

Eliminación de fosfatos y nitratos de agua residual municipal mediante un inóculo optimizado de *Chlorella* sp. en un sistema de fotobiorreactores verticales con columna de burbujeo a escala piloto

Ana Raquel Polo Ibáñez

Isabel Cristina Vargas Vélez



Corporación Universidad de la Costa - CUC

Departamento de Civil y Ambiental

Programa de Ingeniería Ambiental

Barranquilla, Atlántico

2019

Eliminación de fosfatos y nitratos de agua residual municipal mediante un inóculo optimizado de *Chlorella* sp. en un sistema de fotobiorreactores verticales con columna de burbujeo a escala piloto

Ana Raquel Polo Ibáñez

Isabel Cristina Vargas Vélez

Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de:

Ingeniero Ambiental

Director:

Euler Gallego Cartagena

Magister en Ciencias Ambientales

Codirector:

Wendy Morgado Gamero

Magister en Biotecnología

Corporación Universidad de la Costa - CUC

Departamento de Civil y Ambiental

Programa de Ingeniería Ambiental

Barranquilla, Atlántico

Nota de Aceptación

Presidente del Jurado

Jurado

Jurado

Barranquilla, 13 de septiembre de 2019.

Dedicatoria

Dedico este trabajo primeramente a Dios, por ser guía durante este proceso y darme la fuerza para culminarlo. A mi familia, por su constante apoyo, aliento y confianza. A mis amigos, compañeros y a todas las personas que han tenido parte de este transcurrir, porque con sus palabras, oraciones y afecto me motivaron a continuar.

Ana Raquel Polo Ibáñez.

Dedicatoria

A *Dios* por darme sabiduría, y determinación para proyectarme y cumplir los objetivos que me propongo. Pero sobre todo por el amor y la paciencia.

A *Juan Diego* particularmente, por inspirarme a no ponerme límites, a comprender que todos somos un conjunto de teorías y vivencias que nos hacen únicos. A lo mejor nunca lea esto, pero gracias a él por motivarme a estudiar este programa, me descubrí.

A mi familia por apoyarme y no comprenderme en repetidas ocasiones, forjé mi esencia. En especial a doña *Blanca*, por su amor incondicional. Al *señor Tivi* por las anécdotas y las melcochas. A *Ibis* por despertarse todas las mañanas a hacerme desayuno. A *Luchi* por estudiar conmigo hasta tarde y explicarme lo que no lograba comprender. A *Esteban* por hacer el papel de papá, le salió muy bien. A *Tina* por las risas, y los atardeceres en Támesis. A *Chela* por la nobleza y las kínder sorpresas. Al *tío Niño*, por el ejemplo, y las largas caminatas. A *Roy*, por los paseos en Urabá. A la *Tía Lili*, por las tardes inolvidables de río Hobo. A la *tía Mona, Jean, Freddy y Karen*, por acogerme en la intimidad de su hogar.

A todas las personas que de alguna u otra forma me extendieron su mano para dar un paso hacia delante. Especialmente, a *Hurtado* por ayudarme a ser la mejor versión de mí. Por recordarme todos los días que sí soy capaz, que soy el *Puto Jaquer Popótamo Volador*, y que voy a llegar tan lejos como me proponga.

Mi gratitud a todos ustedes.

Isabel Cristina Vargas Vélez.

Agradecimientos

Agradecemos principalmente a Dios, porque nos regaló mucha sabiduría y fortaleza para desarrollar cada etapa de esta investigación, porque a través de su gracia conectó nuestros caminos para conformar una verdadera dupla de investigación que fuera capaz de resistir cada intento fallido de este proceso.

A las laboratoristas Erika Arbeláez, y Ana Villalobos, por ser testigos de cada día de perseverancia por obtener los mejores resultados, por brindarnos una mano amiga cuando lo necesitamos. Al profesor Walter Barbosa, por su generosidad y orientación. Al profesor Alexander Parody por su disposición y aportes académicos.

A todo el grupo de trabajo del proyecto Índice denominado “*Desarrollo de un sistema de tratamiento de aguas residuales domésticas mediante la implementación de filtración múltiple con material bioadsorbente y microalgas*”, por la compañía, el apoyo y la orientación. Al profesor Euler Gallego Cartagena, por invitarnos a ser parte del maravilloso mundo de la investigación, por confiar y poner en nuestras manos esta iniciativa. A la profesora Wendy Morgado, por acoger nuestro proceso y orientarnos.

A nuestra alma mater Universidad de la Costa, por ser nuestra plataforma de desarrollo como profesionales, y por permitirnos acceder a los medios que fueron necesarios para llevar a cabo esta investigación.

Ana Raquel Polo Ibáñez e Isabel Cristina Vargas Vélez.

Resumen

El vertimiento de aguas residuales municipales en los cuerpos de agua locales constituye una de las principales causas de la eutrofización. Como tratamiento terciario para esta problemática se utilizó un cultivo de *Chlorella* sp., (reconocido por su capacidad de remoción de fosfatos y nitratos en aguas residuales) en un sistema de fotobiorreactores verticales con columna de burbujeo a escala piloto. Se realizó un diseño experimental de tipo factorial, con tres fases experimentales, en el que se empleó agua residual municipal proveniente de la EDAR “el Pueblo”. Inicialmente se determinó el tamaño de inóculo al que se obtiene la mayor remoción de NO_3^- y PO_4^{3-} , con lo que se logró una densidad celular óptima 3.6×10^6 cel/mL. La segunda fase permitió cuantificar la concentración de fosfatos y nitratos removido de aguas residuales evaluada respecto al crecimiento de la cepa utilizada, el experimento arrojó remociones superiores al 95% en concentraciones de nitratos y del 65.5% para fosfatos. En la tercera fase se llevó el tamaño de inóculo determinado en la primera fase, a un sistema de fotobiorreactores evaluando sus parámetros de operación respecto a la capacidad de remoción de nutrientes de la cepa. Con los resultados obtenidos se concluyó que el sistema propuesto es una alternativa viable para el tratamiento de aguas residuales con diferentes cargas de nutrientes.

Palabras clave: Microalga, eutrofización, fotobiorreactor, remoción de nutrientes, tratamiento de aguas residuales

Abstract

The discharge of municipal wastewater into local water bodies is one of the main causes of eutrophication. As a tertiary treatment for this problem, a culture of *Chlorella* sp. (recognized for its ability to remove phosphates and nitrates in wastewater) was used in a vertical system of photobioreactors with a bubble column at a pilot scale. An experimental factorial design was carried out, with three experimental phases, was used municipal wastewater from the WWTP “El Pueblo”. Initially, the inoculum size was determined at which the highest removal of NO_3^- and PO_4^{3-} is obtained, was resulted as optimal cell density 3.6×10^6 cel/mL. The second phase allowed quantifying the concentration of phosphates and nitrates removed from wastewater evaluated according with the growth of the strain used, the experiment yielded removals greater than 95% in nitrate concentrations and 65.5% for phosphates. In the third phase, the inoculum size determined in first phase, was taken to a photobioreactor system evaluating its operating parameters regarding the nutrient removal capacity of the strain. With the results obtained, it was concluded that the proposed system is a viable alternative for the treatment of wastewater with different nutrient loads.

