en aguas residuales, en donde se reportan un 95-98% de remoción de nitratos para efluentes provenientes de la actividad de acuicultura (Shandilya & Pattarkine, 2016).

La cuantificación de fosfatos presenta un comportamiento similar al estudio anterior, como se puede observar en la Figura 7.

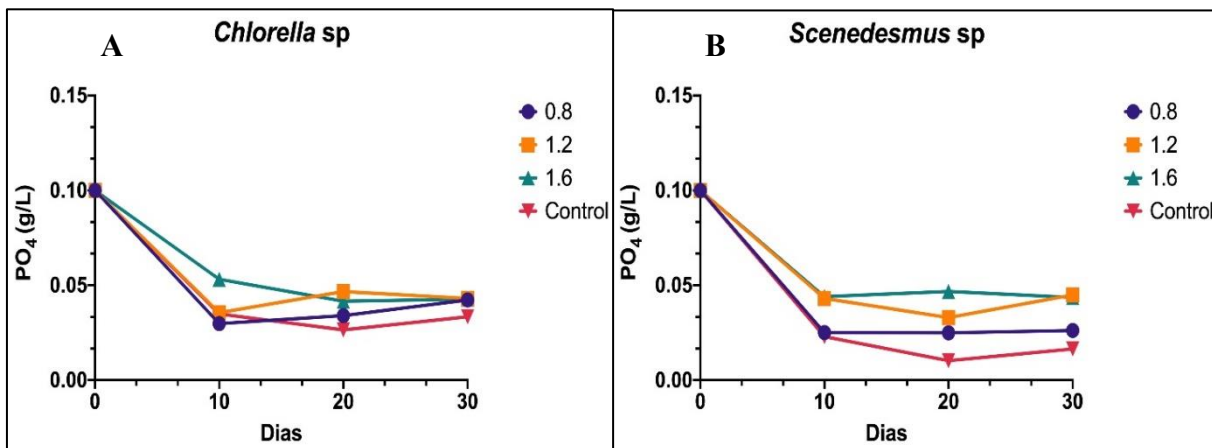


Figura 7. Concentración de fosfatos en las cepas de estudio.

Se revela un comportamiento adecuado en la reducción de la concentración de fosfatos en el medio de cultivo, según lo esperado para el tratamiento con microalgas, además al igual que con la concentración de nitratos, las microalgas tienen la capacidad de bio-consumir la mayor cantidad del fósforo en los primeros 10 días de cultivo.

En resumen, el medio de cultivo de control favorece la mayor producción de biomasa (23.83 mg/L/día), remoción de nitratos (99.7 %) y fosfatos (89%) para la cepa *Scenedesmus sp.*, por esta razón esta microalga es potencialmente favorable para el tratamiento del ARP. *Chlorella sp.* muestra un comportamiento contrario, porque el crecimiento en biomasa (28 mg/L/día) y remoción de nitratos (98%), se favorece a un nivel alto de concentración de fuente de carbono de estudio.

Gráficamente, la remoción de fosfatos en *Chlorella sp.* se favorece a bajas concentraciones de carbonato de sodio, sin embargo, los porcentajes de remoción de fosfatos que obtuvo esta cepa se encuentran en el rango de 72.7%-80%, valores aceptables que superan resultados reportados en

estudios anteriores (Shandilya & Pattarkine, 2016), los cuales tienen un máximo porcentaje de remoción de fosfatos del 71% utilizando como medio de cultivo agua residual acuícola.

### **3.5. Caracterización del agua residual de piscicultura post-cultivo**

Se midió la dureza del ARP posterior al cultivo de las microalgas. En Colombia, de acuerdo con la Resolución Número 2115 del 22 de junio del año 2007 (Ministerio de Ambiente, 2007), el límite permisible de dureza total de aguas residuales para consumo humano es de 300 mg/L de  $\text{CaCO}_3$ . La Organización Mundial de Salud (OMS), ha adoptado como concentración máxima deseable 100 mg/L de  $\text{CaCO}_3$  y como concentración máxima admisible los 500 mg/L de  $\text{CaCO}_3$ , considerando como aguas blandas aquellas aguas inferiores a los 60 mg/L de  $\text{CaCO}_3$ , medianamente dura entre 61 y 120 mg/L de  $\text{CaCO}_3$  y muy dura aquellas con valores superiores a los 180 mg/L de  $\text{CaCO}_3$ .

De acuerdo con lo realizado en el estudio se determinó que en el cultivo de *Scenedesmus* sp. el ARP se tornó de medianamente blanda a blanda con el pasar de los 30 días de cultivos, las aguas blandas son usadas en centrales hidroeléctricas, en la producción de energía nuclear y en muchos procesos industriales como en calderas.

