

EVALUACIÓN DEL USO DE *Scenedemus sp*, *Synechocystis sp* y *Chlorella vulgaris* EN EL TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUALES MUNICIPALES Y EN LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS Y CAROTENOS

MARÍA FERNANDA ACEVEDO PEDRAZA

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍA FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA
2018

EVALUACIÓN DEL USO DE *Scenedemus sp*, *Synechocystis sp* y *Chlorella vulgaris* EN EL TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUALES MUNICIPALES Y EN LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS Y CAROTENOS

MARÍA FERNANDA ACEVEDO PEDRAZA

Trabajo de grado presentando como requisito para optar el título de:
Ingeniera Química

Director
CRISÓSTOMO BAJARAS FERREIRA
Ingeniero Químico M.Sc.

Codirectora

DIANA IBARRA MOJICA
Ingeniera Sanitaria y Ambiental
M.Sc. Ing. Química

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA
2018

DEDICATORIA

A Dios por guiarme en todo momento y por bendecirme con el privilegio de estar rodeada de las personas que siempre me han apoyado y han estado presentes para alcanzar el camino del éxito.

A mis padres por su apoyo incondicional, comprensión y amor conmigo. A mi madre por inculcarme siempre el camino de la educación y el conocimiento a lo largo de mi vida.

A mi hermana menor quien es mi apoyo constante y mi motivo para ser una mejor persona y ejemplo de vida.

A mi amigo Jorge quien siempre me ha dado una palabra de aliento y no me permitió rendirme en ningún momento.

A mi amiga Laura quien me acompañó a lo largo de estos cinco años y siempre fue un apoyo y una mano amiga, gracias por enseñarme que con disciplina todo se puede lograr.

A Juan, que ha sido una persona muy importante y especial en mi vida, gracias por llenar mi vida de sueños y esperanza.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Industrial de Santander y a la Escuela de Ingeniería Química por mi formación como Ingeniera Química.

Al personal profesional del grupo CIDES, especialmente a la M. Sc Diana Ibarra Mojica, por su tiempo y asesoramiento en el proyecto

Al profesor Crisóstomo Barajas Ferreira por la dirección del proyecto, por aceptarme y creer en mí.

A la Universidad Rovira I Virgili por acogerme de manera afectuosa en sus instalaciones y hacer mi estancia una experiencia satisfactoria.

Al profesor Ioanis Katakis por la dirección del proyecto y por dar su voto de confianza en mis capacidades.

Al Doctor Ángel Gonzales Benítez por sus enseñanzas y su asesoramiento siempre acertado y amable durante el desarrollo de este proyecto.

Al grupo INTERFASE por permitirme realizar el proyecto en sus instalaciones y ser siempre diligentes y colaboradores cuando lo requería.

TABLA DE CONTENIDO

	<i>Pág.</i>
INTRODUCCIÓN	14
2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	16
2.1. FACTORES QUE INFLUENCIAN EL CRECIMIENTO DE MICROALGAS 16	
2.2. USOS DE LAS MICROALGAS EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.....	17
3. OBJETIVOS	18
3.1. OBJETIVO GENERAL	18
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
4. METODOLÓGÍA.....	19
4.1. EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL USO DE MICROALGAS PARA REMOCIÓN DE AMONIO NH_4^+ Y DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO DQO EN AGUAS RESIDUALES (FASE I)	20
4.1.1. Recolección de muestras de agua residual y caracterización de su composición química.....	20
4.1.2. Cultivo de microalgas en medios de cultivo convencionales y en agua residual	20
4.1.3. Diseño experimental.....	20
4.1.4. Condiciones del tratamiento del agua residual con microalgas.....	21
4.1.5. Seguimiento del crecimiento de las microalgas.....	21
4.1.6. Caracterización de agua residual tratada con microalgas (Concentración de amonio (NH_4^+) y demanda química de Oxígeno (DQO)).:.....	22
4.2. DETERMINACIÓN DE INFLUENCIA DE USO DE AGUA RESIDUAL MUNICIPAL COMO MEDIO DE CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS Y CAROTENOS (FASE II).....	23

4.2.1.	Determinación de producción de proteínas y carotenos al final del cultivo en aguas residuales y medios de cultivo convencionales.	23
4.3.	PRUEBAS ADICIONALES: EFECTO DE LA AUSENCIA DE LUZ Y EFECTO DE FLOCULANTES EN LA PRECIPITACIÓN DE LA BIOMASA	25
4.3.1.	Efecto de la ausencia de luz en el crecimiento de la biomasa microalgal. 25	
4.3.2.	Efecto del uso de floculante en la precipitación de la biomasa en su medio de cultivo.	26
5.	RESULTADOS Y ANÁLISIS	27
5.1.	EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL USO DE MICROALGAS PARA REMOCIÓN DE AMONIO NH_4^+ Y DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO EN AGUAS RESIDUALES (FASE I)	27
5.1.1.	Crecimiento de las microalgas.....	27
5.1.2.	Eficiencia de la remoción de amonio NH_4^+ y demanda química de oxígeno DQO en aguas residuales domesticas (fase I).	32
5.2.	DETERMINACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL USO DE AGUA RESIDUAL MUNICIPAL COMO MEDIO DE CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS Y CAROTENOS	35
5.2.2.	Contenido de proteínas	36
5.3.	PRUEBAS ADICIONALES	37
5.3.1.	Efecto de ausencia de luz en el crecimiento de las microalgas.....	37
5.3.2.	Prueba de precipitación.....	39
6.	CONCLUSIONES	41
7.	RECOMENDACIONES.....	43
	BIBLIOGRAFÍA	44
	ANEXOS	50

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Metodología.....	19
Figura 2. Pruebas Adicionales.....	25
Figura 3. Curvas de crecimiento. Temperatura 19°C, fotoperiodo 16:8 LO, aire atmosférico (CO ₂ ~0,03%).....	27
Figura 4. Productividad de la biomasa de microalgas cultivadas al final del periodo de crecimiento	32
Figura 5 . Contenido total de carotenos presente en las microalgas	35
Figura 6. Contenido total de proteínas presente en las microalgas <i>Scenedesmus</i> sp, <i>Synechocystis</i> sp y <i>Chlorella vulgaris</i>	36
Figura 7. Curvas de crecimiento de las microalgas con fotoperiodo de 24h. (a) medio de cultivo, (b) agua residual.....	38
Figura 8. Pruebas de precipitación	39

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Velocidad de crecimiento μ ajustada al modelo logístico. Unidades: X_{\max} y X_0 [células•mL ⁻¹] y μ [día ⁻¹].	30
Tabla 2. Comparación de resultados de velocidad de crecimiento con otras investigaciones.....	31
Tabla 3. Demanda química de oxígeno (DQO) y concentración de amonio de la muestra de agua residual recolectada de la depuradora Montblanc.	33
Tabla 4. Valores finales de DQO y contenido de Amonio en el agua residual tratada con microalgas	33
Tabla 5. Eficiencia de remoción de Amonio (%)	34
Tabla 6. Tasa de crecimiento GR [día ⁻¹] según la Ec 10.....	38

ANEXOS

ANEXO A. Composición de los medios de cultivo empleados	50
ANEXO B. Protocolo del KIT Micro BCA™ Protein Assay	52
ANEXO C Graficas de seguimiento vía absorbancia de las especies	54

RESUMEN

TITULO: EVALUACIÓN DEL USO DE *Scenedemus sp*, *Synechocystis sp* y *Chlorella vulgaris* EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES MUNICIPALES Y EN LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS Y CAROTENOS
AUTOR: MARÍA FERNANDA ACEVEDO PEDRAZA**

PALABRAS CLAVES: microalgas, agua residual, productividad, caracterización, carotenos, proteínas.

DESCRIPCIÓN:

En este estudio se evaluó el rendimiento de las microalgas *Scenedesmus sp* (Islas Canarias, España), *Synechocystis sp* 6803 (Colección francesa) y *Chlorella vulgaris* (Almería, España) en la disminución de Demanda Química de Oxígeno –DQO y remoción de amonio NH_4^+ en el agua residual proveniente de la depuradora del municipio de Montblanc (España). Adicionalmente, se evaluó el uso potencial de aguas residuales estilizadas y sin esterilizar, para la producción de proteínas y carotenos. Como resultados se estableció que, de las especies de microalgas evaluadas, *Scenedesmus sp* podría ser la más adecuada para el tratamiento de aguas residuales municipales, puesto que presentó valores de remoción de amonio NH_4^+ cercanos al 100% y la mayor eficiencia de remoción de la DQO, tanto en agua residual esterilizada (64.85%) y no esterilizada (69.89 %). La producción de carotenos se vio favorecida usando aguas residuales para las especies *Chlorella vulgaris* (618.69 $\mu\text{g}/\text{mg}$); y *Synechocystis sp* (239.24 $\mu\text{g}/\text{mg}$), sin embargo, *Chlorella vulgaris* podría ser la más adecuada en vista de que no necesita un proceso previo de esterilización del agua residual. La producción de proteínas se vio favorecida en las especies *Scenedesmus sp* y *Synechocystis sp* las cuales presentaron los mejores resultados, *Scenedesmus sp* con 128.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y *Synechocystis sp* con 63.44 $\mu\text{g}/\text{mL}$ donde es conveniente destacar que el proceso puede verse limitado únicamente al uso de aguas residuales esterilizadas.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ingenierías fisicoquímicas. Escuela de ingeniería química. Director. Dr. Crisóstomo Barajas Ferreira. Codirectora, M. Sc Diana Ibarra Mojica

ABSTRACT

TITLE: EVALUATION OF THE USE OF *Scenedemus sp*, *Synechocystis sp* and *Chlorella vulgaris* IN THE TREATMENT OF MUNICIPAL WASTEWATER AND THE PRODUCTION OF PROTEINS AND CAROTENEES

AUTHOR: MARÍA FERNANDA ACEVEDO PEDRAZA**

KEYWORDS: microalgae, productivity, extraction, characterization, carotenes, proteins, precipitation, waste water treatment

In this study the efficiency of the microalgae *Scenedemus sp* (Canary Islands, Spain), *Synechocystis sp* (French Collection) and *Chlorella vulgaris* (Almeria, Spain) in the decrease of Chemical Oxygen Demand -COD and ammonium NH_4^+ removal in the wastewater from the wastewater treatment plant in the municipality of Montblanc (Spain). Additionally, the potential use of sterilized and non-sterilized wastewater to produce proteins and carotenes was evaluated. As results, it was established that of the microalgae species evaluated, *Scenedemus sp* could be the most suitable for the treatment of municipal wastewater, since it showed values of ammonium NH_4^+ removal close to 100% and the highest efficiency of COD removal, both in sterilized waste water (64.85%) and non-sterilized (69.89%). The production of carotenes was favored using wastewater for the species *Chlorella vulgaris* (618.69 $\mu\text{g}/\text{mg}$); and *Synechocystis sp* (239.24 $\mu\text{g}/\text{mg}$), however, *Chlorella vulgaris* could be the most appropriate since it does not need a previous process of sterilization of waste water. The production of proteins was favored in the species *Scenedemus sp* and *Synechocystis sp* which showed the best results, *Scenedemus sp* with 128.06 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and *Synechocystis sp* with 63.44 $\mu\text{g} / \text{mL}$ where it is convenient to emphasize that the process can be limited only to the use of sterilized wastewater.