Keywords: Microalgae, eutrophication, photobioreactor, nutrients removal, wastewater treatment

Contenido

Lista de Tablas y figuras	12
Introducción.....	15
1. Planteamiento del problema	18
2. Justificación.....	21
3. Objetivos	24
3.1 General	24
3.2 Específicos	24
4. Marco teórico y estado del arte.....	25
4.1 Antecedentes	25
4.2 Marco conceptual.....	29
4.2.1 Generalidades de la especie <i>Chlorella</i> sp.....	29
4.2.2 Técnica de aislamiento: Rayado de placas de agar.....	31
4.2.3 Medios de cultivo: Medio Basal Bold	32
4.2.4 Compuestos inorgánicos de aguas residuales municipales: nitratos y fosfatos.....	32
4.2.5 Manejo y vertimientos de aguas residuales municipales en Barranquilla, Atlántico ..	34
4.2.6 Tratamiento de aguas residuales municipales con Microalgas	35
4.2.7 Tipos de cultivos de microalgas: continuo y discontinuo	37
4.2.8 Tipos de sistemas de cultivo de microalgas	38
4.2.9 Marco Legal.....	39

5. Metodología.....	42
5.1 Tipo de investigación	42
5.2 Lugar de estudio	42
5.3 Población y muestra	43
5.4 Diseño de investigación y experimental.....	44
5.4.1. Consideraciones técnicas para la determinación del tamaño de inóculo óptimo de <i>Chlorella</i> sp. usado en un sistema de fotobiorreactores verticales con columna de burbujeo a escala piloto	47
5.4.2. Cuantificación de la concentración de nutrientes removidos usando <i>Chlorella</i> sp.....	54
5.4.3. Evaluación de la remoción de NO_3^- y PO_4^{3-} del inóculo escogido de <i>Chlorella</i> sp. en un sistema de fotobiorreactores verticales con columna de burbujeo a escala piloto	56
5.5. Análisis Estadístico	58
6. Análisis de resultados.....	59
6.1 Determinación del tamaño de inóculo inicial de la cepa de <i>Chlorella</i> sp. para su uso en la remoción de NO_3^- y PO_4^{3-} en un sistema de fotobiorreactores verticales con columna de burbujeo	59
6.2 Análisis de la capacidad de remoción de NO_3^- y PO_4^{3-} de aguas residuales de la EDAR “El Pueblo” (Barranquilla) en cultivos discontinuos de <i>Chlorella</i> sp. en condiciones outdoor	66

6.3	Evaluación de la remoción de NO_3^- y PO_4^{3-} del inóculo escogido de <i>Chlorella</i> sp. en relación con los parámetros de operación de un sistema de fotobiorreactores verticales con columna de burbujeo	75
7.	Conclusiones.....	81
8.	Recomendaciones	84
9.	Referencias	85
	Anexos.....	108
	Anexo A. Diagramas de flujos metodológicos	108
	Anexo B. Ecuaciones matemáticas aplicadas	111
	Anexo C. Ecuaciones de modelos simples ajustados aplicados.....	113

Lista de Tablas y figuras

Tablas

Tabla 1. Composición estándar del medio de cultivo basal de bold (MBB)	48
Tabla 2. Tasa específica de crecimiento (TEC) y tiempo de duplicación (Td) en las fases de adaptación y exponencial	61
Tabla 3. Concentración de clorofila α y β en las fases de adaptación y exponencial	63
Tabla 4. Porcentajes de remoción obtenidos al tercer día del experimento (fase 2).....	73
Tabla 5. Resultados obtenidos en la fase experimental número 3	77

Figuras

Figura 1. Ilustración de la célula <i>Chlorella</i> sp. adaptado de “Microalgas para la industria alimenticia”	30
Figura 2. Georreferenciación de puntos de vertimientos puntuales de aguas residuales realizados por la empresa prestadora del servicio de saneamiento	35
Figura 3. Fotobiorreactor tubular en formato columna de burbujas	39
Figura 4. Identificación geográfica del lugar de estudio a tres escalas: nacional, regional y local.	43
Figura 5. Cepa proporcionada por el centro de investigación CITA	44
Figura 6. Unidades experimentales de los fases 1 y 2 en condiciones exteriores.....	45
Figura 7. Esquema general del diseño experimental de la investigación.....	46

ELIMINACIÓN DE NUTRIENTES UTILIZANDO CHLORELLA SP.	13
Figura 8. Rayado en placas de agar para obtención de cultivo monoespecífico	47
Figura 9. Punto de vertimiento directo de EDAR “El Pueblo” a Arroyo León.....	49
Figura 10. Montaje experimental de las fases 1 y 2 del proyecto.....	50
Figura 11. Hematocitómetro de Neubauer usado para conteo celular en las diferentes fases del proyecto	51
Figura 12. Unidades de conteo de hematocitómetro de Neubauer.	52
Figura 13. Extracción de pigmentos con acetona al 90%.....	54
Figura 14. Sistema de reactores usados durante la fase 3 de la investigación.....	57
Figura 15. Curva de crecimiento de <i>Chlorella</i> sp. inoculada en los diferentes tratamientos establecidos	60
Figura 16. Grafico del modelo ajustado de la relación establecida entre la variable de crecimiento celular y de concentración de NO_3^-	64
Figura 17. Grafico del modelo ajustado de la relación establecida entre la variable de crecimiento celular y de concentración de PO_4^{3-}	65
Figura 18. Comportamiento de nutrientes en el tratamiento 1 respecto a los días experimentales	66
Figura 19. Comportamiento de nutrientes en el tratamiento 2 respecto a los días experimentales	67
Figura 20. Comportamiento de nutrientes en el tratamiento 3 respecto a los días experimentales	68

Figura 21. Grafico del modelo ajustado que explica significancia entre el factor día y la variable dependiente PO_4^{3-}	69
Figura 22. Significancia entre medias categoricas y concentraciones de PO_4^{3-} a través de intervalos LSD de Fisher.	70
Figura 23. Significancia entre medias categóricas y concentraciones de NO_3^- a través de intervalos LSD de Fisher.	71
Figura 24. Comportamiento de pH en los distintos tratamientos establecidos respecto a los días experimentales	72
Figura 25. Comportamiento de la densidad poblacional de <i>Chlorella</i> sp. en el sistema de fotobiorreactores verticales con columna de burbujeo.....	78
<i>Figura 26.</i> Porcentajes de remoción de nutrientes obtenidos por <i>Chlorella</i> sp. en el sistema de fotobiorreactores verticales con columna de burbujeo.....	80
Figura 27. Diagrama de flujo sobre el método utilizado para la determinación de pigmentos. ..	108
Figura 28. Diagrama de flujo sobre la determinación de la concentración de nitratos a través del método de reducción de cadmio	109
Figura 29. Diagrama de flujo sobre la determinación de fosfatos a través del método con Molibdovanadato	110

Introducción

Las aguas residuales municipales son las que se obtienen como resultado final de las actividades desarrolladas por los seres humanos en hogares, centros educativos, hospitales, y establecimientos comerciales (Ali y Aziz, 2017). Estas se caracterizan por contener altas concentraciones de sólidos suspendidos, sólidos sedimentables, materia orgánica e inorgánica, grasas, gases disueltos y microorganismos (Nawarkar y Salkar, 2019). Dentro de dicha materia inorgánica, se encuentran sales como fosfatos y nitratos, los cuales al ser descargados a cuerpos de agua lénticos se constituyen como uno de principales causantes de la eutrofización (Muñoz, 2008). Este proceso contribuye a la proliferación excesiva de comunidades de productores primarios (por ejemplo, macrófitas, floraciones algales y cianobacterianas) que compiten con factores determinantes en la sobrevivencia de la fauna acuática (Havens, 2008). La posterior muerte de estas comunidades afecta negativamente la concentración de oxígeno disuelto utilizado por las comunidades aeróbicas (Ansari, Gill y Khan, 2010). En efecto el vertimiento de aguas residuales sin tratamiento permite que se presenten bajos niveles de oxígeno en los cuerpos de agua, deterioro de la calidad ecológica por pérdida de biodiversidad, desvalorización paisajística y disminución de los bienes y servicios ecosistémicos del recurso, entre otros (Solano, 2011).

Con el fin de optimizar y posteriormente reemplazar las unidades de tratamiento terciario que son implementadas en las actuales plantas de tratamiento de aguas residuales constituidas principalmente por unidades de coagulación, filtración y adsorción (Gerba y Pepper, 2019), se han venido implementando diversos sistemas de tratamientos que incluyen procesos fisicoquímicos y biológicos de tipo terciario (Hendricks, 2011), como el intercambio iónico a través de electrocoagulación (Sadik, 2019), oxidación avanzada mediante fotocátalisis

heterogénea (Garcés, Mejía y Santamaría, 2004), difusión con membranas avanzadas a través de osmosis inversa (Parveen y Hankins, 2019), entre otros.