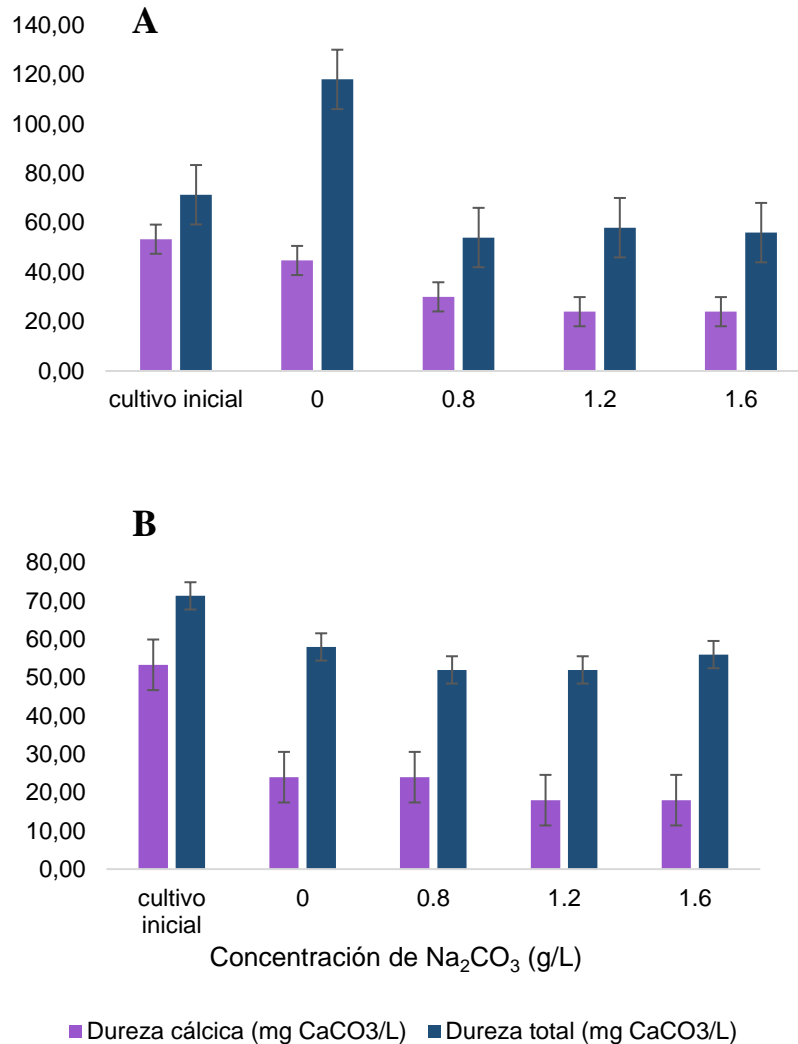


Figura 8. dureza total y dureza cálcica en el medio piscícola para cultivo de *Chlorella* sp. (A) y *Scenedesmus* sp. (B).

En la Figura 8 se evidencia la capacidad de estas cepas para reducir la dureza total y cálcica del agua residual de piscicultura, resaltando la capacidad de la microalga *Scenedesmus* sp. para reducir favorablemente la dureza de este medio de cultivo utilizando cualquiera de las

concentraciones de fuente de carbono estudiada, y, sin la necesidad de una fuente de carbono externa.

Adicional a la dureza total y cálcica del agua se midieron otros parámetros de calidad del agua como DBO<sub>5</sub>, DQO, pH y alcalinidad, los cuales se reportan en la Tabla 6.

Tabla 6.

*Parámetros de calidad del agua post-tratamiento.*

Cepa	[Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ] (g/L)	pH	Acidez (mg/L CaCO <sub>3</sub> )	Alcalinidad (mg/L CaCO <sub>3</sub> )	DBO <sub>5</sub> (mg/L O <sub>2</sub> )	DQO (mg/L O <sub>2</sub> )
<i>Chlorella</i> sp.	0	8.99	0	215.6	0	21
	0.8	<b>9.64</b>	0	<b>1150.2</b>	28	71
	1.2	<b>9.65</b>	0	<b>1321.6</b>	18	41
	1.6	<b>9.8</b>	0	<b>2262</b>	14	92
<i>Scenedesmus</i> sp.	0	8.89	0	174.4	6	66
	0.8	<b>9.58</b>	0	<b>843</b>	14	62
	1.2	<b>9.7</b>	0	<b>1415.2</b>	2	31
	1.6	<b>9.75</b>	0	<b>1574</b>	2	33

Comparando los resultados de la Tabla 6 con los valores máximos permitidos en la Tabla 8 del Apéndice B, se evidencia que la cepa *Scenedesmus* sp. en el medio de control mantiene el efluente dentro de los límites permitidos por la Resolución 631 de 2015 del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de Colombia, 2015) y la Resolución Número 2115 del 22 de junio del año 2007, el cual tiene un límite máximo de 9 para pH.

El considerable incremento de pH, se explica en gran parte al consumo de iones HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (obtenidos por la dilución del Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en el ARP) cuya disociación a CO<sub>2</sub> proporcionan el carbono

necesario para el crecimiento de las microalgas (Beltrán-Rocha, Guajardo-Barbosa, López-Chuken, & Barceló-Quinta, 2017); este aumento del pH conlleva al aumento de iones  $\text{Na}^+$  en el medio de cultivo proporcionándole al ARP una capacidad de neutralizar ácidos mayor, por esta razón la Tabla 6 revela un aumento desmedido de alcalinidad a medida que incrementa la concentración de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , lo cual debe ser analizado probando con rangos menores de concentración de carbonato de sodio o cambiando la fuente de carbono de estudio, en estudios posteriores al presente trabajo de investigación.

Adicionalmente, la demanda bioquímica de oxígeno en el agua post tratamiento aumentó en algunos medios de estudio, debido a que existe una mayor demanda de oxígeno requerido por microorganismos para la degradación de la materia orgánica presente en el ARP, sin embargo los valores de  $\text{DBO}_5$  calculados en la Tabla 6, no superan los valores máximos permitidos descritos en la Tabla 8 en el Apéndice B.

Por último, se evidencia la reducción de la demanda química de oxígeno para todos los experimentos la cual según la caracterización inicial del efluente (Tabla 4) tenía un valor de  $100 \text{ mgO}_2/\text{L}$ , demostrando que las microalgas lograron disminuir la carga de materia orgánica total presente en el ARP. De lo anterior se puede concluir que es posible realizar la ficorremediación del efluente piscícola con las microalgas de estudio sin la adición de una fuente externa de carbonato de sodio.

#### 4. Conclusiones

Este estudio permitió dar una idea de viabilidad de aplicación del bio-tratamiento del agua residual piscícola (ARP) con microalgas, a futuro en cultivos piscícolas en Colombia, los cuales tienen altos niveles de recambio de agua, consumiendo hasta 900 mil m<sup>3</sup> de recurso hídrico, y carecen de un sistema organizado de captación.

Se determinó que las cepas de estudio tienen mayor capacidad de crecimiento en el ARP no estéril en consorcio con otros microorganismos presentes en el medio, en comparación con el medio de control.

Se realizó la bioconversión del efluente piscícola como medio de cultivo para dos tipos de microalgas *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp., reportando tasas de productividad de biomasa, donde se destaca la producción de 23.83 mg/L/día en *Scenedesmus* sp. en medio de cultivo piscícola sin adición de carbonato de sodio como fuente de carbono externa, obteniendo porcentajes de remoción de 99.7% en nitratos y 89% de fosfatos superando cifras reportadas en estudios anteriores.