* Degree project

** Physical-Chemical Engineering Faculty. Chemical Engineering Department.
Director: Dr. Crisostomo Barajas Ferreira. Co-directora: M. Sc Diana Ibarra Mojica

INTRODUCCIÓN

Una de las principales preocupaciones de la sociedad actual es el reconocimiento de los problemas asociados a la contaminación de los recursos hídricos de agua dulce. El aumento de la contaminación, la industrialización y el rápido desarrollo económico, imponen graves riesgos de disponibilidad y calidad del agua disponible, en muchas áreas en todo el mundo. [1]

En este panorama, la comunidad científica hace más de 75 años encontró a las microalgas como una alternativa de tratamiento biológico de agua residual de bajo costo en donde agua residual es un medio ideal - debido a su alto contenido en nutrientes como carbono, nitrógeno, azufre, entre otros - para el crecimiento una amplia gama de especies, la mayoría inofensivas, entre las que se destacan se destacan *Chlorella*, *Dunaliella*, *Scenedemus*, entre otras. [1]

Actualmente, hay un interés significativo de Centros de investigación en el estudio de nuevas especies que puedan ser utilizadas el uso de tratamiento de aguas residuales; teniendo en cuenta la eficiencia de nuevas especies en la depuración del agua y a su rendimiento de generación de subproductos. Entre los tipos de agua residuales utilizadas actualmente en investigaciones se encuentran el uso de vinazas [2], agua residual urbanas [3], agua residual del medio de cultivo [4], entre otras.

Adicional a la capacidad de las microalgas de depurar el agua, investigadores han incursionado en el estudio de la biomasa microalgal resultante una vez finaliza el proceso de depuración. Lo anterior debido a que las microalgas contienen en su biomasa componentes intracelulares que pueden ser aplicados a una alta gama de procesos comerciales tales como la producción de biodiesel y bioetanol en donde comparados con otro vegetal utilizado, presentan el mejor rendimiento, estudios realizados han conseguido rendimientos de producción de aceite de microalga con valores en el rango de 380 a 5,080 m³/km²/año superando así el rendimiento de

otros aceites tales como el aceite de palma con un rendimiento de 594 m³/km²/año [5].

Adicionalmente al ser microorganismos fotosintéticos, contienen clorofila que puede ser usada en la industria cosmética. También pueden ser usadas en la industria farmacéutica puesto que varias especies contienen compuestos bioactivos como antioxidantes, antibióticos y toxinas. Además de esto, han sido usadas como suplementos nutricionales debido a su alto contenido en proteínas, vitaminas y polisacáridos [6].

Mediante el presente trabajo, se evaluó el rendimiento de las microalgas *Scenedesmus sp*, *Synechocystis sp* y *Chlorella vulgaris* en la disminución de Demanda Química de Oxígeno –DQO y remoción de amonio NH₄⁺ en el agua residual proveniente de la depuradora del municipio de Montblanc (España). Adicionalmente, se evaluó el uso potencial de aguas residuales esterilizadas y sin esterilizar, para la producción de proteínas y carotenos a partir de las microalgas.

2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

Las microalgas son microorganismos unicelulares presentes en agua dulce y salada, en donde constituyen la base para la mayoría de las cadenas alimenticias acuáticas. Existen aproximadamente 104,000 especies de microalgas conocidas, las cuales se clasifican en tres tipos distintivos: verdes, rojas y diatomeas [7].

La mayoría de las especies de microalgas contienen clorofila y usan la luz solar como recurso energético para convertir el dióxido de carbono en biomasa mediante fotosíntesis, llegando a producir hasta el 75% del oxígeno requerido por animales y humanos [5]. En general, las microalgas son más eficientes al convertir la energía solar en energía química que otras plantas debido a su estructura simple y a su mayor eficiencia en el acceso al agua, CO₂ y otros nutrientes dado que crecen en una suspensión acuosa [8].

2.1. FACTORES QUE INFLUENCIAN EL CRECIMIENTO DE MICROALGAS

En estado natural, las microalgas crecen a temperatura ambiente, 19°C - 24°C y pH neutro. La exposición a la luz es muy importante, puesto que de esta dependerá en gran medida el proceso fotosintético [9]. Nutrientes tales como nitratos, carbono, vitaminas, fósforos, nitrógeno, entre otros son necesarios para su producción, por lo que la cantidad requerida de estos nutrientes dependerá del tipo de microalgas y de la disposición final que se les dará a las moléculas que las componen [8].

En general, la producción de microalgas puede ser desarrollada en tres tipos de mecanismo: foto autótrofo (energía obtenida del sol y el carbono de compuestos orgánicos), heterótrofo (los compuestos orgánicos proporcionan la energía y la fuente de carbono) y Mixotrófico (la fuente de energía es tanto la luz como la materia orgánica. El carbono lo obtiene de compuestos orgánicos y del CO₂) [10]

Bajo ciertas condiciones, muchas especies de microalgas pueden acumular en mayor concentración compuestos de interés, tales como proteínas, lípidos, almidón, glicerol, pigmentos naturales, biopolímeros, entre otros, por lo que muchos autores han explorado su posible uso en diferentes aplicaciones comerciales [9]

2.2. USOS DE LAS MICROALGAS EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

Tradicionalmente, las microalgas se han usado para el desarrollo de numerosas aplicaciones en diversos campos tecnológicos, en cultivo masivo o continuo, libres o inmovilizadas, vivas o procesadas. Entre los principales sectores industriales en los que se aprovecha su biomasa se encuentra la industria de la energía, con la producción de biodiesel, bioetanol, biobutanol y acetona [11] ; la industria química y alimenticia con la producción de suplementos alimenticios, vitaminas, pigmentos, aminoácidos, polisacáridos, glicerol, enzimas, entre otros y la industria bio-médica y farmacéutica en la que se aprovechan sus propiedades hipocolesterolemias, antibacterianas, anti fúngicas, inmunoreguladoras y antitumorales [9]

Adicionalmente, otros sectores han aprovechado su capacidad de acumulación en grandes cantidades de ciertos tóxicos; así como su ingesta de carbono, nitrógeno, azufre y fosforo usándolas en el proceso de fitorremediación de aguas residuales a un costo mínimo comparado con otras técnicas de purificación tales como la precipitación química, oxidación/reducción, intercambio de iones, entre otras. [12]

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el uso de las microalgas *Scenedemus sp*, *Synechocystis sp* y *Chlorella vulgaris* en el tratamiento de aguas municipales y en la producción de proteínas y carotenos.

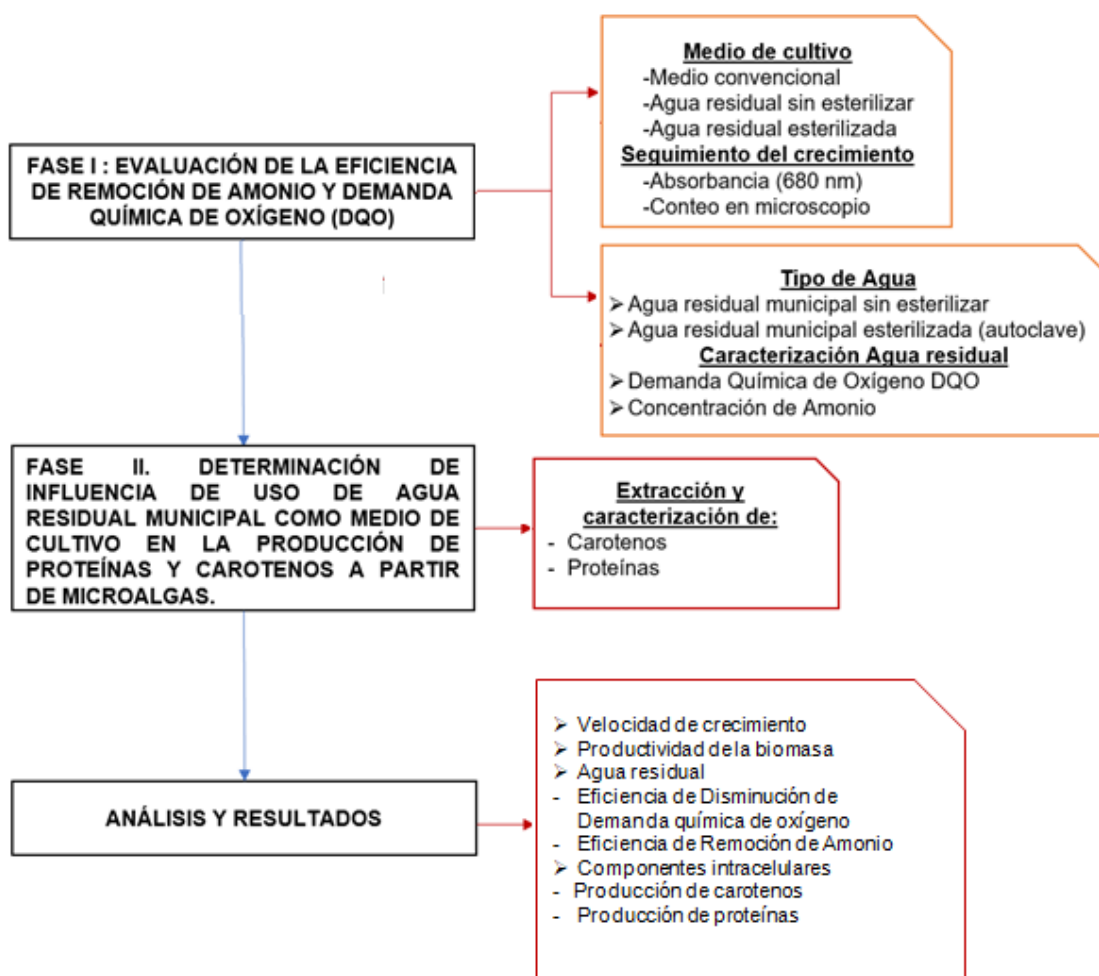
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la eficiencia del uso de microalgas *Scenedemus sp*, *Synechocystis sp* y *Chlorella vulgaris* para la remoción de amonio NH_4^+ y Demanda Química de Oxígeno presente en aguas residuales municipales.
- Determinar la influencia del uso de agua residual municipal como medio de cultivo en la producción de carotenos y proteínas a partir de las microalgas *Scenedemus sp*, *Synechocystis sp* y *Chlorella vulgaris*.

4. METODOLÓGÍA

En la realización de estudio se seleccionaron las microalgas *Scenedesmus sp* (Islas Canarias, España) y *Chlorella vulgaris* (Almería, España) de las cuales su uso en la reducción de contaminantes en agua residuales ha sido ampliamente evaluado por la comunidad científica. Adicionalmente, con el fin de incrementar la información sobre nuevas especies cultivadas en agua residuales se seleccionó la microalga *Synechocystis sp* 6803 (Colección francesa). El proyecto se llevó a cabo en 2 fases principales, las cuales se resumen en la Figura 1.

Figura 1. Metodología



4.1. EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL USO DE MICROALGAS PARA REMOCIÓN DE AMONIO NH_4^+ Y DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO DQO EN AGUAS RESIDUALES (FASE I)

4.1.1. Recolección de muestras de agua residual y caracterización de su composición química. La muestra de agua residual fue tomada de la planta depuradora del municipio de Montblanc (España), en el punto después de la filtración de sólidos grandes. La caracterización en laboratorio se llevó a cabo realizando mediciones de Demanda Química de Oxígeno (DQO) y concentración de Amonio total NH_4^+ por medio del sistema de fotómetro PC-Lovibond Multidirect Photometric (Lovibond, UK).

4.1.2. Cultivo de microalgas en medios de cultivo convencionales y en agua residual

Medios convencionales: Los medios convencionales seleccionados como punto de referencia fueron agua des-ionizada suplementada a una concentración del 2 % (v/v) de medio de cultivo BG-11 para *Scenedesmus sp* y *Synechocystis sp*; y medio de cultivo ASP₁₂ en el caso de *Chlorella vulgaris*. Estos medios contienen los nutrientes necesarios para lograr un crecimiento celular óptimo y evitar variaciones significativas durante el estudio. En el anexo A se encuentran consignadas las especificaciones de la composición de los medios de cultivo.

Agua residual: Las microalgas se cultivaron en agua residual esterilizada (por medio de autoclave) y agua residual sin esterilizar con el fin de determinar si la presencia de otros microorganismos influye en su capacidad de fitorremediación y en su desarrollo metabólico.

4.1.3. Diseño experimental Se realizó un diseño experimental aleatorizado utilizando los tres tipos de medio de cultivo (medio convencional, agua residual

esterilizada y agua residual sin esterilizar) en cada tipo de microalgas, para un total de 9 experimentos.