Sin embargo, la mayoría de los procesos anteriormente mencionados son costosos, representan alto consumo de electricidad, tienen limitaciones respecto al caudal de tratamiento y tiempo de retención y al porcentaje de eficiencia de remoción total de nutrientes, principalmente del fosforo (Mažeikienė, 2019). Se ha demostrado que procesos de tratamiento terciario como la remoción de nutrientes a través de microalgas y consorcios de éstas con bacterias, han presentado resultados significativos en cuanto a eficiencia operativa, y una relación costo-beneficio mucho más competitiva respecto a las unidades convencionales de tratamiento terciario como los ya mencionados (Foladori, Petrini y Andreottola, 2018).

Como una alternativa a las tecnologías convencionales/tradicionales terciarias para el tratamiento de aguas residuales, el uso de microalgas en sistema de reactores verticales o de columna, han sido ampliamente estudiados para la eliminación de nutrientes en estas aguas debido a su capacidad de asimilación simultánea de nitrógeno y fosforo (Gross, Kumar, Kunetz, Wen y Zhao, 2018). Este tipo de tratamiento consiste en cultivar microalgas en el sistema, con el fin de que estos microorganismos a través de la fotosíntesis fijen las fuentes de nitrógeno y sinteticen las fuentes de fosforo del agua residual, controlando a su vez factores fisicoquímicos que influyen en el medio, así como también los parámetros de operación de dichos biorreactores (Gonçalves, Pires y Simões, 2017). Según Cai, Li, y Park (2013) especies como la *Chlorella* sp. se ha usado en numerosos estudios demostrando que es eficaz en la eliminación de nitrógeno y fosforo en aguas residuales en un rango entre 80% y 100%. A pesar de este panorama tan promisorio, existe un amplio desafío relacionado a las características del sistema de cultivo, el tamaño de inóculo de la microalga utilizada y procesos de operación del sistema de tratamiento.

Dado esto se hace necesario aportar investigación adicional que coadyuve a la efectividad y eficacia en términos de sostenibilidad e innovación.

En este sentido, la finalidad de esta investigación es implementar procedimientos biotecnológicos e ingenieriles para el tratamiento de aguas residuales con la eliminación de fosfatos y nitratos de agua residual proveniente de la Estación Depuradora de Aguas Residuales EDAR “El Pueblo” mediante la obtención de inóculo de *Chlorella* sp. cultivada en un sistema de fotobiorreactores con columna de burbujeo como una alternativa a los métodos fisicoquímicos convencionales para el tratamiento de aguas residuales cuyos insumos e infraestructura son costosas, limitada accesibilidad y escasamente eficaces a la hora de remediar la carga de nutrientes que repercuten en la agudización de la eutroficación de los ecosistemas acuáticos utilizados como vertedero final.

1. Planteamiento del problema

Más del 80% de las aguas residuales en los países en vías de desarrollo se descargan sin tratamiento, contaminando ríos, lagos y zonas costeras (Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura [UNESCO], 2017). El impacto reside en las altas concentraciones de nutrientes, tales como el nitrógeno y el fósforo, dado que son los principales causantes de la eutrofización de los cuerpos de aguas donde son vertidas las aguas residuales sin tratamientos, alterando así la dinámica ecosistémica de los mismos: a través de la proliferación de comunidades de productores primarios, que atrofian los procesos de intercambio de oxígeno dentro del cuerpo de agua indispensables para su equilibrio, puesto que este fenómeno de eutrofización es uno de los procesos que mayor impacto produce en el deterioro de la calidad del agua (Chai et al., 2019).

Los sistemas de tratamiento de aguas residuales de los países de América Latina incumplen a nivel general lo requerido técnica y legalmente en materia ambiental, reflejado en la cantidad de agua contaminada y la poca infraestructura e inversión en estas plantas para su tratamiento (Lizarazo y Orjuela, 2013). En Colombia en áreas con menos de 30.000 habitantes, el 78% de la población no tiene acceso a tratamiento alguno de aguas residuales. Hasta el 2002 operaba una cantidad de plantas de tratamiento de aguas residuales correspondientes a: 38 en Cundinamarca, 26 en Antioquia, 14 en Cesar, 14 en Valle del Cauca, y 13 en Tolima. Existen plantas de tratamientos en estos territorios que no tratan siquiera el 8% de los vertimientos que se hacen a los alcantarillados, a consecuencia de deficiencias como poca capacidad, procesos incompletos o nula operación (Consejo Nacional de Política Económica y Social [CONPES], 2002).

A nivel local en la ciudad de Barranquilla, el sistema de alcantarillado sanitario según lo dispuesto en la Resolución No. 000580 de 2017, se encuentra dividido en dos vertientes

claramente definidas por las características topográficas del territorio: oriental y occidental. La vertiente oriental drena y conduce a través de diferentes cuencas a una estación de pretratamiento (que cuenta con unidades de operación física y/o mecánicas), y posteriormente son vertidas al río Magdalena a través de un emisario subfluvial, las cuencas que no alcanzan a llevar a las unidades de pretratamiento son vertidas sin la aplicación de dicho pretratamiento, al cuerpo de agua. Por su parte la vertiente occidental, está compuesta solo por dos grandes cuencas: la Noroccidental y la Suroccidental. Las aguas residuales de esta última cuenca son tratadas en un sistema de lagunas de estabilización antes de ser vertidas al cauce de la subcuenca Arroyo León- Hondo. En el caso de las aguas residuales de la cuenca Noroccidental se recogen en una estación de bombeo y son vertidas directamente al río Magdalena sin ningún tipo de tratamiento. La falta de un tratamiento eficiente y total de las aguas residuales en la ciudad de Barranquilla, se ve reflejado en el estado actual de los principales cuerpo de agua a donde finalmente emergen estos efluentes: el Río Magdalena presenta cantidades desmedidas de sedimentos, y alteración de la calidad del agua en diferentes tramos dentro de la jurisprudencia de Barranquilla (Escobar, Restrepo y Tosis, 2018), el Arroyo León según (Pino, 2005) es la subcuenca que presenta mayor grado de contaminación debido al afluente de aguas residuales además del drenaje urbano de Barranquilla, y la Ciénaga de Mallorquín donde desemboca esta subcuenca, en la cual se ha evidenciado la entrada de nutrientes inorgánicos (especialmente fósforo y nitrógeno) en magnitudes altas, que ha ocasionado eutrofización avanzada en el cuerpo de agua que impiden su desarrollo socioambiental, económico y limnológico.

Dentro del contexto global y local existe un problema significativo de saneamiento, a razón de los vertimientos de aguas residuales municipales no tratadas a cuerpos de aguas importantes para la dinamización y desarrollo sostenible de los territorios, así como también es trascendente

la generación de nuevos conocimientos y avanzar en materia de alternativas tecnológicas que sean accesibles, eficientes y sostenibles en el tiempo para aguas residuales municipales con altas concentraciones de nutrientes que suponen aumentos en los casos de eutrofización en cuerpos de agua ¿se constituye la obtención del tamaño de inóculo de *Chlorella* sp., como un procedimiento eficiente para la eliminación de fosfatos y nitratos en un sistema de fotobiorreactores verticales con columna de burbujeo a escala piloto de aguas residuales municipales de Barranquilla provenientes de la EDAR “El Pueblo” que permita el aumento de la accesibilidad al saneamiento en el territorio local?

2. Justificación

Actualmente, la desmedida proliferación de las poblaciones de fitoplancton en los ecosistemas acuáticos se constituye como uno de los principales efectos de la contaminación por nutrientes disueltos en los vertidos de aguas residuales sin tratamiento previo (Urrutia, 2014). Este fenómeno, conocido como eutrofización es recurrente en los sistemas acuáticos a escala global, motivo por el cual está concebido como uno de los principales temas de investigación en el campo académico, gubernamental y privado. Un factor determinante de esta problemática está asociada a la superpoblación del planeta que impacta los principales compartimentos de la biosfera (Trejo, 2015). Según el informe mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los recursos Hídricos “la población urbana pasó de 314 millones en 1990 a casi 496 millones en la actualidad y se espera que alcance para el 2050 los 674 millones” lo que lleva a un aumento de los servicios de abastecimiento de agua y de saneamiento pero con un déficit de la población al acceso a instalaciones de saneamiento mejoradas (Programa Mundial de Evaluación de los Recursos Hídricos de las Naciones Unidas [WWAP], 2017).