Se determinó que la microalga *Chlorella* sp. requiere de una fuente externa de carbono, en este caso de carbonato de sodio, para obtener resultados convencionales de producción de biomasa y reducción de macronutrientes (nitratos y fosfatos) del medio, a concentración de 1.6 g/L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

Por último, las microalgas de estudio demostraron tener potencial en el tratamiento de aguas residuales de piscicultura, manteniendo el pH, la dureza total, la demanda bioquímica de oxígeno, y demanda química de oxígeno dentro de los límites máximos permitidos por la normativa

colombiana. Resaltando la capacidad de la cepa *Scenedesmus* sp., para realizar la bioconversión del efluente piscícola de manera eficiente sin necesidad de una fuente de carbono externa, reduciendo el uso de otras sustancias en el proceso.

## 5. Recomendaciones

Se recomienda el uso de la cepa *Scenedesmus* sp., en medio de cultivo piscícola sin adición de fuente externa de carbono, para el desarrollo de un sistema piloto de bioconversión de efluentes piscícolas.

Se recomienda realizar estudios posteriores con el efecto de otra fuente de carbono, en busca de mejores resultados de crecimiento de biomasa y ficorremediación en la cepa *Chlorella* sp., adicional a esto, analizar el efecto de la fuente de carbono sobre el cambio del pH en el medio de cultivo.

Realizar una caracterización fina de la biomasa obtenida del proceso de cultivo, en relación a lípidos, carbohidratos, triglicéridos, entre otros, con el fin de determinar la adecuada usabilidad de la biomasa teniendo en cuenta la proporción de dichos componentes.

**Referencias Bibliográficas**

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., & Ibraheem, I. B. M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(3), 257–275. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>
- Acién, F. G., Gómez-Serrano, C., Morales-Amaral, M. M., Fernández-Sevilla, J. M., & Molina-Grima, E. (2016). Wastewater treatment using microalgae: how realistic a contribution might it be to significant urban wastewater treatment? *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 100, pp. 9013–9022. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7835-7>
- Ahmed, F., Li, Y., & Schenk, P. (2012). ALGAL BIOREFINERY: SUSTAINABLE PRODUCTION OF BIOFUELS AND AQUACULTURE FEED? FARUQ. In *The Science of Algal Fuels* (pp. 323–340). <https://doi.org/10.1007/978-94-007-5110-1>
- Andersen, R. A. (2005). *Algal culturing techniques*. Elsevier.
- Ansari, F. A., Singh, P., Guldhe, A., & Bux, F. (2017). Microalgal cultivation using aquaculture wastewater: Integrated biomass generation and nutrient remediation. *Algal Research*, 21, 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.015>
- Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca. (2011). AUNAP. Retrieved August 10, 2019, from <https://www.aunap.gov.co>
- Barajas-Solano, A., Garcia Martinez, J. B., Guiza-Franco, L., Orozco-Rojas, L. G., Sánchez-Galvis, M., & Zuorro, A. (2018). Production of *Chlorella vulgaris* Biomass on UV-treated Wastewater as an Alternative for Environmental Sustainability on High-Mountain Fisheries.

In *Chemical Engineering Transactions* (Vol. 64). <https://doi.org/10.3303/CET1864087>

Basu, S., Sarma Roy, A., Mohanty, K., & Ghoshal, A. (2014). CO<sub>2</sub> biofixation and carbonic anhydrase activity in *Scenedesmus obliquus* SA1 cultivated in large scale open system. In *Bioresource technology* (Vol. 164C). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.017>

Becker, W. (2004). Microalgae in human and animal nutrition. In A. Richmond (Ed.), *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology* (pp. 312–351). <https://doi.org/10.1002/9780470995280>

Beltrán-Rocha, J. C., Guajardo-Barbosa, C., López-Chuken, U. J., & Barceló-Quinta, I. D. (2017). Biotratamiento de efluentes secundarios municipales utilizando microalgas: Efecto del pH, nutrientes (C, N y P) y enriquecimiento con CO<sub>2</sub>. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 52(3), 417–427. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572017000300001>

Borowitzka, M. A. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters. *Progress in Industrial Microbiology*, 35(C), 313–321. [https://doi.org/10.1016/S0079-6352\(99\)80123-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6352(99)80123-4)

Borowitzka, M. A., & Moheimani, N. R. (2013). Algae for Biofuels and Energy. *Algae for Biofuels and Energy*, 5, 1–288. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-5479-9>

Brown, J. R., Gowen, R. J., & McLusky, D. S. (1987). The effect of salmon farming on the benthos of a Scottish sea loch. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 109(1), 39–51. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(87\)90184-5](https://doi.org/10.1016/0022-0981(87)90184-5)

Chica, O. Y., Galvis, N. F., & Acevedo, J. (2007). VALIDACIÓN DE METODOS ANALITICOS DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO (DQO). In *Grupo de Investigaciones y Mediciones*

*Ambientales.*

- FAO. (2003). Acuicultura: principales conceptos y definiciones. Retrieved from Sala de Prensa en Publicidad website: <http://www.fao.org/spanish/newsroom/focus/2003/aquaculture-defs.htm>
- FAO. (2018). *Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura*. Retrieved from <http://www.fao.org/publications/es>
- Gaitán, M. S. (2004). DETERMINACIÓN DE OXIGENO DISUELTO POR EL MÉTODO YODOMÉTRICO MODIFICACIÓN DE AZIDA. In *TP0084* (pp. 1–9).
- Gao, F., Li, C., Yang, Z. H., Zeng, G. M., Feng, L. J., Liu, J. zhi, ... Cai, H. wen. (2016). Continuous microalgae cultivation in aquaculture wastewater by a membrane photobioreactor for biomass production and nutrients removal. *Ecological Engineering*, 92, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.03.046>
- Garcia Martinez, J. B., Barajas-Ferreira, C., & Kafarov, V. (2018). *Improvement of Colombian aquaculture hydric sustainability: application of phytoremediation process under a circular economy scheme*. <https://doi.org/10.18690/978-961-286-211-4.3>
- Gardner, R. D., Cooksey, K. E., Mus, F., Macur, R., Moll, K., Eustance, E., ... Peyton, B. M. (2012). Use of sodium bicarbonate to stimulate triacylglycerol accumulation in the chlorophyte *Scenedesmus* sp. and the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Journal of Applied Phycology*, 24(5), 1311–1320. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9782-0>
- Gómez-Luna, L. M. (2007). Microalgas: Aspectos ecológicos y biotecnológicos. *Revista Cubana de Química*, 19(2), 3–20.
- González Valencia, A., Ramírez Soto, J. D., Jaramillo, D., López Gómez, S., Rodríguez, C. D.,