En esta fase (FASE I), solo se utilizaron los experimentos en los que las microalgas fueron cultivadas en agua residual (6 experimentos) puesto que se tomó como referencia la composición inicial del agua residual antes del tratamiento con microalgas. Para la FASE II se tomaron muestras de la biomasa fresca de los nueve experimentos realizados para su posterior caracterización y análisis de carotenos y proteínas.

4.1.4. Condiciones del tratamiento del agua residual con microalgas Las microalgas se inocularon con una concentración inicial del 5% (v/v) en el medio convencional, en el agua residual esterilizada y en el agua residual sin esterilizar. En el laboratorio se utilizaron Erlenmeyer de 500 ml con un volumen de cultivo de 100 ml. Las muestras se incubaron en un agitador orbital de mesa (MaxQ™ 4000) a 150 rpm, temperatura de $19 \pm 2^\circ \text{C}$, agitación constante y aireación atmosférica (392 ppm de CO_2) y fuente de iluminación artificial con fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad (16:8 LO) simulando las horas de luz y oscuridad naturales.

4.1.5. Seguimiento del crecimiento de las microalgas Se siguió el crecimiento de todas las especies en los tres tipos de tratamiento, midiendo su absorbancia (DO_{680}) utilizando el equipo SpectraMax 340PC, EE. UU. Cuando las muestras alcanzaron valores de OD_{680} entre 0.4 y 0.5 (15 a 20 días de crecimiento) se analizó el contenido de DQO y amonio NH_4^+ en el agua residual y el contenido de carotenos y proteínas presente en la biomasa microalgal. Este rango fue seleccionado debido a que en ese punto las microalgas son más activas metabólicamente ya que se encuentran en la mitad de su crecimiento exponencial [19].

Adicionalmente, se analizó el crecimiento celular diariamente mediante conteo celular al microscopio usando un hemocitómetro. (Neubauer Improved Chamber, Brand, Germany).

4.1.6. Caracterización de agua residual tratada con microalgas (Concentración de amonio (NH_4^+) y demanda química de Oxígeno (DQO)).

Después de 15 a 20 días de tratamiento del agua residual con microalgas se procedió a medir la Demanda Química de Oxígeno (DQO) y concentración de Amonio total NH_4^+ , para ello se tomaron muestras de 10 ml de cultivo en tubos Eppendorf y se centrifugaron a 500 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante resultante se depositó en un nuevo tubo Eppendorf y se congeló a -4°C para su posterior análisis. Las muestras fueron analizadas usando el sistema de fotómetro PC-Lovibond Multidirect Photometric (Lovibond, UK) considerando el siguiente protocolo:

Para el cálculo de DQO se agregó 1 ml de muestra de agua residual tratada, 2 ml de agua des-ionizada en la muestra en la cubeta de blanco. Se agitó cuidadosamente y se mantuvo 2 horas a 148°C . Una vez transcurrieron las 2 horas se realizó la lectura en el fotómetro comparando las mezclas preparadas con el blanco.

Para el análisis del contenido de amonio NH_4^+ , se agregaron: 1 ml de muestra de agua tratada, 2 ml de agua des-ionizada y los sobres de Vario Ammonio Salicylate F5 y Ammonio Cyaurate F5 que contiene el KIT del equipo y se agitó cuidadosamente. Seguido se dejó reposar la mezcla durante 20 minutos y finalmente se realizó la lectura en el fotómetro comparando las mezclas preparadas con el blanco.

4.2. DETERMINACIÓN DE INFLUENCIA DE USO DE AGUA RESIDUAL MUNICIPAL COMO MEDIO DE CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS Y CAROTENOS (FASE II).

4.2.1. Determinación de producción de proteínas y carotenos al final del cultivo en aguas residuales y medios de cultivo convencionales. Para las caracterizaciones de los componentes intracelulares se tomaron dos muestras de 45 ml por cada especie en tubos falcón de 50ml y se almacenaron a -20 °C hasta su posterior análisis.

Caracterización de carotenos: La extracción de carotenos requirió del siguiente pretratamiento: 10 ml, de muestra (por duplicado) fue centrifugada (15 min, 5000 rpm) (MPW, Biogen Científica, España). Los sobrenadantes en ambas muestras fueron descartados y de los dos precipitados resultantes: una de las muestras se mantuvo a -20° C para su posterior análisis y la otra fue usada para calcular el peso seco de la muestra manteniéndose a 80 °C durante 24 horas.

Los carotenos fueron extraídos por adición de 0,5 ml de metanol al 99% (v/v) (Scharlau, España), la muestra fue depositada en un tubo Eppendorf de 1,5 ml (por triplicado) y se homogeneizó en el Mini Beadbeater (BioSpec Products, EE. UU) con perlas de zirconio/silicio de 0,5 mm (BioSpec Products, USA) por un minuto a velocidad media. La mezcla se centrifugó (10 min, 15000 rpm, 4 °C) (Eppendorf 5417R, Germany). Finalmente, el sobrenadante fue recolectado en un nuevo tubo y su absorbancia fue medida a OD₄₇₀, OD₆₅₃ y OD₆₆₆ con el fin de determinar la cantidad de clorofila a, clorofila b y contenido total de carotenos, usando las ecuaciones de Deer, 1998 (Ecuación 1, Ecuación 2 y Ecuación 3) en donde A₆₆₆, A₆₅₃ y A₄₇₀ son los valores de absorbancia obtenidos.

Clorofila a (Chla)	$(15,66 \cdot A_{666}) - (7,34 \cdot A_{653})$	Ecuación 1
Clorofila b (Chlb)	$(27,05 \cdot A_{653}) - (11,21 \cdot A_{666})$	Ecuación 2
Carotenos totales	$(1000 \cdot A_{470}) - ((2,86 \cdot Chla) - ((129,2 \cdot Chlb) / 245))$	Ecuación 3

Caracterización de proteínas: Para la extracción de proteínas se tomó una muestra de 10 ml de muestra y se centrifugó (15 min, 5000 rpm). El sobrenadante fue descartado y a la muestra fueron añadidos 4 ml de agua des ionizada (Mili Q water system, Millipore, USA) para ser almacenada a -20 °C durante la noche.

La muestra fue descongelada y con el fin de romper las células microalgales, 1 ml de muestra fue depositada en un tubo Eppendorf de 1,5 ml (por triplicado) que se introdujo en el Mini Beadbeater (BioSpec Products, USA) con perlas de zirconio/silicio de 0,5 mm (BioSpec Products, USA) por tres minutos a velocidad media. La suspensión resultante fue centrifugada (10 min, 15000 rpm, 4 °C) (Eppendorf 5417R, Germany) y se recolectó un 1 ml en un nuevo tubo Eppendorf.

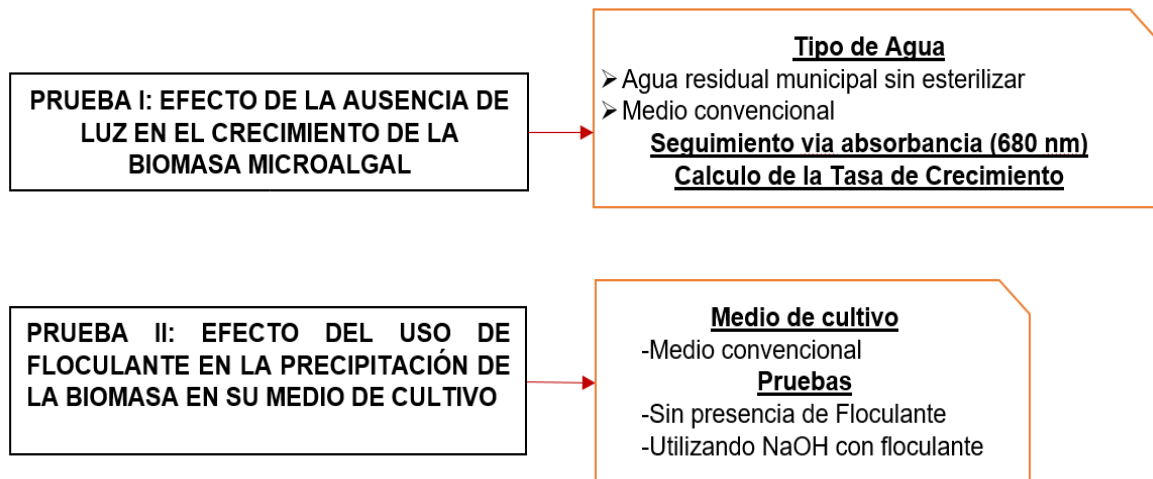
Para precipitar las proteínas TCA frío al 25%(w/v) (Scharlau, Spain) fue agregado a la suspensión en una relación 2:1. Luego, se homogeneizó la muestra y se congeló durante 30 min. Transcurridos los 30 minutos la muestra fue centrifugada (15 min, 15000 rpm, 4 °C), el sobrenadante se descartó y al precipitado se agregó 1 ml de TCA al 10% y (w/v), una vez más la muestra fue centrifugada (15 min, 15000 rpm, 4 °C), se descartó por segunda vez el sobrenadante y se agregó al precipitado 1 ml de TCA al 5% (w/v) para ser centrifugada por última vez (15 min, 15000 rpm, 4 °C). El sobrenadante se descartó nuevamente y la muestra se re suspendió en 1mL de SDS al 1% (w/v) (Scharlau, Spain) para su posterior análisis.

Para la determinación del contenido de proteínas se siguió el protocolo suministrado por el Kit Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo scientific, EE. UU.) que se encuentra en el Anexo B.

4.3. PRUEBAS ADICIONALES: EFECTO DE LA AUSENCIA DE LUZ Y EFECTO DE FLOCULANTES EN LA PRECIPITACIÓN DE LA BIOMASA

A pesar de no ser el objetivo del trabajo, se realizaron dos pruebas adicionales. La primera, para comprobar si la ausencia de luz era un factor de inhibición en el crecimiento de biomasa microalgal y la segunda, para determinar si la presencia de floculantes disminuye el tiempo de precipitación de la biomasa en el medio de cultivo. El procedimiento realizado a cada especie de microalgas se muestra en la **Figura 2.**

Figura 2. Pruebas Adicionales



4.3.1. Efecto de la ausencia de luz en el crecimiento de la biomasa microalgal.

Se expusieron las tres especies de microalgas en medio convencional y agua residual esterilizada, a las mismas condiciones de cultivo que en la Fase I (Sección 4.1.4), a excepción del fotoperiodo que en este caso es de 24 horas de total oscuridad. La oscuridad se obtuvo recubriendo los Erlenmeyer menos la tapa con papel aluminio. Se siguió el crecimiento de todas las especies midiendo su absorbancia (DO_{680}) ((SpectraMax 340PC, EE. UU.)

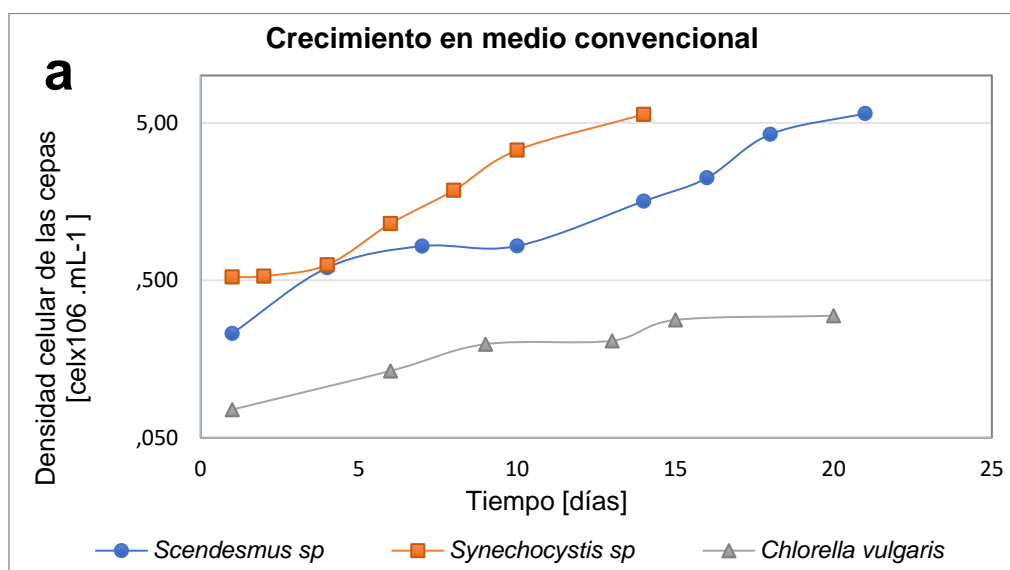
4.3.2. Efecto del uso de floculante en la precipitación de la biomasa en su medio de cultivo. Se realizó una prueba de precipitación de cada especie con y sin adición de NaOH como floculante. Se adicionaron en un Beaker de vidrio 5 ml de biomasa fresca (OD_{680} entre 0,4 y 0,5) y se midió la absorbancia de la superficie de la solución después de 5, 10, 15, 35, 45 y 60 minutos. En las pruebas con adición de floculante se añadieron 50 μ L de NaOH a la solución con el fin de aumentar su pH y acelerar el proceso de precipitación.