La legislación colombiana no ha establecido límites máximos permisibles de nutrientes para vertimientos de aguas residuales vertidas por prestadores de servicios públicos de alcantarillado por medio de conducción de desagüe, sin embargo, la Resolución No. 0883 de 2018 estipula que las aguas residuales de soluciones individuales, de saneamiento de viviendas unifamiliares o bifamiliares y de actividades industriales, comerciales o de servicios, no deben superar los 0.4 mg/L de fósforo total y 0.1 mg/L de nitratos (Resolución No. 0883, 2018, art. 8).

Para dar cumplimiento a la normativa y como medida de mitigación a los impactos causados por el vertimiento de aguas residuales municipales sin tratamiento previo, existen tratamientos químicos y físicos de tipo terciario, enfocado principalmente en la remoción de nutrientes. Sin

embargo, estas tecnologías presentan restricciones impuestas por los elevados costos de construcción, operación y mantenimiento, así como la necesidad de contar con recurso humano calificado (UNESCO, 2017).

Actualmente la apuesta a procesos biotecnológicos e ingenieriles para el tratamiento de aguas residuales son considerados eficaces y sostenibles porque combinan enfoques disciplinarios que permiten obtener ventajas significativas frente a la reducción de nutrientes responsables de la eutroficación. El uso de cultivo de microalgas en sistemas de reactores resulta una tecnología atractiva para el tratamiento de aguas residuales municipales e industriales debido a que estos organismos poseen una plasticidad metabólica que aunado a factores de operación de sistemas de reactores son capaces de reducir significativamente concentraciones de nutrientes ligados a eventos de eutroficación. Entre las ventajas comparativas y competitivas del uso de reactores con cultivos de microalgas están que los residuos de biomasa microalgal pueda destinarse para otras aplicaciones (por ejemplo, producción de biocombustible, fertilizantes, suplemento alimenticio en acuicultura, entre otros) o restablecimiento ecológico de ecosistemas acuáticos perturbados (Ávila, 2015). En otro sentido, Colombia es considerado un país megadiverso que promete un panorama de potencialidad de la bioprospección como estrategia para el desarrollo de tecnologías soportadas con el uso de microorganismos como las microalgas cuyas características biológicas han demostrado que son un potencial para la remoción de nutrientes de aguas residuales domésticas (Ávila, Laos y Verano, 2018; Bernal, 2018; Duarte, 2011).

No obstante, la consolidación de esfuerzos relacionados con la implementación de procesos de bioprospección presenta limitaciones desde diversos enfoques que impiden que se desarrollen procedimientos o generen productos sostenibles en el tiempo debido a la ausencia de integración de esfuerzos disciplinarios y a los débiles esfuerzos gubernamentales que apuesten al progreso de

los territorios nacionales (Caraballo, 2010). A la luz de lo expuesto, este proyecto de investigación representa un aporte al conocimiento de procesos de bioprospección con miras a generar soluciones o mejoras a los procesos de saneamiento ambiental del recurso hídrico dado a la combinación del uso de un inóculo óptimo de una cepa autóctona de *Chlorella* sp. cultivada en un sistema de fotobiorreactores verticales con columna de burbujeo a escala piloto con el fin de prevenir y mitigar el impacto del vertimiento de aguas residuales relacionados con la eutroficación de cuerpos de aguas de importancia económica, social y ambiental de la región Caribe.

3. Objetivos

3.1 General

Establecer la capacidad de remoción de fosfatos y nitratos en aguas residuales utilizando un cultivo de *Chlorella* sp. en un sistema de fotobiorreactores verticales con columna de burbujeo a escala piloto.

3.2 Específicos

- ✓ Determinar el tamaño de inóculo inicial de una cepa autóctona de *Chlorella* sp. para su uso en la remoción de NO_3^- y PO_4^{3-} en un sistema de fotobiorreactores verticales con columna de burbujeo.
- ✓ Evaluar la capacidad de remoción de NO_3^- y PO_4^{3-} de aguas residuales de la EDAR “El Pueblo” (Barranquilla) en cultivos discontinuos de *Chlorella* sp. en condiciones outdoor.
- ✓ Evaluar la remoción de NO_3^- y PO_4^{3-} del inóculo escogido de *Chlorella* sp. en relación con los parámetros de operación de un sistema de fotobiorreactores verticales con columna de burbujeo a escala piloto.

4. Marco teórico y estado del arte

4.1 Antecedentes

El desarrollo industrial y el crecimiento insostenible de la población han aumentado la necesidad de garantizar una gestión integrada de los recursos hídricos, como un requisito para la preservación del medio ambiente y para el desarrollo económico (Mohd, 2008). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), 2 millones de toneladas de aguas residuales (industrial, agrícola y doméstica) se generan, sin tratamiento previo, se han descargado al medio ambiente, causando un impacto negativo relacionado con la descomposición de alta carga orgánica e inorgánica, que genera productos tóxicos durante el proceso de peroxidación lipídica (Abass, Abdul, Alam, Jameel y Muyubi, 2011). Estos peróxidos causan daño celular en animales, además, este proceso podría extenderse desagradables olores y microorganismos en el aire, los estudios sugieren efectos adversos para la salud de exposición a bioaerosol que afecta la salud de las comunidades cercanas, constituyendo un problema de salud pública (Agudelo et al., 2018; Arrieta et al., 2018; Carvajal et al., 2020; Lemus, 2003; Van Der Walle, 1927). El continuo deterioro del medio ambiente debido a la incorporación de contaminantes de origen antropogénico, a los sistemas acuáticos, tiene un impacto negativo directo en la calidad del agua. Una de las principales fuentes de contaminación de los cuerpos de agua han sido las aguas residuales municipales. En este sentido, el aumento de la urbanización y la expansión de la población urbana han dado lugar a una mayor cantidad de aguas residuales municipales (Arbib, García y Perales, 2015). En muchos países de Latinoamérica, ha sido a través del tiempo una práctica común descargar aguas residuales sin tratamiento a los cuerpos de aguas más cercanos. Con frecuencia se ha generado una mínima consideración con las consecuencias ambientales de dicha práctica, por la falta de recursos económicos, como también por falta de conocimiento

(Aguirre, Chalarca y Mejía, 2007). En consecuencia, el tratamiento de aguas residuales es un proceso que se ha vuelto indispensable en el saneamiento integral de un asentamiento humano que tiene como objetivo evitar afectaciones a la salud pública y preservar la calidad ambiental de los cuerpos acuáticos receptores (Cabrera y Pulla, 2014).

El tratamiento convencional de aguas residuales consiste normalmente en un tratamiento primario y secundario que elimina el material sedimentado y oxida la materia (Cabrera y Pulla, 2014). En busca de nuevas alternativas surgen los tratamientos biológicos de las aguas residuales que inician durante el siglo XIX de forma empírica cuando se observa que concentrando microorganismos descomponedores de materia orgánica bajo condiciones controladas, en unidades que hoy se conocen como reactores, se logra la reducción de la contaminación de un medio con aguas residual en un corto tiempo. Entre 1912 y 1980 los métodos y tecnologías de tratamientos biológicos fueron mejorados y adaptados a las nuevas necesidades técnicas, entre estos los lodos activados, la aireación extendida, los zanjones de oxidación, las lagunas de estabilización, los filtros percoladores, los biodiscos rotatorios, entre otros (Orozco, 2014).