- Vélez, E. de J., & Araque, G. C. (2016). *Manual de Producción y Consumo Sostenible Gestión del Recurso Hídrico. Piscícolas - Cultivo de Trucha y Tilapia*. 1–67. Retrieved from [http://www.corantioquia.gov.co/SiteAssets/PDF/Gestión ambiental/Producción y Consumo Sostenible/Manuales\\_GIRH/Pisicola.pdf](http://www.corantioquia.gov.co/SiteAssets/PDF/Gestión%20ambiental/Producción%20y%20Consumo%20Sostenible/Manuales_GIRH/Pisicola.pdf)
- Guerrero, M., Rodriguez, H., Vargas Angeles, M., Garcia Gonzalez, M., del Campo, J. A., Moreno, J., & Rivas, J. (1999). *LAS MICROALGAS COMO PRODUCTORAS DE PIGMENTOS CON INTERÉS COMERCIAL*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Guldhe, A., Ansari, F. A., Singh, P., & Bux, F. (2017). Heterotrophic cultivation of microalgae using aquaculture wastewater: A biorefinery concept for biomass production and nutrient remediation. *Ecological Engineering*, 99, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.11.013>
- Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 157–173. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
- ICONTEC. (2004). NTC-ISO-5667-3: Calidad del agua. Muestreo. Parte 3: Directrices para la preservación y manejo de las muestras. *Norma Técnica Colombiana*, 57. Retrieved from <http://www.fggdggdshgd.gggsayh>
- IDEAM. (2007). *Determinación de Fósforo Soluble en Agua por el Método de Ácido Ascórbico*. Retrieved from <http://www.ideam.gov.co/documents/14691/38155/Fósforo+Soluble+en+Agua+por+el+Método+del+Acido+Ascórbico..pdf/4894199d-b9f6-414b-bd00-1ebecca63b981>

- IDEAM. (2015). Determinacion De Nitratos En Aguas Por Espectrofotometria Uv. *Ideam*, 9. Retrieved from <http://www.ideam.gov.co/>
- Jimenez Guzman, F., Garza Fernandez, N., Segovia Salinas, F., Galavez Silva, L., Iruegas Buentello, F., Adame, J. M., & Salinas Lopez, N. (1988). *Parasitos y Enfermedades de la Tilapia*. Retrieved from <http://cdigital.dgb.uanl.mx/la/1020082555/1020082555.PDF>
- Lananan, F., Abdul Hamid, S. H., Din, W. N. S., Ali, N., Khatoon, H., Jusoh, A., & Endut, A. (2014). Symbiotic bioremediation of aquaculture wastewater in reducing ammonia and phosphorus utilizing Effective Microorganism (EM-1) and microalgae (*Chlorella* sp.). *International Biodeterioration and Biodegradation*, 95(PA), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.06.013>
- Li, J., Li, C., Lan, C. Q., & Liao, D. (2018). Effects of sodium bicarbonate on cell growth, lipid accumulation, and morphology of *Chlorella vulgaris*. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0953-4>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.
- Ministerio de Ambiente, V. y D. T. de C. (2007). *Resolución 2115 del 22 de junio del año 2007*.
- Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de Colombia. (2015). *Resolución 631 del 17 de marzo del año 2015* (Vol. 2015). Retrieved from [http://www.icbf.gov.co/cargues/avance/docs/resolucion\\_minambienteds\\_0631\\_2015.htm](http://www.icbf.gov.co/cargues/avance/docs/resolucion_minambienteds_0631_2015.htm)
- Molina Grima, E., Belarbi, E. H., Ación Fernández, F. G., Robles Medina, A., & Chisti, Y. (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: Process options and economics.

*Biotechnology Advances*, 20(7–8), 491–515. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00050-2)

Nithiya, E. M., Tamilmani, J., Vasumathi, K. K., & Premalatha, M. (2017). Improved CO<sub>2</sub> fixation with *Oscillatoria* sp. in response to various supply frequencies of CO<sub>2</sub> supply. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*, 18, 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2017.01.025>

Orjuela, L. C. (2013). Hoja metodológica del indicador Demanda Bioquímica de Oxígeno en las masas de agua por estación. *Sistema de Indicadores Ambientales de Colombia. Colombia: Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales - IDEAM.*, (96), 1–7.

Pancha, I., Chokshi, K., Ghosh, T., Paliwal, C., Maurya, R., & Mishra, S. (2015). Bicarbonate supplementation enhanced biofuel production potential as well as nutritional stress mitigation in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology*, 193, 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.107>

Pancha, I., Chokshi, K., Maurya, R., Bhattacharya, S., Bachani, P., & Mishra, S. (2016). Comparative evaluation of chemical and enzymatic saccharification of mixotrophically grown de-oiled microalgal biomass for reducing sugar production. *Bioresource Technology*, 204, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.078>

Park, J. B. K., Craggs, R. J., & Shilton, A. N. (2011). Recycling algae to improve species control and harvest efficiency from a high rate algal pond. *Water Research*, 45(20), 6637–6649. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.09.042>

Plan nacional de manejo de aguas residuales en Colombia. (2004). In *Vasa*. Retrieved from <http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf>

- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., & Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, 88(10), 3411–3424. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.11.025>
- Rodríguez, C. H. (2007). Demanda química de oxígeno por reflujo cerrado y volumetría. *Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales - IDEAM*, 5, 1–11. Retrieved from <http://www.ideam.gov.co/documents/14691/38155/Demanda+Química+de+Oxígeno.pdf/f/20030922-4f81-4e8f-841c-c124b9ab5adb>
- Sagarpa. (2008). Manual de Producción de Tilapia con Especificaciones de Calidad e Inocuidad. *Control*, 143.
- Sarat Chandra, T., Deepak, R. S., Maneesh Kumar, M., Mukherji, S., Chauhan, V. S., Sarada, R., & Mudliar, S. N. (2016). Evaluation of indigenous fresh water microalga *Scenedesmus obtusus* for feed and fuel applications: Effect of carbon dioxide, light and nutrient sources on growth and biochemical characteristics. *Bioresource Technology*, 207, 430–439. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.044>
- Shandilya, K., & Pattarkine, V. (2016). Using Microalgae for Treating Wastewater. In *Advances in Feedstock Conversion Technologies for Alternative Fuels and Bioproducts* (Vol. 05, pp. 119–135). <https://doi.org/10.2174/2211550105666160420153200>
- Slocombe, S. P., Ross, M., Thomas, N., McNeill, S., & Stanley, M. S. (2013). A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass. *Bioresource Technology*, 129, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.163>

- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Velichkova, K., Sirakov, I., & Stoyanova, S. (2014). BIOMASS PRODUCTION AND WASTEWATER TREATMENT FROM AQUACULTURE WITH CHLORELLA VULGARIS UNDER DIFFERENT CARBON SOURCES. In *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies* (Vol. 18).
- Veuthey, M. J. (2018). *Ficorremediación de efluentes de la industria avícola mediante el empleo de la microalga Scenedesmus obliquus aislada del Embalse de Salto Grande*. Universidad Nacional de Entre Ríos-UNER.
- Yamaguchi, K. (1996). Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: A review. *Journal of Applied Phycology*, 8(6), 487–502. <https://doi.org/10.1007/BF02186327>
- Yeh, K.-L., Chang, J.-S., & Chen, W.-M. (2010). Effect of Light Supply and Carbon Source on Cell Growth and Cellular Composition of a Newly Isolated Microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. In *Engineering in Life Sciences* (Vol. 10). <https://doi.org/10.1002/elsc.200900116>

## Apéndices

### Apéndice A. Ecuaciones para modelo matemático de cultivo piscícola

#### ❖ Cálculos para determinación de parámetros de consumo de masa y agua en cultivo piscícola:

- a. Unidades de peces por etapa ( $U_p$  [N° de peces])

$$U_p = U_t * M_e \quad (U_t \text{ de la etapa de crecimiento anterior}) \quad (\text{Ec.8})$$

- b. Biomasa de alevinos ( $B_a$  [kg])

$$B_a = \frac{U_p * P_p}{1000 \left(\frac{g}{kg}\right)} \quad (\text{Ec.9})$$

- c. Volumen del estanque ( $V$  [ $m^3$ ]): depende de la geometría de los estanques de producción generalmente se calcula como la multiplicación entre el largo, ancho y el nivel del agua dentro del tanque para estanques rectangulares (más comunes).

- d. Densidad inicial de la etapa de crecimiento ( $\rho_i$  [unidad/ $m^3$ ])

$$\rho_i = \frac{U_p}{V} \left[ \frac{\text{Unidades}}{m^3} \right] \quad (\text{Ec.10})$$

- e. Carga inicial ( $C_i$  [kg/ $m^3$ ])

$$C_i = \frac{B_a}{V} \left[ \frac{kg}{m^3} \right] \quad (\text{Ec.11})$$

f. Volumen de agua ( $Q_{H_2O}$  [ $m^3/día$ ])

$$Q_{H_2O} = RAH * V * \left(24 \frac{h}{día}\right) \left[\frac{m^3}{día}\right] \quad (Ec.12)$$

g. Consumo de agua por etapa de crecimiento ( $D_{H_2O}$  [ $m^3$ ])

$$D_{H_2O} = t * Q_{H_2O} * \left(30 \frac{día}{mes}\right) [m^3] \quad (Ec.13)$$

h. Caudal del estanque por etapa ( $Q$  [L/s])

$$Q = Q_{H_2O} * \frac{1000 \frac{L}{m^3}}{86400 \frac{s}{día}} \left[\frac{L}{s}\right] \quad (Ec.14)$$

i. Caudal neto de la batería productiva ( $Q_{neto}$  [L/s])

$$Q_{neto} = Q_{H_2O} * Nt \left[\frac{L}{s}\right] \quad (Ec.15)$$

El porcentaje de suministro de alimento promedio (%A) es un valor leído que depende de las condiciones de temperatura del estanque, y de la longitud de los peces, estos valores se pueden obtener del Manual de Producción de Tilapia con Especificaciones de calidad e Inocuidad (Sagarpa, 2008) que se encuentra en la Tabla 7, por último la frecuencia de alimentación diaria (fr) son valores promedio establecidos por el manual para cada etapa de cultivo. Con estos parámetros se calcula el consumo total de alimentos por etapa ( $A_e$  [ton]):

$$A_{e,i} = \frac{B_a * \%A * fr * t * 30 \frac{\text{día}}{\text{mes}}}{1000 \frac{\text{kg}}{\text{ton}}} [\text{ton}] \quad (\text{Ec.16})$$

Por tanto, el consumo total de alimentos en la producción de Tilapia ( $A_T$ ) será la sumatoria de las toneladas de alimento por etapa, así:

$$A_T = \sum A_{e,i} [\text{ton}] \quad (\text{Ec. 10}) \quad (\text{Ec.17})$$

La producción de sedimentos se realiza teniendo en cuenta los parámetros encontrados por Brown, Gowen, & McLusky, 1987, en donde se estima que aproximadamente el 44% y 7.7% del Alimento total (AT), es carbono y nitrógeno, respectivamente. De estos porcentajes los animales consumen el 80% y el otro 20% se convierte en desechos de alimentos, excretan el 65% del Nitrógeno consumido, y las heces son el 30% del carbono consumido y 10% del nitrógeno consumido.

$$C_C = A_T * 44\% [\text{ton}] \rightarrow \text{Contenido de Carbono en Alimento} \quad (\text{Ec.18})$$

$$C_N = A_T * 7.7\% [\text{ton}] \rightarrow \text{Contenido de Nitrógeno en Alimento} \quad (\text{Ec.19})$$

$$A_{TC} = (C_C + C_N) * 80\% [\text{ton}] \rightarrow \text{Alimento consumido} \quad (\text{Ec.20})$$

$$D_A = (C_C + C_N) * 20\% [\text{ton}] \rightarrow \text{Desechos de alimentos} \quad (\text{Ec.21})$$

$$E_{cx} = C_N * 80\% * 65\% [\text{ton}] \rightarrow \text{Excreciones} \quad (\text{Ec. 22})$$

$$H_{cs} = (C_C * 80\% * 30\%) + (C_N * 80\% * 10\%) [\text{ton}] \rightarrow \text{Heces} \quad (\text{Ec. 23})$$

Por tanto, se puede calcular el contenido de sedimentos como:

$$T_S = D_A + H_{cs} \text{ [ton]} \quad (\text{Ec. 17}) \quad (\text{Ec.24})$$

Tabla 7.