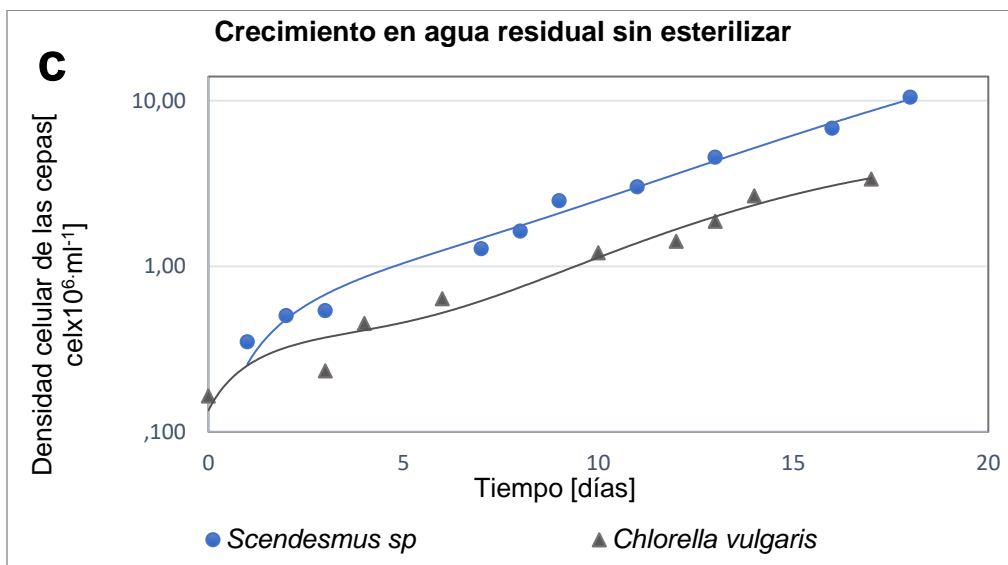
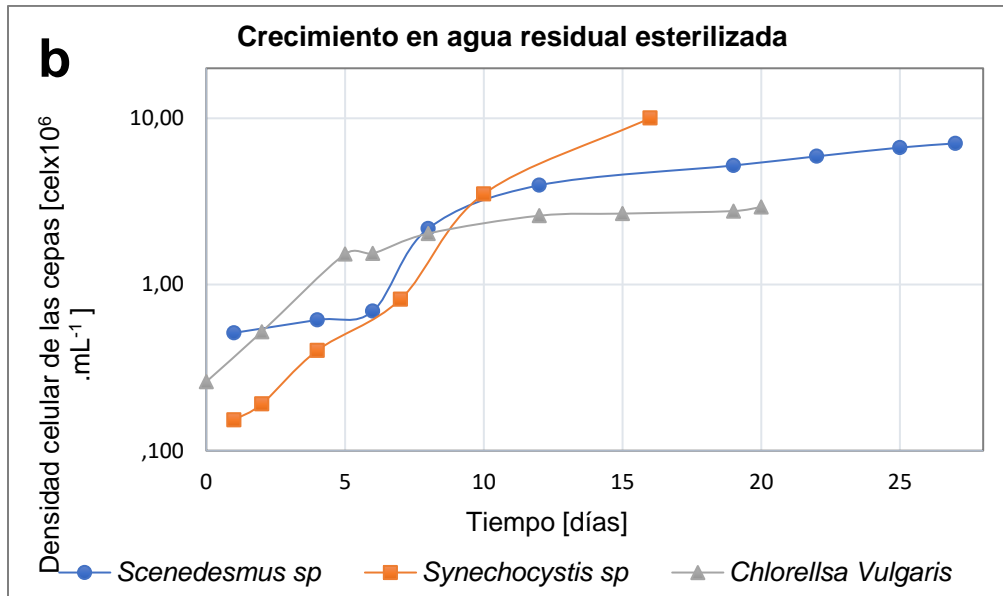
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

5.1. EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL USO DE MICROALGAS PARA REMOCIÓN DE AMONIO NH_4^+ Y DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO EN AGUAS RESIDUALES (FASE I)

5.1.1. Crecimiento de las microalgas. Las curvas de crecimiento de las microalgas son mostradas en la Figura 3, donde se observa su fase de crecimiento exponencial. Se puede observar que *Synechocystis sp* no se encuentra representada en la figura (c), esto debido a que presentó un decrecimiento de su densidad celular, posiblemente por la interacción con microorganismos presentes en las aguas residuales lo cual provocó la inhibición y el rápido decaimiento del número de células. Adicionalmente, en el Anexo C se encuentran las gráficas de seguimiento vía absorbancia (OD_{680}) de todos los experimentos en el mismo intervalo de tiempo.

Figura 3. Curvas de crecimiento. Temperatura 19°C, fotoperiodo 16:8 LO, aire atmosférico ($\text{CO}_2 \sim 0,03\%$)





La especie *Scenedesmus sp* obtuvo valores de crecimiento en medio convencional ($5,74 \text{ celx}10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$) inferiores a los obtenidos en agua residual esterilizada similares ($7,06 \text{ celx}10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$) y en agua residual sin esterilizar ($1,05 \text{ celx}10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$) lo que indica el efecto positivo del enriquecimiento en nutrientes presente en el agua residual.

Synechocystis sp en agua residual esterilizada obtuvo valores de crecimiento casi 5 veces mayores que en el medio convencional ($5,66 \text{ celx}10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ y $1,00 \text{ celx}10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$ respectivamente) y como se mencionó anteriormente en agua residual sin esterilizar se observó un decrecimiento.

Por su parte, *Chlorella vulgaris* en el medio convencional, mostró una lenta velocidad de crecimiento ($2,98 \text{ cel} \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$) como lo han descrito investigaciones previas [13] haciendo que durante 20 días su densidad celular tan sólo se cuadruplicará mientras que en las muestras de agua residual esterilizada y sin esterilizar aumentó 10 y 20 veces la biomasa inicial.

Velocidad específica de crecimiento

La velocidad específica de crecimiento (μ) de cada experimento fue calculada. El modelo de crecimiento logístico o ecuación *Verhulst-Pear* fue seleccionado para ajustar los cultivos y calcular μ en la fase de crecimiento exponencial [14].

$$X = \frac{X_0 X_{max} e^{\mu t}}{X_{max} + X_0 (e^{\mu t} - 1)} \quad (\text{Ecuación 7})$$

En la ecuación 7, X es la densidad celular (cel. mL^{-1}), X_0 y X_{max} la densidad celular inicial y máxima respectivamente (cel. mL^{-1}), μ la velocidad específica de crecimiento (día^{-1}) y t el tiempo de cultivo (día). La ecuación 7 puede ser transformada en forma lineal como en la ecuación 8, donde la pendiente de la recta corresponde a la velocidad específica de crecimiento, μ . Para el ajuste se utilizó el Software SPSS Statics.

$$\ln \left(\frac{X X_{max} - X_0 X}{X_0 X_{max} - X_0 X} \right) = \mu t \quad (\text{Ecuación 8})$$

La Tabla 1 muestra el parámetro μ ajustado para las tres microalgas en los diferentes medios de cultivo y su error correspondiente. Se detalla la similitud en el valor de velocidad específica de crecimiento para todas las especies, con un rango entre $0,19$ y $0,35 \text{ días}^{-1}$.

Tabla 1. Velocidad de crecimiento μ ajustada al modelo logístico. Unidades: X_{max} y X_0 [células·mL⁻¹] y μ [día⁻¹].

Microalg a	Medio de cultivo	X_{max}	EE. X_{max}	X_0	EE. X_0	μ	EE. μ	R^2
<i>Scenedesmus sp</i>	Medio convencional	5,74E+06	2,66E+05	2,30E+05	3,38E+04	0,193	0,017	0,93
	Agua residual esterilizada	7,06E+06	1,80E+05	5,12E+05	6,67E+03	0,212	0,018	0,95
	Agua residual sin esterilizar	1,05E+07	7,20E+05	3,49E+05	4,10E+04	0,232	0,024	0,98
<i>Synechocystis sp</i>	Medio convencional	5,66E+06	3,32E+05	5,24E+05	2,68E+04	0,233	0,071	0,92
	Agua residual esterilizada	1,00E+07	4,10E+05	1,53E+05	9,34E+04	0,305	0,033	0,92
<i>Chlorella vulgaris</i>	Medio convencional	1,75E+04	1,24E+04	1,88E+04	1,33E+04	0,239	0,035	0,94
	Agua residual esterilizada	2,93E+06	8,69E+04	2,60E+05	6,06E+04	0,351	0,027	0,98
	Agua residual sin esterilizar	3,37E+06	2,50E+04	1,65E+05	1,20E+05	0,287	0,068	0,94
								0

Así mismo, en la Tabla 2 se encuentra la comparación del valor de μ con el reportado en otras investigaciones. El parámetro μ no estuvo dentro de los intervalos descritos. La razón de estos resultados puede ser debida a la aproximación que se realizó del valor de $X_{máx}$ en la Ec.8 cuando las microalgas se encuentran en la mitad su fase de crecimiento exponencial.

Tabla 2. Comparación de resultados de velocidad de crecimiento con otras investigaciones

Microalga	Tipo de medio	Esta investigación	Otras investigaciones
<i>Scenedemus sp</i>	Medio convencional	0,193	0,682 [15]
	Agua residual esterilizada	0,212	0,643 [16]
	Agua residual sin esterilizar	0,232	0,43 [16]
<i>Synechocystis sp</i>	Medio convencional	0,233	0,35 [16]
	Agua residual esterilizada	0,305	0,47 [16]
	Medio convencional	0,239	0,46 [17]
<i>Chlorella vulgaris</i>	Agua residual esterilizada	0,351	0,48 [17]
	Agua residual sin esterilizar	0,287	0,17 [17]

Productividad de la Biomasa

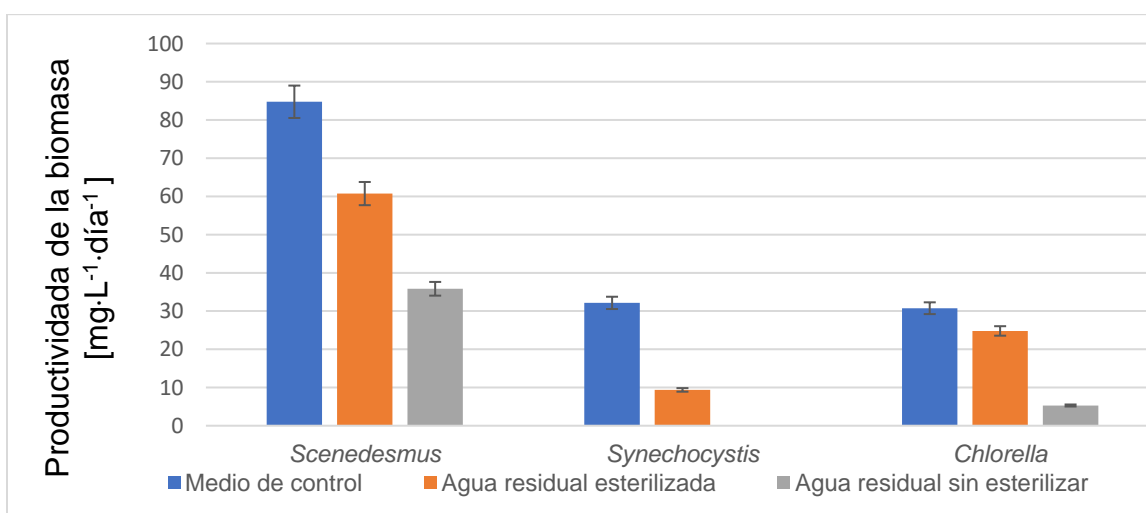
La productividad de la biomasa es expresada como relación entre la biomasa seca obtenida durante el cultivo y el producto entre el tiempo y el volumen empleado para dicho cultivo, Ec 9.

$$Productividad = \frac{\text{Peso seco final de la biomasa}}{\text{tiempo de cultivo} \cdot \text{Volumen de cultivo}} \quad (\text{Ecuación 9})$$

El peso seco fue calculado pesando 10 ml de biomasa fresca (por duplicado) antes y después de ser sometida a un proceso de secado en horno a 80 °C durante 24 horas.