Los sistemas convencionales de tratamiento de aguas residuales municipales no fueron diseñados inicialmente para eliminar los compuestos inorgánicos como el nitrógeno y el fósforo (Álvarez et al., 2011). Frente a esto el uso de microalgas para la eliminación de nitrógeno y fosforo se ha convertido en una alternativa potencial respecto a las tecnologías biológicas convencionales, por su capacidad para eliminar nutrientes de manera eficiente. Estudios como los de Álvarez et al. (2013) han demostrado que en un fotobiorreactor con microalgas se logran eficacias superiores a 90% en remoción de nitrógeno y fosforo de aguas residuales. Esta alternativa representa a su vez una opción sostenible, pues la biomasa microalgal producida en el proceso es susceptible de convertirse en materia prima para la producción de variedades de

combustibles biológicos tales como el biogás, biodiesel o biohidrógeno. Se ha demostrado que dicha biomasa microalgal puede reciclarse para la producción de fertilizantes con importantes beneficios ambientales y económicos (Dawson y Hilton, 2011). A su vez se ha comprobado que los cultivos de microalgas alimentados con aguas residuales domésticas contribuyen a la reducción de gases de efecto invernadero emitidos a la atmósfera, a través del proceso de fotosíntesis que estas realizan donde reducen el CO₂ a glúcidos y liberan O₂ a la atmósfera (Arbib et al., 2015).

Los primeros estudios sobre la posibilidad de utilizar las microalgas como microorganismos “purificadores de aguas residuales” fue en la época de Cadwell en 1940 (Salazar, 2015). Entre los años 1965 y 1980 se comprobó que las microalgas podían jugar un papel importante en la transformación de la materia orgánica de las aguas residuales en biomasa y agua tratada (Colorado, Moreno y Pérez, 2013). A partir de ahí se fueron desarrollando nuevas alternativas para hacer cada vez más eficiente el proceso de remoción de nutrientes y tratamiento en general de aguas residuales a través de las microalgas:

Los autores Andrade, Araujo, Cárdenas, Chacón y Morales (2004) evaluaron el uso de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp., para la remoción de N-NH₄⁺, P-PO₄ y DQO de las aguas residuales del sistema de estabilización de la Universidad del Zulia en Venezuela. Los experimentos se realizaron con un volumen de 200mL de agua residual esterilizada y no esterilizada, con relación a un control con agua destilada y medio de cultivo algal. Los bioensayos se mantuvieron sin aireación durante 27 días. Encontrando una remoción total de N-NH₄⁺ al final del experimento, en todos los cultivos con agua residual. La remoción máxima de P-PO₄ fue por parte del *Chlorella* sp. alcanzó un porcentaje del 48.7% en agua esterilizada.

Chen et al., (2010) estudiaron la capacidad de crecimiento del alga verde *Chlorella* sp. en aguas residuales captadas en cuatro puntos diferentes de una planta de tratamiento de agua residual municipal convencional (antes del tratamiento primario, después del tratamiento primario, después de la unidad de lodos activos, y del efluente que emerge al final de la planta, es decir el agua residual tratada). Logrando determinar diferentes tasas de crecimiento específicas para porcentajes de eliminación de $\text{NH}_4\text{-N}$ de las muestras tomadas correspondientes a 8.2%, 74.7%, y 78.3%.

En el estudio realizado por Lan y Wang (2011) determinaron la producción de biomasa y remoción de nutrientes de aguas residuales urbanas posterior a su tratamiento secundario mediante un cultivo de *Neochloris oleoabundans* obteniendo como resultado una concentración de biomasa de 2100 mg/L y una eliminación de nutrientes total de 218 mg N-NO_3 /L y 47 mg PO_4 /L

Los autores Álvarez, López y Vásquez (2016) a través del uso de fotobiorreactores evalúan el tratamiento de aguas residuales en Torreón, México. Utilizando cuatro biorreactores piramidales en lote, con capacidad de 208.5 L, cada uno para el tratamiento del agua residual. Bajo un diseño experimental totalmente al azar se implementaron tres muestras de aguas residuales, con un control con variaciones entre el porcentaje de agua residual y la cantidad de inóculo de microalgas al 20%, cada muestra con tres repeticiones. Logrando una alta remoción de nitrógeno y fósforo entre 73.7% y 89.5%. Además del alto rango de remoción de nutrientes del consorcio microalga estudiado por dichos autores, su investigación representó ventajas significativas frente a otros tratamientos de aguas residuales de lagunas tradicionales convencionales, puesto que en cuatro días y con menor área de lagunas, se obtuvieron efluentes con calidad que dichos sistemas convencionales logran producir a mayor costo operativo.

Los autores Ávila et al. (2018) determinaron la capacidad de remoción de nitratos y fosfatos en aguas residuales municipales por cultivos libres e inmovilizados de *Chlorella* sp. y *Chlamydomonas* sp. nativas de dichas aguas. Los experimentos se realizaron con los efluentes residuales estériles de dicha planta durante 10 días, reportando un porcentaje de remoción de nitratos del 83.69% con *Chlorella* sp. y 75.08% con *Chlamydomonas* sp.

A pesar de que la mayoría de las fuentes bibliográficas consultadas sostienen que no existe un acuerdo claro sobre la ubicación más adecuada del sistema de microalgas dentro del diagrama de flujo de una planta de tratamiento de aguas residuales (Arbib et al., 2015). Autores como Salazar (2005) y Ruiz (2011) sostienen que las microalgas utilizadas en el tratamiento de aguas residuales pueden ser consideradas como una alternativa de tratamiento terciario, debido que existe un proceso acoplado entre bacterias (quienes realizan la degradación de la materia orgánica) y microalgas (quienes fijan los compuestos inorgánicos), permitiendo un tratamiento de las aguas residual más eficiente e integral, que no se obtiene con los sistemas de tratamientos de aguas residuales convencionales.

4.2 Marco conceptual

4.2.1 Generalidades de la especie *Chlorella* Sp

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos procarióticos o eucarióticos, pueden crecer rápidamente y vivir en condiciones adversas debido a su simple morfología. Las microalgas procariotas se conocen como cianobacterias (Cyanophyceae), y las eucariotas incluyen algas verdes (Chlorophyta), diatomeas (Bacillariophyta), entre otros grupos (Caetano, Mata y Martins, 2010). Estas representan fuentes de biomoléculas y metabolitos de gran importancia económica, además constituyen una fuente directa de alimento, medicamentos,

forraje, fertilizantes y combustible, e incluso, como indicadores de contaminación (Colorado et al., 2013).

En el caso de la *Chlorella* sp, se define según Ramírez, Rendón y Vélez (2015) como una microalga eucariota, de una sola célula verde y forma esférica con diámetro entre 2 a 10 μm , sin flagelos (ver figura 1). Es una microalga de la división Chlorophyta, orden *Chlorococcales*. Esta microalga contiene 53% de proteínas, 23% de carbohidratos, 9% de grasa y 5% de minerales. También contiene más del 2% de clorofila, lo que le permite crecer rápidamente porque, al igual que las plantas superiores, su metabolismo principal es la fotosíntesis, donde la fuente principal de energía es la luz solar y azúcares que la microalga emplea para producir distintas sustancias como celulosa que conforma su estructura, aceites, entre otros (Larroche, Pandey y Soccol, 2013), que en combinación con el CO_2 atmosférico y el agua, produce oxígeno que se libera a la atmósfera. Estas cuentan con una tasa de multiplicación muy elevada por tanto son capaces de absorber y almacenar una gran cantidad de energía del sol (Ramírez et al., 2015).

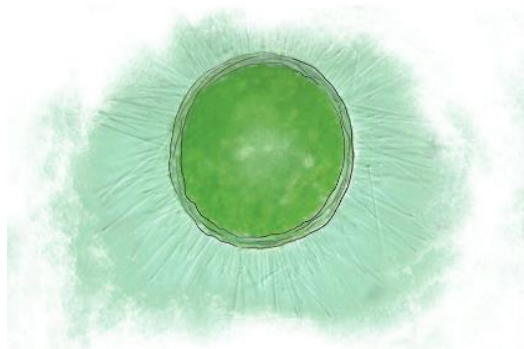


Figura 1. Ilustración de la célula *Chlorella* Sp. Adaptado de “*Microalgas para la industria alimenticia*”, por Ramírez et al., 2015

Según los autores Choi, Lee, Park, Sung y Shin (1999), *Chlorella* tiene una tasa de crecimiento específico constante a valores de pH superiores a 4.2, y por lo tanto crece fácilmente en tanques y lagos. Además, una de las grandes ventajas de *Chlorella* en comparación con las otras microalgas es su alta tolerancia a la temperatura y la concentración de CO₂, al tiempo que mantiene el crecimiento a temperaturas que oscilan entre 35°C a 42°C y porcentaje de CO₂ entre 25% a 40% (Chihara, Karube, Kishimoto, Sakai y Sakamoto, 1995).