*Porcentaje de alimentación referencial en porcentaje del peso para cada pez, para el cálculo de la ración de alimento.*

<b>Edad (semanas)</b>	<b>Peso promedio (gramos)</b>	<b>Crecimiento Diario (gr/día)</b>	<b>Alimento Diario (% de peso)</b>	<b>Conversión Alimenticia</b>
0	1	-	15	0.83
1	3	0.29	10	0.85
2	5	0.29	8	0.85
3	7	0.29	5.8	0.88
4	10	0.43	5.7	0.9
5	13	0.43	5.5	0.9
6	17	0.57	5.1	0.9
7	22	0.71	5.1	0.91
8	29	1.00	5	0.95
9	37	1.14	4.5	0.98
10	48	1.57	4.3	0.98
11	58	1.43	4.2	1
12	69	1.57	4.1	1.03
13	83	2.00	4	1.03
14	100	2.43	4	1.1
15	120	2.86	3.5	1.15
16	140	2.86	3.4	1.15
17	162	3.14	3.2	1.25
18	184	3.14	2.9	1.25
19	207	3.29	2.8	1.28
20	231	3.43	2.6	1.28
21	258	3.86	2.4	1.28
22	282	3.43	2.3	1.28
23	309	3.86	2.2	1.3
24	337	4.00	2.1	1.37
25	355	2.57	1.9	1.37
26	383	4.00	1.8	1.37

27	422	5.57	1.7	1.37
28	451	4.14	1.6	1.37
29	480	4.14	1.5	1.34
30	509	4.14	1.4	1.34
31	538	4.14	1.4	1.35
32	567	4.14	1.4	1.45
33	588	3.00	1.3	1.47
34	629	5.86	1.3	1.49
35	654	3.57	1.2	1.49
36	683	4.14	1.1	1.65

Nota: Adaptado de “Manual de Producción de Tilapia con Especificaciones de Calidad e Inocuidad”, Sagarpa, 2008.

**Apéndice B. Límites permisibles en aguas residuales.**

Tabla 8.

*Valores de límites máximos permisibles para vertimiento de aguas de piscicultura.*

<b>PARÁMETRO</b>	<b>UNIDADES</b>	<b>VALORES LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES</b>
pH	Unidades de pH	6.00 a 9.00
Demanda bioquímica de oxígeno (DBO <sub>5</sub> )	mg O <sub>2</sub> /L	50.00
Demanda química de oxígeno (DQO)	mg O <sub>2</sub> /L	150.00
Sólidos Sedimentables (SSED)	mg/L	1.00
Sólidos Suspendidos Totales (SST)	mg/L	50.00
Nitratos (NO <sub>3</sub> )	mg NO <sub>3</sub> /L	Análisis y reporte
Fosfatos (PO <sub>4</sub> )	mg PO <sub>4</sub> /L	Análisis y reporte
Otros parámetros para análisis y reporte	Acidez total (mg CaCO <sub>3</sub> /L), Alcalinidad total (mg CaCO <sub>3</sub> /L), Dureza Cálctica (mg CaCO <sub>3</sub> /L), Dureza Total (mg CaCO <sub>3</sub> /L).	

Nota: Adaptado de la Resolución 631 del 17 de marzo del año 2015 (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de Colombia, 2015)

## Apéndice C. Estudios previos.

Tabla 9.

*Crecimiento y características bioquímicas de cepas de estudio, cultivado bajo diversas fuentes y concentraciones de carbono.*

Cepa	Fuente de Carbono	Biomasa Producida	Metabolito producido	Referencia
<i>C. Vulgaris ESP-31</i>	1000 mg/L NaHCO <sub>3</sub>	1200 mg/L de biomasa con productividad de 0.029 g dry cell weight/L-d	25-30% proteínas, 6-10% carbohidratos, y 30-40% lípidos.	(Yeh, Chang, & Chen, 2010)
<i>Scenedesmus sp.</i>	CO <sub>2</sub> (5% en aire) con HCO <sub>3</sub> de adición 3.7 días	1.1 ± 0.1 (g/L)	Triacilglicerol 33.5*10 <sup>3</sup> (unidades de Nilo total de fluorescencia roja)	(Gardner et al., 2012)
<i>Scenedesmus obliquus SAI</i>	CO <sub>2</sub> al 35% v/v	1.39 ± 0.023 g/l (2.5 veces mayor al control)		(Basu, Sarma Roy, Mohanty, & Ghoshal, 2014)
<i>Chlorella vulgaris</i> (SKU: 100-CVC00-50)	Bicarbonato de sodio 1.125 g/L		Carotenoides (2.1 mg/L), Clorofila 9.6 mg/l.	(Velichkova, Sirakov, & Stoyanova, 2014)
<i>Scenedesmus sp.</i> CCNM 1077	NaHCO <sub>3</sub> (1.2 g/L)	28.32 ± 0.77 mg/L/día	Lípidos 19.36 ± 0.23%	(Pancho et al., 2015)
<i>Scenedesmus obtusus</i>	CO <sub>2</sub> al 15 % v/v	0.817 ± 0.028 (g/L)	Lípidos 25.40 %	(Sarat Chandra et al., 2016)
<i>Oscillatoria sp.</i>	CO <sub>2</sub> 3 veces al día por 15 min a 300ml/min en periodo de 12h de luz.	0.495 ± 0.1 mg/l/día (1.45 veces mayor al control)		(Nithiya, Tamilmani, Vasumathi, & Premalatha, 2017)