En la Figura 4 se aprecian los valores de productividad de las tres especies que van desde 5,29 mg·l⁻¹·día⁻¹ (*Chlorella vulgaris*) hasta 84,76 mg·l⁻¹·día⁻¹ (*Scenedesmus sp*). *Scenedesmus sp* obtuvo los valores de productividad más altos, siendo su productividad 1,6 veces mayor a la obtenidas por otros estudios (Xin et al., 2009). La microalga *Synechocystis sp* presenta una productividad 3,5 veces menor en agua residual esterilizada y *Chlorella vulgaris* en agua residual no esterilizada presenta una productividad 6 veces menor que sus respectivos medios de control.

Figura 4. Productividad de la biomasa de microalgas cultivadas al final del periodo de crecimiento



Adicionalmente, se debe resaltar que a pesar de que las cepas *Chlorella vulgaris* y *Synechocystis sp*. tuvieron velocidades específicas de crecimiento aparentes mayores, presentaron productividades más bajas en comparación a la especie *Scenedesmus sp*, lo cual es lógico debido a que sus tamaños celulares son entre 15 y 200 veces más pequeños [15].

5.1.2. Eficiencia de la remoción de amonio NH₄⁺ y demanda química de oxígeno DQO en aguas residuales domesticas (fase I). La composición inicial de las muestra recolectada en de la Depuradora Montblanc se observa en la Tabla 3 y

la composición final una vez las muestras fueron tratadas con microalgas se muestra en la Tabla 4.

Tabla 3. Demanda química de oxígeno (DQO) y concentración de amonio de la muestra de agua residual recolectada de la depuradora Montblanc.

Fecha de recolección	Septiembre de 2017
DQO [mg/L]	190
Amonio NH₄⁺ [ng/L]	31
pH	7,5-8,0

Tabla 4. Valores finales de DQO y contenido de Amonio en el agua residual tratada con microalgas

Microalga	Medio de cultivo	DQO final [mg/L]	Amonio final NH₄⁺ [ng/L]
<i>Scenedemus sp</i>	Agua residual esterilizada	66,78	0,115
	Agua residual sin esterilizar	57,2	0,02
<i>Synechocystis sp</i>	Agua residual esterilizada	140	1,6
	Agua residual sin esterilizar	188	45,7
<i>Chlorella vulgaris</i>	Agua residual esterilizada	129	0,01
	Agua residual sin esterilizar	139	0,08

En la Tabla 5 se presentan los valores de eficiencia de disminución de demanda química de oxígeno y de remoción de amonio NH₄⁺ obtenidos y su comparación con valores obtenidos en otros estudios.

Tabla 5. Eficiencia de remoción de Amonio (%)

Microalga	Tipo de medio	Remoción de DQO	Remoción de Amonio NH ₄ ⁺		
		Esta investigación	Esta investigación	Otras investigaciones	
<i>Scenedesmus sp</i>	Agua residual esterilizada	64,85%	99,75%	94%	[17]
<i>Synechocystis sp</i>		26,32%	96,52	82,5	[17]
<i>Chlorella vulgaris</i>		32,11%	99,8	84%	[17]
<i>Scenedesmus sp</i>	Agua residual sin esterilizar	69,89%	99,96%	NR	
<i>Synechocystis sp</i>		0,70%	0,60%	NR	
<i>Chlorella vulgaris</i>		26,84%	99,83%	78%	[18]

Tanto en aguas esterilizada y sin esterilizar, el tratamiento con *Scenedesmus sp* presentó el mayor porcentaje de remoción de DQO (64.85 y 69.89 %) y Amonio NH₄⁺ (99.75 y 99.96 %).

La eficiencia de remoción de DQO en el tratamiento con *Chlorella vulgaris* y *Synechocystis sp*, con agua esterilizada y sin esterilizar, fue inferior al 33%; sin embargo, las dos especies presentaron alta eficiencia de remoción de Amonio (mayor al 96%) en aguas residual esterilizada (superiores a los estudios de referencia). Según Li et al., 2011 la baja disminución de DQO que presentaron las especies *Synechocystis sp* y *Chlorella vulgaris* podría asociarse a que a altas densidades celulares se introduce la producción de exoproductos orgánicos que impiden la diferenciación entre materia orgánica residual y materia orgánica generada como productos del metabolismo.

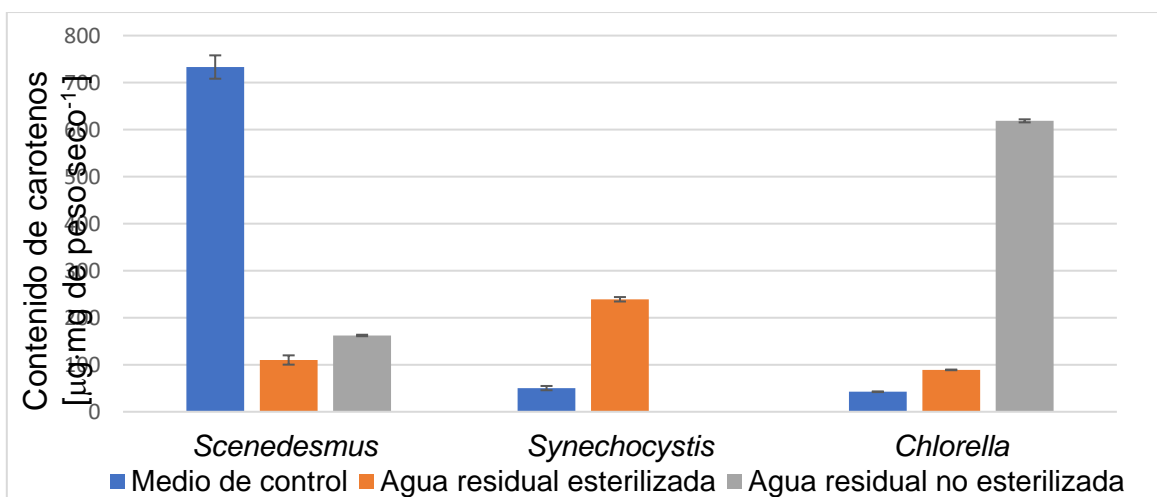
La baja remoción de DQO y Amonio NH_4^+ (menor al 1%) en el agua residual sin esterilizar de la especie *Synechocystis sp* se debe, como se mencionó anteriormente, a que no presento crecimiento de biomasa significativo durante los días del tratamiento, posiblemente inhibida por los microorganismos autóctonos presentes en el agua.

5.2. DETERMINACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL USO DE AGUA RESIDUAL MUNICIPAL COMO MEDIO DE CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS Y CAROTENOS

A partir de los cultivos utilizados de la fase I, se tomaron muestras de 45 ml de biomasa fresca para caracterizar la cantidad de proteínas y carotenos presentes después de aproximadamente 20 días de crecimiento. No fue posible detectar la concentración de proteínas y carotenos al inicio del experimento debido a la baja concentración de biomasa (5% (v/v)) presente en el medio.

5.2.1 Contenido de carotenos. La Figura 5 muestra el contenido de carotenos en $\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco presente, luego de un promedio de 20 días de cultivo. Los valores varían entre 618,69 $[\mu\text{g}/\text{mg}]$ y 42,612 $[\mu\text{g}/\text{mg}]$.

Figura 5 . Contenido total de carotenos presente en las microalgas

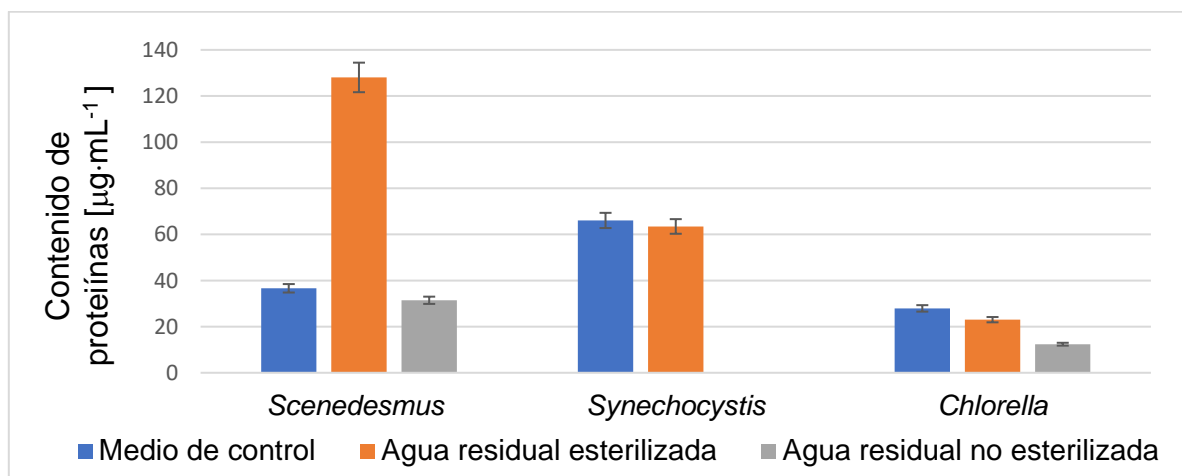


Chlorella vulgaris presenta el valor más alto de contenido de carotenos en agua residual esterilizada con un valor de 618,69 [$\mu\text{g}/\text{mg}$] lo cual concuerda con estudios de Chacón et, al, en donde la microalga *Chlorella vulgaris* reporta 3 veces mayor contenido de carotenos que en su medio de control. Por su parte, la microalga *Synechocystis sp* obtuvo el mayor contenido de carotenos en agua residual esterilizada con un valor de 239,24 [$\mu\text{g}/\text{mg ps}$].

Scenedesmus sp presento un contenido de carotenos menor en aguas residuales en comparación al obtenido en su medio de control. En otros estudios, esta microalga reporta un contenido de carotenos en agua residual 1,3 veces mayor que en su medio de control [16] en donde emplean un agua residual con un contenido de amonio NH_4^+ 2 veces menor que el contenido presente en las muestras usadas en este trabajo, esto lleva a pensar en el efecto negativo de tal enriquecimiento en la acumulación de carotenos en esta especie.

5.2.1. Contenido de proteínas. El contenido total de proteínas en $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cada especie luego de aproximadamente 20 días de crecimiento se puede observar en la Figura 6.

Figura 6. Contenido total de proteínas presente en las microalgas *Scenedesmus sp*, *Synechocystis sp* y *Chlorella vulgaris*.