4.2.2 Técnica de aislamiento: Rayado de placas de agar

Algunas especies de microalgas se pueden aislar mediante la técnica de rayado en estrías en una caja de Petri con agar. Según Andersen y Kawachi (2005) no todas las especies se pueden mantener en medio sólido, especialmente especies flageladas y algunas diatomeas, pero esta técnica suele dar buenos resultados con especies bentónicas, clorofitas, cocoidales y cianofitas.

Esta técnica consiste en preparar el medio de cultivo apropiado con una concentración de agar adicionado entre 0.8 y 2 %. Se esteriliza en autoclave a 120°C y 1.1 kg/cm² de presión durante 15 min. Posteriormente, se deja a temperatura ambiente y antes que se solidifique se agrega en cajas de Petri estériles. Se colocan una o dos gotas del medio con los microorganismos que se quiere estudiar, en las cajas con medio sólido, que se esparcen con un asa para bacteriología o con una varilla de vidrio doblada, previamente esterilizadas. La caja se cubre con su tapa, se invierte, se sella con papel Parafilm y se coloca en un ambiente con temperatura y luz controladas; se incuba durante 4 a 8 días y posteriormente se observa al microscopio invertido y/o estereoscopio, y con la ayuda del asa se seleccionan las colonias libres de otros microorganismos, que se transfieren a otra caja de Petri. Con frecuencia es difícil obtener cultivos monoalgales debido a la contaminación con otras algas como cianofitas o diatomeas (Arce, Arredondo, Gómez, Voltolina y Zenteno, 2017).

4.2.3 Medios de cultivo: Medio Basal Bold

Los medios de cultivo pueden ser naturales o sintéticos. Los medios naturales están preparados con agua enriquecida con sales minerales. Los medios sintéticos se preparan con agua destilada, sales minerales y se adicionan los componentes naturales del agua de mar o del agua dulce (Alfonso y Leal, 1998).

Según Cervera (2011) para las microalgas un medio de cultivo puede ser definido como un ambiente artificial donde dichos microorganismos crecen, y debe ser semejante al ambiente donde se desarrolla naturalmente. Para la microalga *Chlorella* se recomienda el "Medio Basal de Bold" (Silva, 2015), o "Solución de Bristol", el cual se compone de una solución stock de macronutrientes y cuatro de micronutrientes, su pH óptimo es de 6,6 (Ruiz y Tovar, 2016).

4.2.4 Compuestos inorgánicos de aguas residuales municipales: nitratos y fosfatos

El agua residual cuenta con características físicas, químicas y biológicas. Dentro de las físicas se encuentran los sólidos, los cuales pueden ser inorgánico como el nitrógeno, fósforo, carbonatos, cloruros, sulfatos y sustancias tóxicas. Las sustancias orgánicas constituyen compuestos nitrogenados como las proteínas, ureas, aminas y aminoácidos, y no nitrogenados como la celulosa, grasas y jabones. Las propiedades químicas del agua residual están definidas por la naturaleza química de la materia orgánica, los compuestos inorgánicos y gaseosos.

Respecto a las características biológicas las aguas residuales pueden albergar una biota amplia de microorganismos (bacterias, microalgas, protozoos, virus, etc.) responsables de los ciclos biogeoquímicos que influyen en la transformación y concentración de elementos como el azufre, carbono, nitrógeno y fósforo (Bernal, 2018).

En el agua los nutrientes son sustancias esenciales para el metabolismo de todo organismo vivo ya que forman parte de él, son determinantes en el inicio de la cadena alimenticia acuática

porque estimulan el crecimiento del fitoplancton y posteriormente el desarrollo de peces y crustáceos (Atlas y Bartha, 2008). Sin embargo, cuando se presentan en exceso ocasionan problemas de contaminación acuática (Ramírez y Roldan, 2008). Uno de estos nutrientes esenciales es el nitrógeno, principalmente para el crecimiento de protistas y plantas, la formas en las que este se encuentra en las aguas residuales es como nitrógeno orgánico, nitrógeno amoniacal, nitrógeno de nitritos y nitratos. Sin embargo, en aguas residuales domesticas frescas la forma en que este nutriente predomina es en nitrógeno orgánico; las bacterias suelen descomponerlo rápidamente en nitrógeno amoniacal, y dado el caso en el que el medio sea aerobio, lo hacen en nitritos y nitratos. En este tipo de aguas residuales la concentración de nitrógeno total puede oscilar de 30 a 100 mg/L, la concentración de nitritos y nitratos menor de 1 mg/L, aunque en aguas residuales tratadas puede ser hasta de 30 mg/L. Otro de estos nutrientes vitales es el fosforo, que en sus formas usuales se encuentran como ortofosfatos, polifosfatos, y fosfatos orgánicos. Los ortofosfatos son aptos para el metabolismo biológico, los polifosfatos se hidrolizan lentamente y revierten a las formas de ortofosfatos. En las aguas residuales sus concentraciones oscilan entre 6 y 20 mg/L (Romero, 2004).

Las actividades humanas han generado niveles cada vez mayores de contaminación en los cuerpos de agua. A través del tiempo los contaminantes que con mayor interés se ha pretendido remover del agua son los sólidos, por el efecto que ejerce sobre la apariencia del agua, la materia orgánica por el alto consumo de oxígeno necesario para su estabilización, y los microorganismos por la posible transmisión de agentes patógenos que posteriormente pueden generar enfermedades. Sin embargo, nutrientes como el nitrógeno y el fósforo generan impactos negativos significativos sobre los cuerpos de agua ya que pueden incidir en el equilibrio de los ecosistemas acuáticos, la eutrofización y la incorporación de niveles tóxicos que pueden afectar a

las comunidades biológicas y a la salud humana, incluso en muy bajas concentraciones (Cárdenas y Sánchez, 2013).

4.2.5 Manejo y vertimientos de aguas residuales municipales en Barranquilla, Atlántico

Según lo estipulado en la Resolución No. 000580 de 2017, el sistema de recolección, transporte, disposición y tratamiento de aguas residuales de Barranquilla, se encuentra dividida topográficamente por dos grandes vertientes: la Oriental y la Occidental.

La vertiente oriental, drena y conduce las aguas al río Magdalena, provenientes de las cuencas: Simón Bolívar, El Ferry, La Luz, La Chinita, Zona 1, Zona 2, Barranquillita, Felicidad, Country, Calle 79, Calle 85 y Las Flores. Parte de estas aguas son bombeadas a la estación de Pretratamiento Avanzado “Barranquillita”, conformado por una serie de operaciones físicas y/o mecánicas con el fin de separar las aguas residuales de materiales flotantes y arenas. Finalmente, las aguas pretratadas son vertidas al río Magdalena a través de una conducción con diámetro de 2000mm en GRP (poliéster reforzado con fibra de vidrio) y un emisario subfluvial de 400m de longitud y 2000mm de PEAD (polietileno de alta densidad). El resto de las cuencas a las que se vierten aguas residuales están evacuadas directamente al río sin tratamiento (Resolución No. 000580, 2017).

La vertiente occidental se subdivide en noroccidental y suroccidental, esta última drena las aguas al sistema lagunar costero –Ciénega de Mallorquín- y son previamente tratadas por un sistema de lagunas de estabilización, antes de ser vertidas al Arroyo León. La cuenta noroccidental antes de ser vertida al río Magdalena es recogida en la estación de bombeo de Mallorquín (Resolución No. 000580, 2017).

La figura 2 evidencia la geolocalización de los puntos de vertimientos puntuales realizados por la empresa prestadora de servicio de saneamiento y los cuerpos de agua receptores.