<i>Chlorella sorokiana</i>	Carbono presente en el agua residual piscícola (Cantidad no reportada).	P= 353.36 mg/L		Proteínas 24.87% w/w, carbohidratos (37.1%) y lípidos. 39.1% de	(Guldhe, Ansari, Singh, & Bux, 2017)
<i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Scenedesmus obliquus</i>	CO <sub>2</sub> (1 % v/v)	1.5 g/L para C. vulgaris y 1.2 g/L para S. obliquus		Proteínas 45% w/w, carbohidratos 3-25% y lípidos (12-15%).	(Garcia Martinez, Barajas-Ferreira, & Kafarov, 2018)
<i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 1803	Carbonato de sodio (1 g/L)	de 4 (g/L) en 15 días			(Barajas-Solano et al., 2018)
<i>Chlorella Vulgaris utex</i> 2714	10 (milimolar) NaHCO <sub>3</sub>	mM de 0.60 g/L (peso de celula seca)		494 mg/g de lípidos	(Li, Li, Lan, & Liao, 2018)
<i>Chlorella sp.</i>	Carbonato de sodio 1.6 g/L	de 995 mg/L con productividad de 28 mg/L/día.		Proteínas 49.1% p/p	En el presente trabajo
<i>Scenedesmus sp.</i>	CO <sub>2</sub> sin adición de carbonato de sodio.	de 820 mg/L con productividad de 24 mg/L/día.		Proteínas 36% p/p	

**Apéndice D. Curvas patrón.**

**a. Curva Patrón para cuantificación de proteínas**

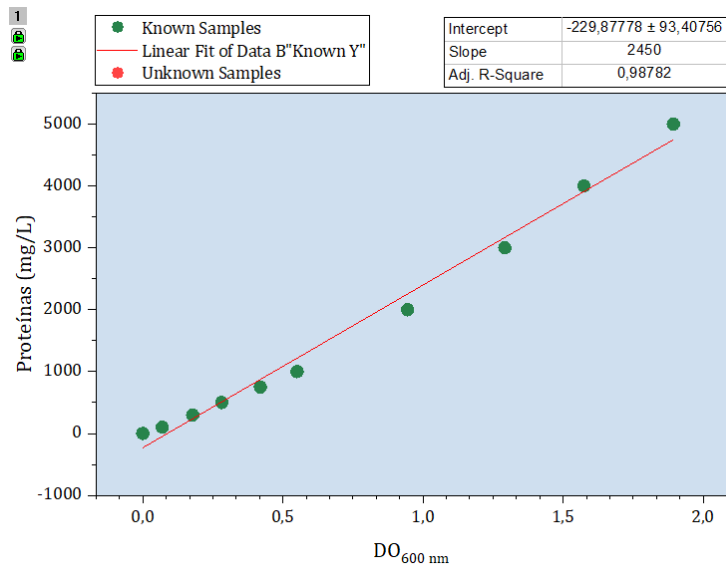


Figura 9. Curva patrón de proteínas.

**b. Curva patrón de demanda química de oxígeno**

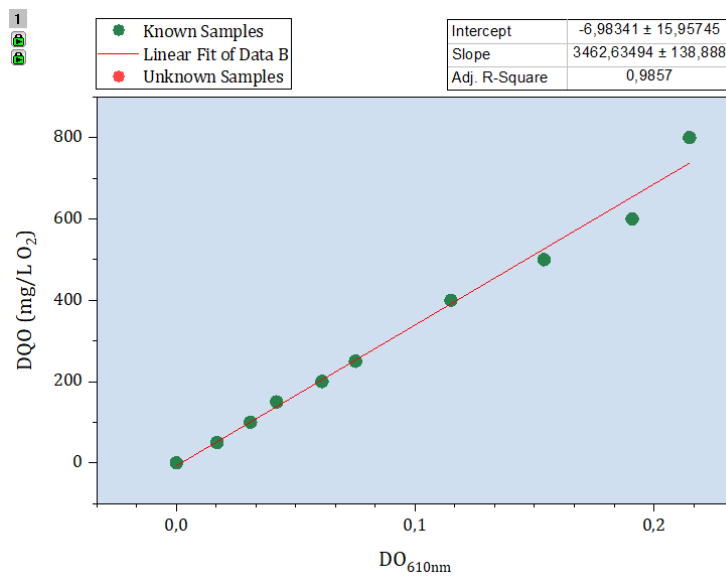


Figura 10. Curva patrón para medición de DQO.

**c. Preparación curva patrón de fosfatos (PO<sub>4</sub>)**

La cuantificación de fosfatos se realizó siguiendo la metodología establecida por el IDEAM (IDEAM, 2007), mediante la cual se prepara una solución patrón de fosfato (PO<sub>4</sub>) y una solución del reactivo Molibdato-Metavalanato. Se construyó la curva tomando 3 mL de cada solución patrón diluida entre 0 a 100%, 1 mL de solución de Molibdato-Metavalanato y 1 mL de agua destilada, esto se dejó reaccionar durante 15 minutos en un espacio libre de luz para evitar la degradación de la muestra y se realizó la lectura de absorbancia a 470 nm usando un espectrofotómetro (UV-1800 SPECTROPHOTOMETER). La densidad óptica (DO) se relacionó con la cantidad de fosfatos (g/L) de acuerdo a la siguiente ecuación ( $r^2 = 0.999$ ):

$$CF = DO_{470} * 0.2786 \quad (\text{Ec.25})$$

Para cuantificar los fosfatos en el agua de cultivo se tomaron 3 mL de muestra, a los cuáles se les realizó el tratamiento anterior, adicionando un (1) mL de solución de Molibdato-Metavalanato y 1 mL de agua destilada, esto se dejó reaccionar durante 15 minutos y se realizó la lectura de absorbancia a 470 nm usando el espectrofotómetro.