Los valores en este caso varían entre 128,06 [$\mu\text{g/ml}$] (*Scenedemus sp*) y 12,39 [$\mu\text{g/mL}$] (*Chlorella vulgaris*). *Scenedemus sp* fue la especie con mayor contenido total de proteínas presente en agua residual esterilizada y agua residual sin esterilizar con un valor de 128,06 [$\mu\text{g/ml}$] y 31,43 [$\mu\text{g/ml}$] respectivamente. Otros estudios han reportado un contenido de proteínas totales en la especie *Scenedemus sp* de 66,5 [$\mu\text{g/ml}$] en medio de control, 461,5 [$\mu\text{g/ml}$] agua residual esterilizada y 337,3 [$\mu\text{g/ml}$] en agua residual sin esterilizar (Quevedo, Morales, & Acosta, 2007)

Así mismo, la especie *Chlorella vulgaris* en el estudio de Quevedo et al., 2008 [13] reporta valores de contenido de proteínas en medio de control de 461,5 [$\mu\text{g/mL}$], en agua esterilizada de 401,9 [$\mu\text{g/mL}$] y de 346 [$\mu\text{g/mL}$] en agua residual sin esterilizar, usando un agua residual con una concentración de amoníaco de 139 [mg/L] la cual es cuatro veces mayor que la concentración de amonio presente en este estudio. Lo anterior, lleva a pensar en el efecto positivo del enriquecimiento de amonio en la acumulación de proteínas en la biomasa de la microalga de *Chlorella vulgaris*.

5.3. PRUEBAS ADICIONALES

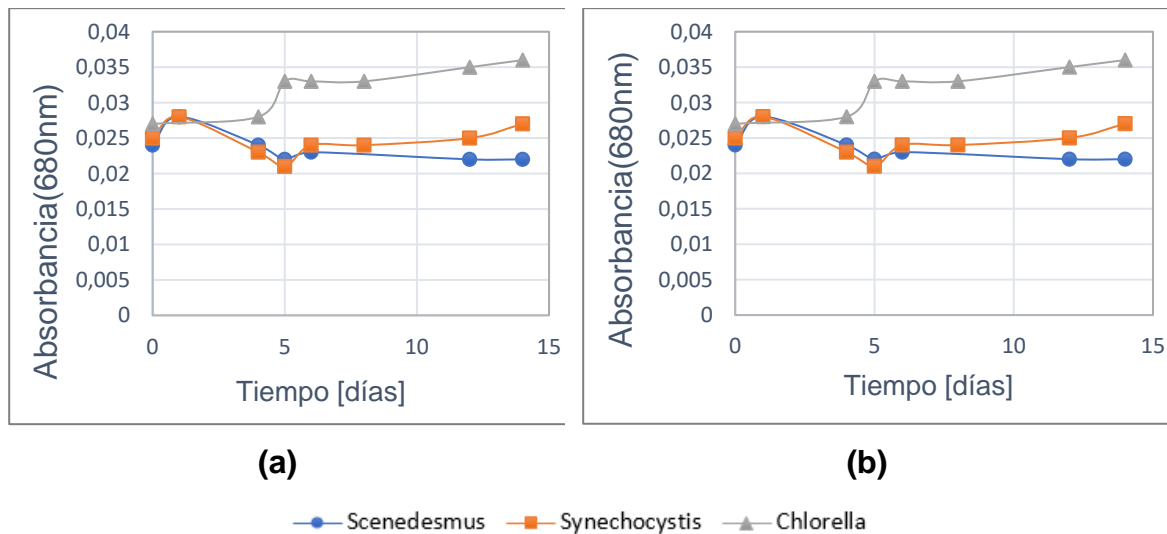
5.3.1. Efecto de ausencia de luz en el crecimiento de las microalgas. La tasa de crecimiento (GR) se calculó ajustando los valores de DO_{680} en una función exponencial.

$$GR = \frac{(\ln \text{DO}_t - \ln \text{DO}_i)}{t} \quad (\text{Ecuación 10})$$

En la ecuación 10 (Luo et al., 2017) DO_i y DO_t es la densidad óptica inicial y la densidad óptica en un tiempo de cultivo t (día) respectivamente. Cada valor de DO fue corregido sustrayendo el valor de DO sin presencia de microalgas en el medio.

Las especies se siguieron vía absorbancia (OD_{680}) durante 15 días, aproximadamente el mismo tiempo que les tomó a las especies expuestas a intervalos de luz y oscuridad llegar a un OD_{680} entre 0,4 y 0,5. En la Figura 7, se observa el seguimiento al crecimiento de las microalgas a una temperatura de $\sim 19^{\circ}\text{C}$, fotoperiodo de 24 horas.

Figura 7. Curvas de crecimiento de las microalgas con fotoperiodo de 24h. (a) medio de cultivo, (b) agua residual.



Ninguna de las especies después de transcurrir los 15 días evidenció un aumento de su valor de absorbancia superior a 0,037, este valor comparado con los valores alcanzados por las especies al ser expuestas a intervalos de luz oscuridad en la fase I es muy bajo (ver Anexo A).

En la

Tabla 6, se encuentran los valores de tasa de crecimiento (GR) tras transcurrir los 15 días de crecimiento.

Tabla 6. Tasa de crecimiento GR [día^{-1}] según la Ec 10

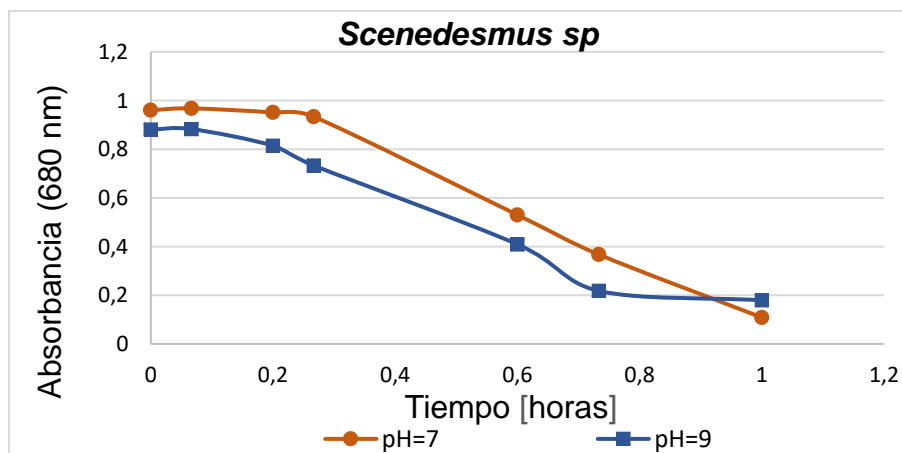
Medio de cultivo	<i>Scenedesmus sp</i>	<i>Synechocystis sp</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>
------------------	-----------------------	-------------------------	---------------------------

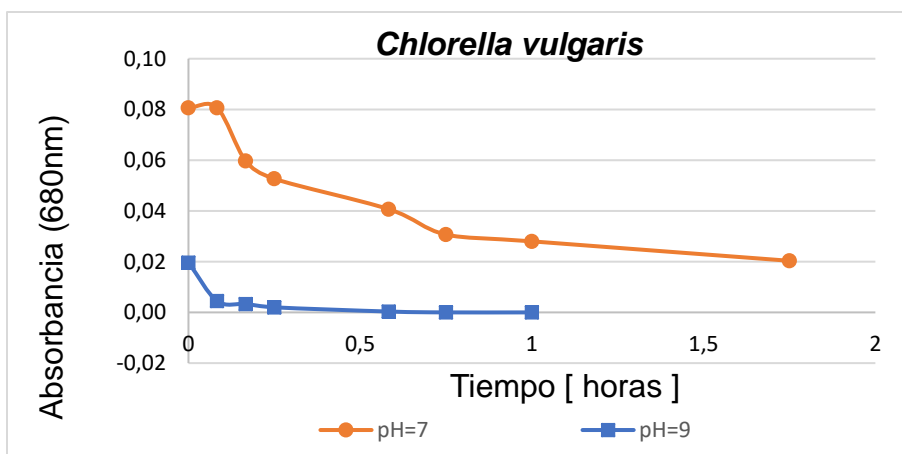
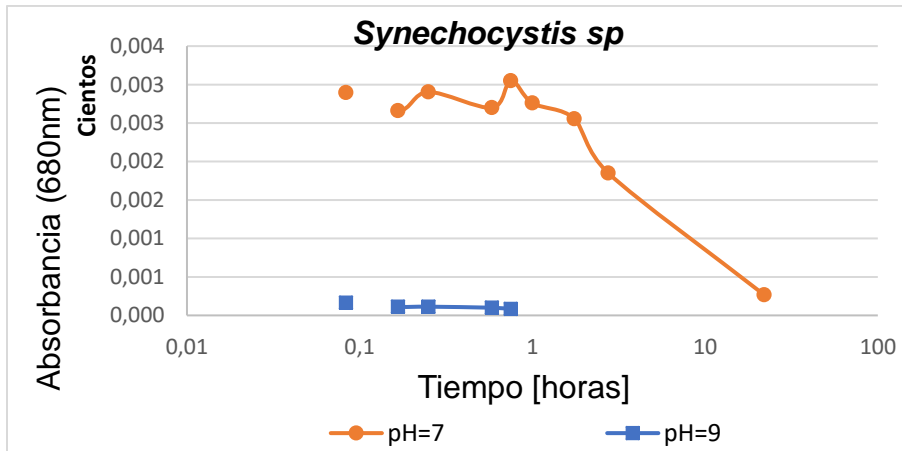
Medio de control	0,036487545	-0,009130955	-0,008757309
Agua residual	-0,006215098	0	0,020548719

Las especies no presentaron una tasa de crecimiento significativa en comparación a las especies que fueron expuestas a intervalos de luz y oscuridad (Tabla 1, Sección 5.1), algunos valores de GR son negativos lo que lleva a suponer un decrecimiento en la biomasa. Lo anterior confirma la afirmación científica que enuncia que las microalgas necesitan un régimen de luz y oscuridad para su proceso de fotosíntesis, la luz para la fase fotoquímica y la oscuridad para su fase bioquímica en donde sintetizan moléculas esenciales para su crecimiento (Serrano Bermudez, 2012).

5.3.2. Prueba de precipitación. En la Figura 8, se pueden observar las pruebas de precipitación realizadas para cada especie con presencia de NaOH como floculante (pH:9) y sin la presencia de floculante (pH:7)

Figura 8.Pruebas de precipitación





Scenedesmus sp no obtuvo una diferencia significativa en el tiempo de precipitación con la adición de NaOH, en ambos casos el tiempo de precipitación fue de 1 hora. En el caso de *Synechocystis sp* la adición de NaOH permitió reducir el tiempo de precipitación de 22 horas a 1 hora. En el caso de *Chlorella vulgaris* la diferencia no es tan drástica como en el caso de *Synechocystis sp*, sin embargo, la presencia de NaOH redujo el tiempo de precipitación de 1,7 horas a 1 hora.

6. CONCLUSIONES

De las especies de microalgas evaluadas, *Scenedemus sp* podría ser la más adecuada para el tratamiento de aguas residuales municipales, puesto que el ensayo en el que se usó esta especie se presentó la mayor eficiencia de remoción de la Demanda Química de Oxígeno –DQO, tanto en agua residual esterilizada (64.85%) y no esterilizada (69.89 %). Así mismo, los valores de remoción de amoníaco fueron cercanos al 100%.

Aunque *Chlorella sp* presentó la mejor remoción de Amonio NH_4^+ en agua residual esterilizada (99.8%), su uso podría ser menos favorable para la remoción de DQO puesto que solo alcanzo un porcentaje de remoción de 32,11%.

A pesar de que el tratamiento con *Synechocystis sp* presentó una importante remoción de amonio NH_4^+ en condiciones de agua esterilizada (96.52%), la remoción de DQO fue la más baja de las tres especies evaluadas (26.32%). Adicionalmente, su aplicación podría verse limitada solo al uso de aguas residuales esterilizadas, dado que en agua residual no esterilizada no presentó un crecimiento de densidad celular significativo (1%), en comparación con las otras cepas.

La producción de carotenos en agua residual se vio favorecida para *Synechocystis sp* y *Chlorella vulgaris* comparado con su medio convencional. Pese a que ambas especies se vieron beneficiadas en su contenido de carotenos al ser cultivadas en agua residual, el uso de *Chlorella vulgaris* podría ser más favorable debido que presento su mayor contenido de carotenos (618.69 [$\mu\text{g}/\text{mg}$]) en agua residual sin esterilizar, lo que permitiría omitir el proceso de esterilización y probablemente minimizar costos de producción.