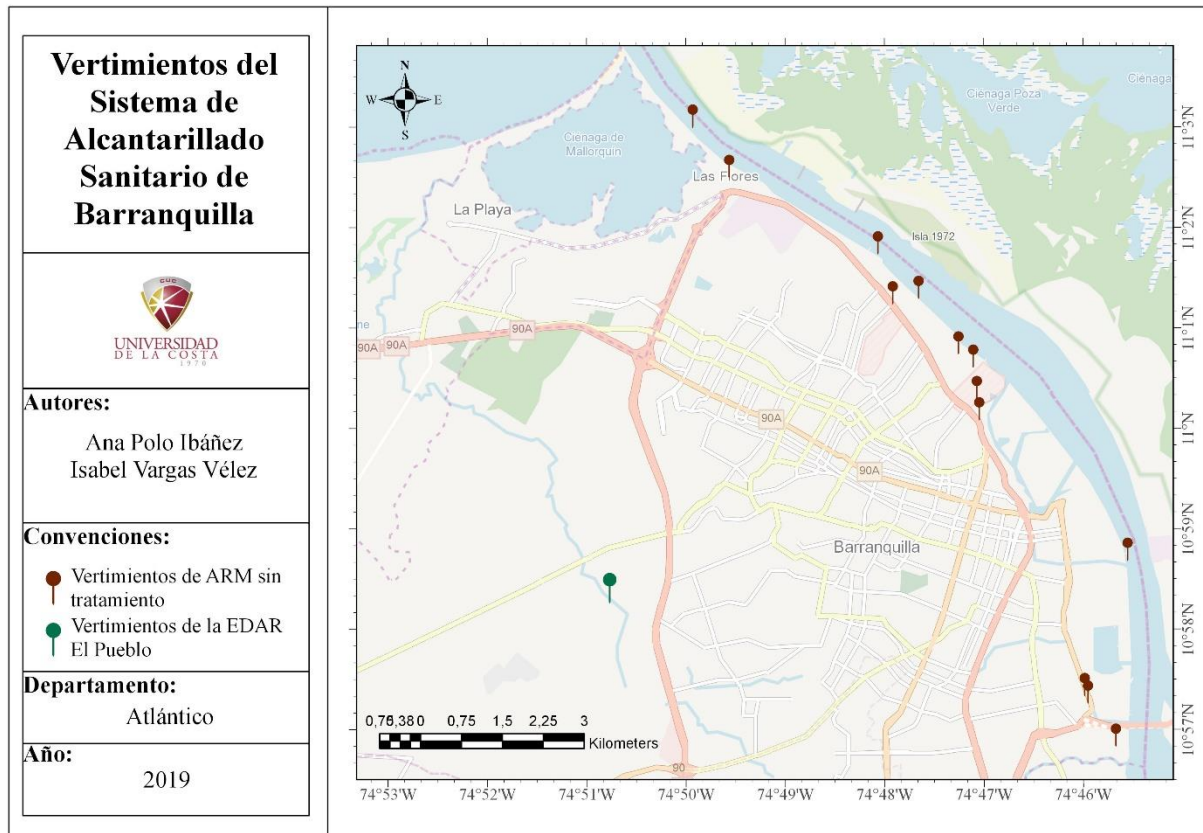


Figura 2. Georreferenciación de puntos de vertimientos puntuales de aguas residuales realizados por la empresa prestadora del servicio de saneamiento. Fuente: Autores

4.2.6 Tratamiento de aguas residuales municipales con Microalgas

El tratamiento convencional de aguas residuales está basado en procesos aeróbicos y anaeróbicos continuos que transforman los contaminantes presentes en las aguas residuales en compuestos inertes que permiten la eliminación segura o la reutilización del agua que ha sido tratada. Dicho proceso convencional proporciona niveles satisfactorios de eliminación de carbono, nitrógeno y fósforo, pero a expensas de altos consumos de energía. Adicionalmente, los

tratamientos convencionales de aguas residuales son complejos y requieren personal calificado para su gestión adecuada. Así como también se evidencia un impacto ambiental negativo significativo debido a las emisiones de gases de efecto invernadero que genera la operación de las unidades donde se desarrollan dichos tratamientos (Acién, Fernández, Gómez, Molina y Morales, 2016).

El tratamiento con microalgas (actualmente conocido como micro remediación) en aguas residuales es atractivo, por las capacidades fotosintéticas que estos microorganismos tienen, la de convertir energía solar en biomasa útil de altos valores caloríficos y procesar nutrientes como el nitrógeno y el fósforo (Agarwal, Agarwal y Gupta, 2019), que al presentarse en exceso en los cuerpos de agua como lagos, embalses, estuarios ríos, y ciertas aguas costeras causan un gran aumento de las algas y una disminución del oxígeno disuelto, lo que provoca el deterioro de la calidad del agua, la muerte de muchos organismos acuáticos como peces u otros hidrofitos; a este fenómeno se le conoce como eutrofización (Liu et al., 2013). Según Olguín (2012) el uso de microalgas para el tratamiento de aguas residuales reduce el consumo de energía significativamente, al mismo tiempo el reciclaje del nitrógeno y fósforo presenta beneficios ambientales sustanciales. Estos se derivan de evitar el uso de fuentes minerales en el proceso de producción de microalgas y el agotamiento de los reservorios de fósforos, pero asegurando que se producen grandes cantidades de biomasa valiosa.

El éxito del tratamiento de aguas residuales con microalgas está dado por la combinación sinérgica de factores abióticos (temperatura, luz, pH, oxígeno, dióxido de carbono y salinidad), factores bióticos como la competencia entre patógenos y factores operacionales tales como la tasa de dilución del inóculo de microalga a utilizar, tipo de mezcla, profundidad y frecuencia de cosechado (Abdel, Al y Ibraheem, 2012). Así como también es de vital importancia, la selección

del tipo de microalga que se pretende utilizar para el tratamiento de aguas residuales (Ramírez et al., 2015). Entre las microalgas idóneas para tales fines se reportan *Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp., y *Botryococcus* sp. En el caso de la clorofita *Chlorella* sp., Chen et al. (2010) reportan porcentajes de remoción de nitrógeno (82.40%) y fosforo (83.20%) en el tratamiento de aguas residuales domésticas.

4.2.7 Tipos de cultivos de microalgas: continuo y discontinuo

El método empleado en el cultivo según la forma de manejar la biomasa se clasifica en cultivo discontinuo, continuo y semicontinuo. El cultivo continuo es aquel en el que se mantiene la fase exponencial durante un largo periodo de tiempo, y las características químicas y físicas del medio son sostenidas en un valor constante. En el cultivo discontinuo o por lotes, la población va pasando por las distintas fases de crecimiento, ajustándose generalmente a una función logística, produciéndose cambios fisiológicos de la población a medida que transcurre el tiempo de cultivo. Por su parte, el cultivo semicontinuo es la combinación de los dos métodos anteriores. En este tipo de cultivo, parte del volumen se recoge para su utilización, generalmente al final de la fase exponencial, y la cantidad que se retira se reemplaza con medio de cultivo fresco (Doran, 2013).

La ventaja de los cultivos en continuo es que las muestras tomadas a distintos tiempos son idénticas. Por lo tanto, hay que añadir continuamente nutrientes en la misma medida que son retirados del medio, para mantener los parámetros de crecimiento y población celular a nivel constante. La de los cultivos en discontinuo, es que son fáciles de manejar y son adecuados para estudiar las cinéticas de crecimiento y los parámetros que inciden en el crecimiento celular (Chirivella, García, García, Pavía y Serrano, 2017).

4.2.8 Tipos de sistemas de cultivo de microalgas

Principalmente hay dos tipos de sistemas de cultivo de microalgas, abiertos y cerrados. Los estanques abiertos en forma de carril (Raceway) y los Turf Scrubbers están entre los más populares de estos sistemas. Los sistemas cerrados, también llamados fotobiorreactores, se han desarrollado en diferentes tipos de acuerdo con su geometría, donde los más comunes son los tubulares, en formato columna de burbujas (Bubble Column), elevador de aire (Air Lift) y las pantallas planas (Flat Panel), (Blowers et al., 2012).