**d. Preparación curva patrón de nitratos (NO<sub>3</sub>)**

La cuantificación de nitratos se realizó siguiendo la metodología establecida por el IDEAM (IDEAM, 2015), mediante la cual se prepara una solución patrón de nitrato (NO<sub>3</sub>), una solución intermedia de nitrato y la solución del reactivo de ácido clorhídrico (HCl). Una vez preparadas las soluciones se realizó la respectiva dilución determinando el contenido en g/L de NaNO<sub>3</sub>, en donde, la concentración más alta se utilizó con base a la concentración final en el medio de NaNO<sub>3</sub>. Posteriormente se depositaron 5 mL de cada solución diluida del 0 al 100% en tubos de ensayo y se agregó 100 µL de HCl, esto se dejó reaccionar durante 15 minutos en un espacio libre de luz para evitar la degradación del reactivo. Se realizó la lectura de absorbancia a 220 nm para obtener la lectura de NO<sub>3</sub> y a una longitud de onda de 275 nm para determinar la interferencia debida a la materia orgánica disuelta en un espectrofotómetro (UV-1800 SPECTROPHOTOMETER). Luego se realizó la curva con la absorbancia obtenida a 220 nm y se determinó la pendiente de la curva (0.0202 con r<sup>2</sup> de 0.998).

Las densidades ópticas a 220 nm (DO<sub>220</sub>) y 275 nm (DO<sub>275</sub>) se relacionaron con la cantidad de nitratos (g/L) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$CN = (DO_{220} - (2 * DO_{275})) * 0.020 * f_D \quad (\text{Ec.26})$$

En donde,  $f_D$  es el factor de dilución al cual fueron sometidas las muestras de acuerdo al contenido de materia orgánica arrojado por el espectro.

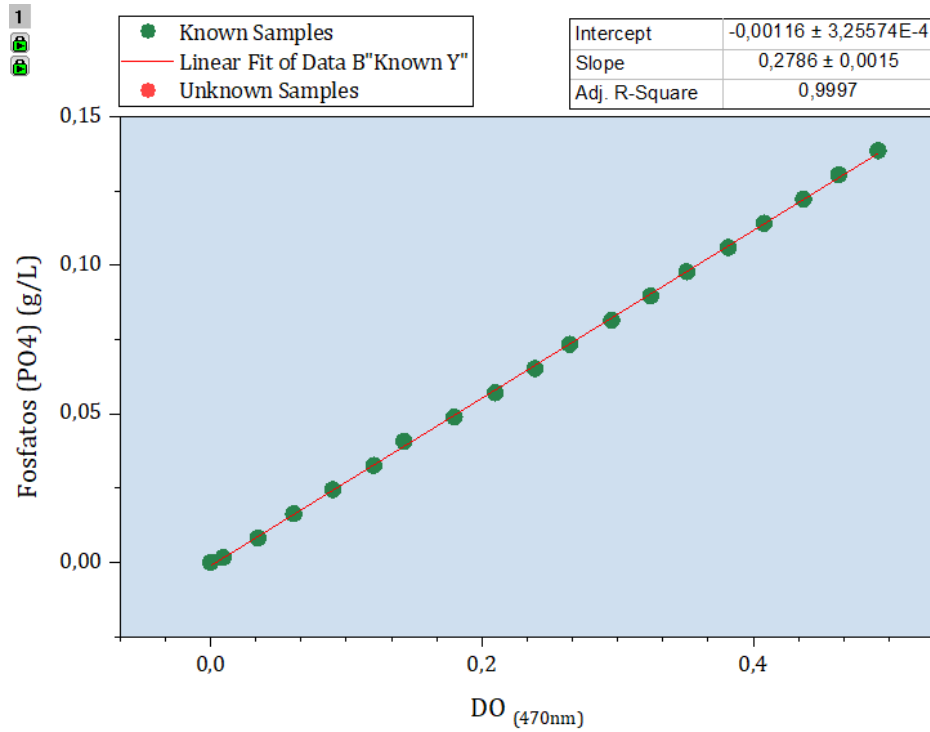


Figura 11. Curva patrón de fosfatos (PO<sub>4</sub>) realizada en el Laboratorio de INNOVALGAE.

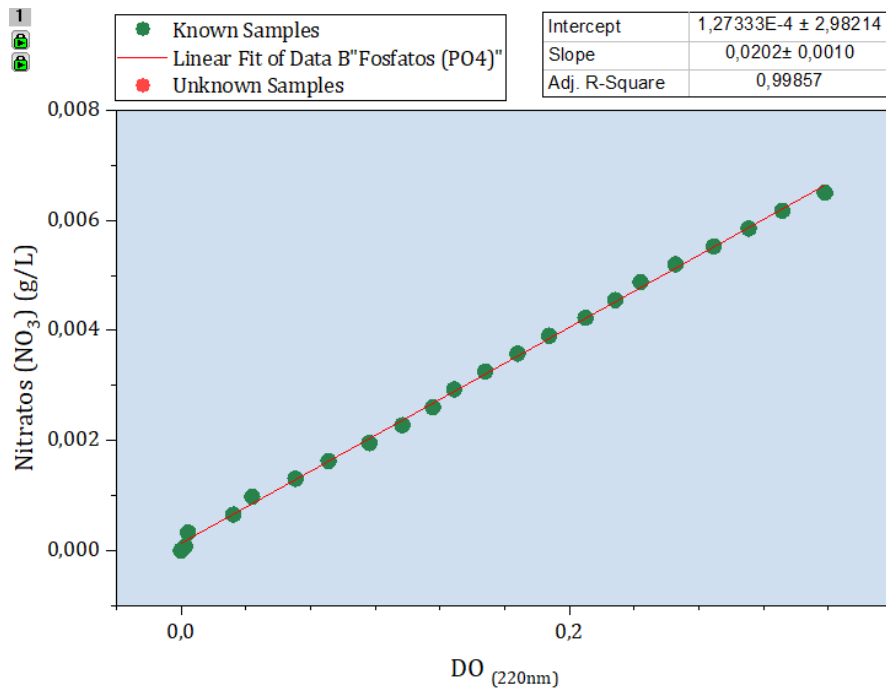


Figura 12. Curva patrón de nitratos (NO<sub>3</sub>) realizada en el Laboratorio de INNOVALGAE.