Si bien *Scenedemus sp* presentó el mejor contenido de carotenos en medio convencional (733,15 $\mu\text{g}/\text{mg}$), su uso podría ser menos favorable si se usa como medio de cultivo agua residual esterilizada (110,13 $\mu\text{g}/\text{mg}$) y sin esterilizar (162,28 $\mu\text{g}/\text{mg}$).

De las especies evaluadas *Scenedesmus sp* y *Synechocystis sp* podrían ser las más favorables en la producción de proteínas en agua residual en comparación con sus medios convencionales (36,63 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 66,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y respectivamente), puesto que en los ensayos en los que se usó agua residual esterilizada presentaron los mejores resultados, *Scenedesmus sp* con 128.06 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y *Synechocystis sp* con 63.44 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Es conveniente destacar que el proceso puede verse limitado a el uso de aguas residuales únicamente después de realizarles un proceso de esterilizado. Adicionalmente, cabe destacar que *Chlorella vulgaris* podría no ser favorable para la producción de proteínas puesto que en ninguno de sus medios presentó un contenido de proteínas significativo respecto a las otras microalgas evaluadas.

7. RECOMENDACIONES

Al haber sido las cepas inoculadas en agua residuales se deben considerar las regulaciones existentes en su uso en la industria alimenticia y farmacéutica.

La producción de proteínas y carotenos en todas las especies fue mayor en las cepas inoculadas en agua residual esterilizada en comparación a las inoculadas en agua residual sin esterilizar (ver Figura 5 y Figura 6), por lo tanto, es posible considerar en futuros estudios, escalamientos y diseños del proceso siempre el uso de técnicas de esterilización que permitan un mejor rendimiento.

Según lo experimentos realizados de cultivo de microalgas en ausencia de luz se pudo corroborar que la exposición a la luz es fundamental en la producción de biomasa microalgal. Lo anterior es de suma importancia, puesto que de la efectividad de crecimiento de la biomasa se deriva su capacidad de degradación de contaminantes en el agua residual y la productividad de extracción de moléculas de interés como carotenos y proteínas. Por lo anterior, es necesario diseñar mecanismos y sistemas experimentales que potencialicen la exposición a la luz con el fin de mejorar la eficiencia del proceso.

La implementación de floculantes para la precipitación de la biomasa es una alternativa viable y de menor costo comparada con procesos tecnológicos como la centrifugación. Sin embargo, se debe considerar en posteriores estudios si la composición química del floculante puede afectar de manera negativa la extracción de sus componentes intracelulares.

REFERENCIAS

- [1] ABDEL, Raouf., HOMAIDAN, Al. y IBRAHEEM, Ibm. *Microalgas y tratamiento de aguas residuales*. En: Saudi Journal of Biological Sciences. Abril, 2012. vol. 19, no. 3, p. 257-275.
- [2] CEPEDA, Andrés. Estudio de la capacidad de secuestro de CO₂ de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 en aguas residuales industriales en foto biorreactores a escala laboratorio. Tesis de pregrado Bucaramanga.: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. 2011. p. 12-13
- [3] MA, Jinxing., WANG, Zhiwei., ZHANG, Junyao., WAITE, David y WU, Zhichao. Producción rentable de biomasa de *Chlorella* a partir de aguas residuales diluidas utilizando una nueva pila de combustible microbiana fotosintética. En: Water Research Elsevier. Noviembre, 2016. vol. 108. p. 356-364.
- [4] LEÓN, Andres y SÁNCHEZ, Vanessa. Estudio de la Influencia del uso de agua residual sobre el rendimiento del cultivo de microalgas en un fotobiorreactor escala laboratorio. Tesis de pregrado Bucaramanga.: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. 2010. p. 3-7
- [5] DARZINS, Al., PIENKOS, Philip y EDYE, Les. Estado actual y Potencial de la producción de Biocombustibles a partir de algas. IEA Bioenergy., 2010. Informe T39-T2.
- [6] HARUN, Razif., SINGH, Manjinder., FORDE, Gareth y DANQUAH, Michael. Ingeniería de Bioprocesos a partir de microalgas para producir una variedad de productos de consumo. En: Renewable and Sustainable Energy Reviews Elsevier, 2009. vol. 14, no. 3, p. 1037-1047.
- [7] XIAO, Rui y & ZHENG, Yi. Descripción general de las sustancias poliméricas extracelulares de microalgas (EPS) y sus aplicaciones. En: Biotechnology Advances. Agosto, 2016. vol. 34. p. 1225-1244.
- [8] SHEENAN, John., DUNAHAY, Terri., BENEMANN, John y ROESSLER, Paul. Una mirada al Programa de Especies Acuáticas del Departamento de Energía de los EE. UU. - Biodiesel de Algas. National Renewable Energy Laboratory., 1998. Informe TP-580-24190.

- [9] GOMEZ, Liliana. Microalgas: aspectos ecológicos y biotecnológicos. En: Revista Cubana de Química. Marzo, 2015. Vol 19, no.2, p. 1-19.
- [10] GONZALES, Ángel y KAFAROV, Viatchesla. Biorrefinería basada en microalgas: evaluación de métodos de extracción de aceite en términos de eficiencia, costos, toxicidad y energía a escala laboratorio. En: Revista Ion. Junio, 2013. Vol. 25, no. 2. p 27-39.
- [11] FIROZ, Alam., DATE, Abhijit., RASJIDIN, Roesfiansjah., MOBIN, Saleh., MORIA, Hazim y BAQUI, Abdul. Biocombustibles a base de algas: ¿Es una alternativa viable?. En: Procedia Engineering Elsevier. Agosto, 2012. vol. 49, p. 221-228.
- [12] MUTANDA, T., RAMESH, D., KARTHIKEYAN, S., KUMARI, S., ANANDRAJ, A y BUX, F. Bioprospección para cepas de microalgas que producen hiperlipidemia para la producción sostenible de biocombustibles. En: Bioresource Technology. Enero, 2011. vol. 102. no. 1, p.57-70.
- [13] QUEVEDO, Catalina., MORALES, Sonia y ACOSTA, Alejandro. Crecimiento de *Scenedesmus* sp en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal. En: Revista Viate. Enero, 2008. vol.15. no.5. p. 25-31.
- [14] SERRANO, Luis. Estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel. Tesis de maestría Bogota D.C. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. 2012. p. 53-68.
- [15] RIQUELME, Carlos Y AVEDAÑO, Rubén. Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura. En: Revista Chilena de Historia Natural. 2003, vol. 76. p. 725-736.
- [16] XIN, LI., HU HONG, KE, GAN y JIA, Yang. Propiedades de crecimiento y eliminación de nutrientes de una microalga de agua dulce *Scenedesmus* sp. LX1 bajo diferentes tipos de fuentes de nitrógeno. En: Ecological Engineering, Agosto, 2010. vol. 36. p. 379-381.
- [17] YI-FENG, Nancy., CHEN, Paul., MIN, Min y ZHOU, Wenguang. Caracterización de una microalga *Chlorella* sp. bien adaptado a altamente aguas residuales municipales concentradas para la eliminación de nutrientes y la producción de

biodiesel. En: Bioresource Technology Elsevier. Febrero, 2011. vol. 102, no. 8, p. 8.

[18] HO, Shih-Hsin., CHEN, Chun-Yen y CHANG Jo-Shu. Efecto de la intensidad de la luz y la inanición de nitrógeno en la fijación de CO₂ y producción de lípidos / carbohidratos de una microalga indígena *Scenedesmus obliquus* CNW-N. En: Bioresource Technology Elsevier, 2011. vol.113, p. 244-252.

[19] KATAKIS, Ioanis. Cultivo mixotrófico de *Scenedesmus* para mejorar la producción de productos de interés. Research group Interfibio., 2017. Informe KA0.

BIBLIOGRAFÍA

ABDEL, Raouf., HOMAIDAN, Al. y IBRAHEEM, Ibm. *Microalgas y tratamiento de aguas residuales*. En: Saudi Journal of Biological Sciences. Abril, 2012. vol. 19, no. 3, p. 257-275.

CEPEDA, Andrés. Estudio de la capacidad de secuestro de CO₂ de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 en aguas residuales industriales en foto biorreactores a escala laboratorio. Tesis de pregrado Bucaramanga.: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. 2011. p. 12-13

DARZINS, Al., PIENKOS, Philip y EDYE, Les. Estado actual y Potencial de la producción de Biocombustibles a partir de algas. IEA Bioenergy., 2010. Informe T39-T2.

FIROZ, Alam., DATE, Abhijit., RASJIDIN, Roesfiansjah., MOBIN, Saleh., MORIA, Hazim y BAQUI, Abdul. Biocombustibles a base de algas: ¿Es una alternativa viable?. En: Procedia Engineering Elsevier. Agosto, 2012. vol. 49, p. 221-228.

GOMEZ, Liliana. Microalgas: aspectos ecológicos y biotecnológicos. En: Revista Cubana de Química. Marzo, 2015. Vol 19, no.2, p. 1-19.

GONZALES, Ángel y KAFAROV, Viatchesla. Biorrefinería basada en microalgas: evaluación de métodos de extracción de aceite en términos de eficiencia, costos, toxicidad y energía a escala laboratorio. En: Revista Ion. Junio, 2013. Vol.25, no.2. p 27-39.

HARUN, Razif., SINGH, Manjinder., FORDE, Gareth y DANQUAH, Michael. Ingeniería de Bioprocesos a partir de microalgas para producir una variedad de productos de consumo. En: Renewable and Sustainable Energy Reviews Elsevier, 2009. vol. 14, no. 3, p.1037-1047.

HO, Shih-Hsin., CHEN, Chun-Yen y CHANG Jo-Shu. Efecto de la intensidad de la luz y la inanición de nitrógeno en la fijación de CO₂ y producción de lípidos / carbohidratos de una microalga indígena *Scenedesmus obliquus* CNW-N. En: Bioresource Technology Elsevier, 2011. vol.113, p. 244-252.

KATAKIS, Ioanis. Cultivo mixotrófico de *Scenedesmus* para mejorar la producción de productos de interés. Research group Interfibio., 2017. Informe KA0.

LEÓN, Andres y SÁNCHEZ, Vanessa. Estudio de la Influencia del uso de agua residual sobre el rendimiento del cultivo de microalgas en un fotobirreactor escala laboratorio. Tesis de pregrado Bucaramanga.: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físicoquímicas.2010. p. 3-7

LUO, Shanshan., GRIFFITH, Richard., LI, Wenkiu., PENG, Peng., CHENG, Yanling., CHEN, Paul., ADDY, Min., LIU, Yuhuan y RUAN, Roger. Un sistema de flotación electrolítico continuo libre de floculantes para la cosecha de microalgas. En: Bioresource Technology. Abril, 2017, vol. 238. p.439-449.

MA, Jinxing., WANG, Zhiwei., ZHANG, Junyao., WAITE, David y WU, Zhichao. Producción rentable de biomasa de Chlorella a partir de aguas residuales diluidas utilizando una nueva pila de combustible microbiana fotosintética. En: Water Research Elsevier. Noviembre, 2016. vol. 108. p. 356-364.

MUTANDA, T., RAMESH, D., KARTHIKEYAN, S., KUMARI, S., ANANDRAJ, A y BUX, F. Bioprospección para cepas de microalgas que producen hiperlipidemia para la producción sostenible de biocombustibles. En: Bioresource Technology. Enero, 2011. vol. 102. no. 1, p.57-70.

QUEVEDO, Catalina., MORALES, Sonia y ACOSTA, Alejandro. Crecimiento de Scenedesmus sp en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal. En: Revista Viata. Enero, 2008. vol.15. no.5. p. 25-31.

RIQUELME, Carlos Y AVEDAÑO, Rubén. Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura. En: Revista Chilena de Historia Natural. 2003, vol. 76. p. 725-736.

SERRANO, Luis. Estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel. Tesis de maestría Bogota D.C. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. 2012. p. 53-68.

SHEENAN, John., DUNAHAY, Terri., BENEMANN, John y ROESSLER, Paul. Una mirada al Programa de Especies Acuáticas del Departamento de Energía de los EE. UU. - Biodiesel de Algas. National Renewable Energy Laboratory., 1998. Informe TP-580-24190.

VJ, Murali y MC, Nisha. Eficiencia de fitoremediación de las tres microalgas *Chlorella Vulgaris*, *Synechocystis Salina* y *Gleocapsa Gelatinosa*. En: *Botany Research*. 2009. vol.16. no. 1, p 138-146.

WOLKERS, Hans., BARBOSA, María., KLEINEGRIS, Dorinde., BOSMA, Rouke y WUFFELS, René. *Microalgas: ¿El oro verde del futuro?*. Wageningen UR. Postbus 9101.

XIAO, Rui y & ZHENG, YI. Descripción general de las sustancias poliméricas extracelulares de microalgas (EPS) y sus aplicaciones. En: *Biotechnology Advances*. Agosto, 2016. vol. 34. p. 1225-1244.

XIN, LI., HU HONG, KE, GAN y JIA, Yang. Propiedades de crecimiento y eliminación de nutrientes de una microalga de agua dulce *Scenedesmus sp. LX1* bajo diferentes tipos de fuentes de nitrógeno. En: *Ecological Engineering*, Agosto, 2010. vol. 36. p. 379-381.

YI-FENG, Nancy., CHEN, Paul., MIN, Min y ZHOU, Wenguang. Caracterización de una microalga *Chlorella sp.* bien adaptado a altamente aguas residuales municipales concentradas para la eliminación de nutrientes y la producción de biodiesel. En: *Bioresource Technology Elsevier*. Febrero, 2011. vol. 102, no. 8, p. 8.

ANEXOS

ANEXO A. Composición de los medios de cultivo empleados

Medio BG-11

Tabla A.1. Composición del medio BG-11 Sigma -Aldrich

Nombre del compuesto	Cantidad [mg/L]
Borid acid	2,86
Calcium chloride dihydrate	36,0
Citric acid	6,0
Cobalt nitrate · 6H ₂ O	0,0494
Cupric sulfate · 5H ₂ O	0,079
EDTA (free acid)	50
EDTA disodium magnesium	1,0
Ferric ammonium citrate	6,0
Magnesium sulfate · 5H ₂ O	75,0
Manganese chloride· 4H ₂ O	1,81
Potassium phosphate dibasic	40,0
Sodium carbonate	20,0
Sodium molybdate · 2 H ₂ O	0,39
Sodium nitrate	1500
Zinc sulfate · 2 H ₂ O	0,222

Medio ASP₁₂

Tabla A.2. Composición del medio ASP₁₂ de acuerdo con J.McLachlan Handbook of Phycological Methods, Culture Methods and Growth Measurements; ed.: Janet R. Stein; pp. 25 – 52)

Nombre del compuesto	Cantidad [g/L dH ₂ O]	Adición por 1 litro de medio
HEPES	238,1	3 mL
NaCl		28g
KCl	60,0	11,6
MgSO ₄ · 7H ₂ O		7
MgCl ₂ · 6 H ₂ O		4
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	370,0	4
NaNO ₃	100,3	1
K ₃ PO ₄ · 3 H ₂ O	12,5	1
Na ² -Glycerophosphate	6,85	1
Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	28,42	5,3

NTA (Titriplex I)*	10,00	10
Vitamins		1
Trace Metals		1

Solución de vitaminas

Nombre del compuesto	Adición por 1 litro de medio [mg]
Vitamin B ¹²	0,20
Biotin	1,00
Thiamine HCl	100,00
Niacinamide	0,10

Solución Traza de Metales

Nombre del compuesto	Adición por 1 litro de medio [mg]
K ₂ CrO ₄	0,194
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	1,00
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,25
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	18,00
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	1,89
NiSO ₄ · 6 H ₂ O	0,27
H ₂ SeO ₃	0,13
Na ₃ VO ₄	0,184
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	2,20

ANEXO B. Protocolo Del KIT Micro BCATM Protein Assay

Preparation of Standards and Working Reagent

A. Preparation of Diluted Albumin (BSA) Standards

Use Tabla 1 como guía para preparar el set de proteínas estándar. Diluya el contenido de una ampolleta de Albumina Estándar (BSA) dentro de un vial limpio, preferiblemente usando un diluyente similar al de la muestra. Cada ml de ampolleta de Albumina Estándar de 2.0 mg/ml es suficiente para preparar un set de proteínas estándar.

Table 1. Preparation of Diluted Albumin (BSA) Standards

<u>Vial</u>	<u>Volume of Diluent</u>	<u>Volume and Source of BSA</u>	<u>Final BSA Concentration</u>
A	4.5mL	0.5mL of Stock	200µg/mL
B	8.0mL	2.0mL of vial A dilution	40µg/mL
C	4.0mL	4.0mL of vial B dilution	20µg/mL
D	4.0mL	4.0mL of vial C dilution	10µg/mL
E	4.0mL	4.0mL of vial D dilution	5µg/mL
F	4.0mL	4.0mL of vial E dilution	2.5µg/mL
G	4.8mL	3.2mL of vial F dilution	1µg/mL
H	4.0mL	4.0mL of vial G dilution	0.5µg/mL
I	8.0mL	0	0µg/mL = Blank

B. Preparación del Reactivo de Trabajo Micro BCA (WR- siglas en ingles)

1. Use la siguiente fórmula para determinar el volumen necesario de WR requerido:
(# estándar + # desconocidas) × (# replicas) × (Volumen de WR por muestra) = Total de WR requerido

Ejemplo: Para el Test Tubo Procedure con 3 muestras desconocidas y 2 réplicas por cada muestra:

$(9 \text{ estándar} + 3 \text{ desconocidas}) \times (2 \text{ réplicas}) \times (150\mu\text{L}) = 3600 \mu\text{L WR requeridos}$
(redondear a 4 µL)

2. Prepara el WR mezclando 25 partes de Reactivo Micro BCA MA, 24 partes de Reactivo Micro BCA MB y 1 parte de Reactivo MC (25:24:1, Reactivo MA: MB:MC). Para el ejemplo anterior, combinar 2 ml de MA, 1,92 ml de MB y 0,08 ml de MC.

Microplate Procedure (rango de 2-40µg/ml)

1. Pipetear 150µl de cada muestra estándar y desconocida sus respectivos números de réplicas en una micro placa de 96 pozos. (Producto No. 15041).

2. Agregar 150µl de WR en cada pozo y agitar en un agitador de platos durante 30 segundos.

3. Cubrir la micro placa con Cinta de sellado de 96 pozos (Producto No. 15036) e incubar a 37°C por 2 horas.

Nota: Limite las incubaciones de la micro placa a menos de o igual a 37 ° C, de lo contrario se puede producir un fondo alto y un desarrollo de color aberrante. La mayoría de las placas de ensayo de poli estireno se deforman, se filtran y se vuelven turbias a 60 ° C4. Enfriar el plato a temperatura ambiente.

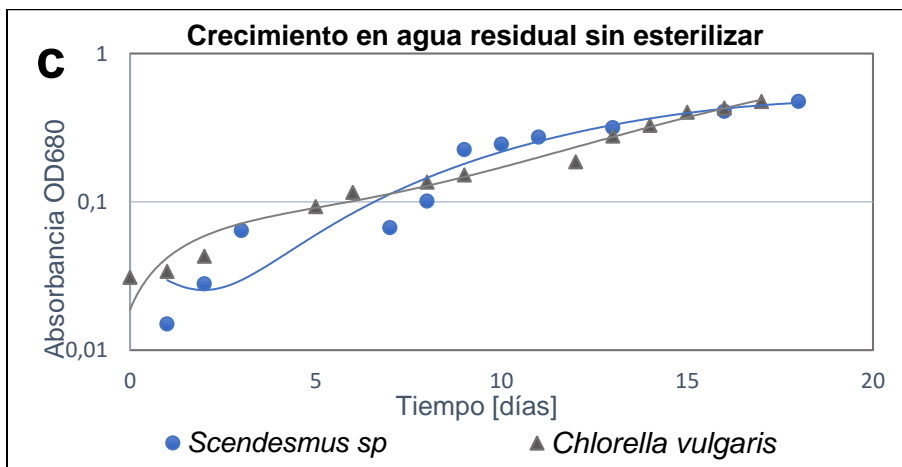
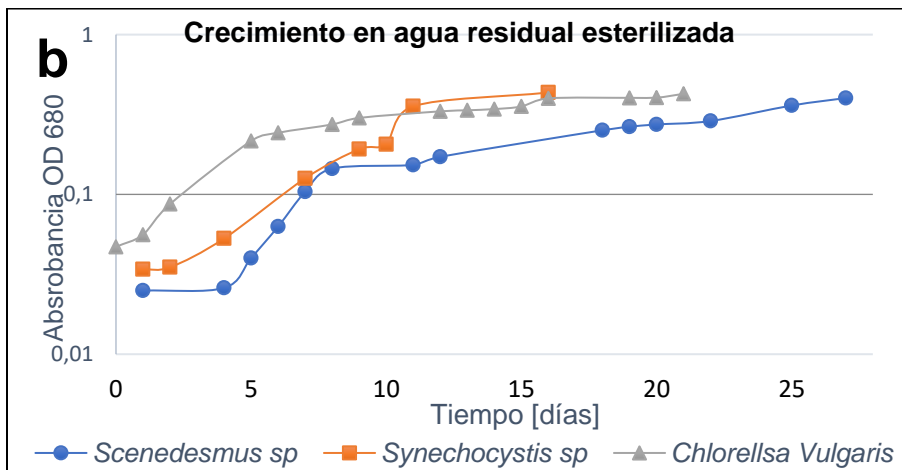
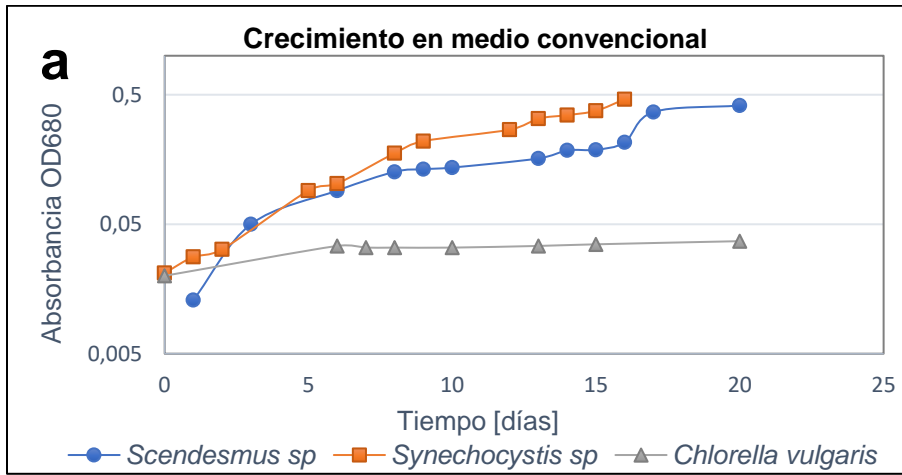
5. Medir la absorbancia a una longitud de onda de 562 nm en un lector de platos

6. Reste la lectura de absorbancia promedio de 562nm de las réplicas estándar en blanco de la lectura de 562nm de todas las otras réplicas de muestra estándar y desconocidas individuales.

7. Prepare una curva estándar trazando la lectura promedio de 562nm corregida en blanco para cada estándar BSA y su concentración en µg / mL. Use la curva estándar para determinar la concentración de proteína de cada muestra desconocida.

Nota: Si usa un software de ajuste de curvas, use una ecuación polinómica de mejor ajuste en lugar de una ecuación lineal la curva estándar. Si se trazan resultados a mano, es preferible un ajuste de punto a punto a un ajuste lineal a los puntos estándar.

ANEXO C Graficas de seguimiento vía absorbancia de las especies



Graficas de seguimiento vía absorbancia de las especies en la fase (a) medio de cultivo convencional (b) agua residual esterilizada (c) agua residual sin esterilizar