Los sistemas de fotobiorreactores tubulares típicamente están compuestos de una serie de tubos transparentes (generalmente fabricados en vidrio, acrílico, o fibra de vidrio de alta transparencia) expuestos a la radiación solar y construidos en diferentes formas, verticales, curvos-horizontales, planos inclinados o en espiral, con un diámetro relativamente pequeño para garantizar la alta productividad de biomasa (Lan, Horsman y Wang, 2012).

La orientación del reactor juega un papel muy importante en la eficiencia del mismo. Una orientación vertical (ver figura 3) es la mejor opción ya que por su disposición geométrica es capaz de tratar mayor volumen por área a diferencia de los reactores inclinados y horizontales que requieren mayor área para tratar el mismo volumen y que difícilmente se puede extender en altura (Ramírez et al., 2015).



Figura 3. Fotobiorreactor tubular en formato columna de burbujas. Adaptado de “5 – 600L Airlift Photobioreactor”, por Varicon Aqua, 2016.

4.2.9 Marco Legal

La legislación colombiana establece la siguiente normativa para manejo de los recursos hídricos y vertimientos:

- **Resolución 2115 de 2007**

El Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, señala las características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano. En el Artículo 6°, que menciona las características químicas de sustancias que tienen implicaciones sobre la salud humana, se establecen los valores máximos permisibles de nitritos y nitratos, 0.1 y 10 mg/L respectivamente, mientras que en el artículo 7° se menciona

el valor aceptable para la concentración de fosfatos en el agua para consumo humano (potable), siendo menor o igual a 0.5 mg/L de PO_4^{3-} (Resolución No. 2115, 2007).

- **Decreto 3930 de 2010**

La presidencia de la República reglamenta los usos del agua y residuos líquidos y se dictan otras disposiciones, específicamente en el capítulo IX se establece la reglamentación de vertimientos y en el capítulo X se define el proceso para el registro de los permisos de vertimientos (Decreto No. 3930, 2010).

- **Resolución 1207 del 2014**

El Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible adopta las disposiciones relacionadas con el uso de aguas residuales tratadas, indicando en el artículo 6 que pueden ser implementadas en diferentes actividades a nivel agrícola e industrial. En el artículo 7 se exponen los criterios de calidad del agua residual para los usos establecidos, relacionando los límites máximos permisibles respectivos (Resolución 1207, 2014).

- **Resolución 0631 de 2015**

El Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible establece los parámetros y los valores límites máximos permisibles en los vertimientos puntuales a cuerpos de aguas superficiales y a los sistemas de alcantarillado público. En el artículo 8, acerca de los vertimientos puntuales de aguas residuales (ARD y ARnD) de los prestadores del servicio público de alcantarillado a cuerpos de aguas superficiales, con una carga superior a los 3000 Kg/día de DBO_5 , se contempla el rango permisible del parámetro pH, 6.00 a 9.00, incluyendo el análisis y reporte de los parámetros fósforo total (P) y nitratos (N-NO_3^-), (Resolución No. 0631, 2015, art. 8).

- **Resolución 883 del 2018**

El Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible establece los parámetros y los valores límites máximos permisibles en los vertimientos puntuales a cuerpos de aguas marinas, actualizando los valores señalados en la Resolución No. 0631 de 2015. El Artículo 8 estipula que, los prestadores del servicio público de Alcantarillado deben presentar el análisis y reporte de los parámetros fósforo total (P) y nitratos (N-NO₃), sin contar con límites máximos definidos (Resolución No. 0883, 2018).

5. Metodología

5.1 Tipo de investigación

Este estudio corresponde a una investigación experimental (Lerma, 2016), llevada a cabo en condiciones semicontroladas de laboratorio, a través de un conjunto de ensayos que arrojaron los datos necesarios para dar respuesta a la pregunta problema. El estudio presentó un enfoque cuantitativo (Muñoz, 2015), dado a que las variables que permiten determinar la eficiencia de remoción del sistema adoptan valores numéricos de tipo continuo, tales como: densidad celular, concentración de fosfatos, nitratos, pigmentos, y pH.

El alcance del proyecto está definido para los sistemas de tratamiento terciario de aguas residuales municipales, especializados en la remoción de fosfatos y nitratos.

5.2 Lugar de estudio

Este estudio se realizó en el área de tratamiento de aguas residuales del Centro de Investigaciones Tecnológicas Ambientales (CITA) de la Corporación Universidad de la Costa (ver figura 4) ubicada a $10^{\circ} 59' 43.594''$ de latitud Norte y a $74^{\circ} 47' 24.729''$ de latitud Oeste, en Barranquilla, Atlántico. Las pruebas de remoción de nutrientes en condiciones outdoor coincidió con la época seca de la ciudad la cual presenta condiciones climáticas que alcanzan temperaturas máximas entre 28.9 y 30°C y temperaturas mínimas entre 25.1°C y 26°C , radiación ultravioleta media entre 5 y 8 IUUV, irradiación global horizontal media diaria entre 5 y 6 kWh/m^2 (Acosta, Ramírez y Vélez, 2017; IDEAM, 2014).



Figura 4. Identificación geográfica del lugar de estudio a tres escalas: nacional, regional y local. Fuente: Autores.

5.3 Población y muestra

La población del material biológico experimental estuvo representada por células de *Chlorella* sp., aisladas de cultivos stock del laboratorio de microbiología del CITA (Ver figura 5). Fueron cultivadas mono específicamente mediante técnicas de cultivos discontinuos, es decir que no hay adición de nutrientes posterior a la inoculación (Böczelt et al., 2012; Verdugo, 2016), y depositadas en frascos de vidrio estéril bajo condiciones semicontroladas de laboratorio. Este género fue seleccionado por su capacidad de adaptación, generación de biomasa aprovechable y resistencia (Forero, Melgarejo, Montenegro y Pinilla, 2016).



Figura 5. Cepa proporcionada por el centro de investigación CITA. Fuente: Autores

5.4 Diseño de investigación y experimental

Se definieron tres fases experimentales para dar cumplimiento a los objetivos planteados inicialmente. La primera consistió en establecer el acondicionamiento de la microalga *Chlorella* sp. para su uso en la remoción de NO_3^- y PO_4^{3-} en un sistema de fotobiorreactores verticales con columna de burbujeo. En la segunda se evaluó la capacidad de remoción de concentración de NO_3^- y PO_4^{3-} de aguas residuales de la EDAR “El Pueblo” (Barranquilla) en cultivos discontinuos de *Chlorella* sp. en condiciones outdoor. En la tercera se evaluaron la capacidad de remoción de NO_3^- y PO_4^{3-} del inóculo inicial escogido de *Chlorella* sp. en relación con los parámetros de operación de un sistema de fotobiorreactores verticales con columna de burbujeo a escala piloto.

Los ensayos experimentales de la fase 1 y 2, se desarrollaron en Erlenmeyers de 500 mL rotulados adecuadamente, sellados con tapones de algodón y gasa, con aireación constante suministrada a través de mangueras de 6 mm de diámetro a cada unidad por una bomba dosificadora de aire Sweetwater Ecosystem de 0.85 psi, bajo condiciones exteriores (ver figura 6).



Figura 6. Unidades experimentales de las fases 1 y 2 en condiciones exteriores. Fuente: Autores

La cepa de *Chlorella* sp. utilizada en los bioensayos de las fases 1 y 2 se aisló mediante el método de rayado en agar y diluciones seriadas hasta obtener un cultivo monoespecífico. Posteriormente esta cepa se sometió a un proceso de adaptación con agua residual domestica municipal proveniente de la EDAR “El Pueblo”. El diseño experimental de ambos ensayos consistió en tres tratamientos, con tres replicas y un testigo respectivamente:

Tratamiento 1 (T1): Agua residual municipal proveniente de la EDAR “El pueblo” al 100% + inculo de *Chlorella* sp.

Tratamiento 2 (T2): Agua residual municipal proveniente de la EDAR “El pueblo” al 75% + inculo de *Chlorella* sp.

Tratamiento 3 (T3): Agua residual municipal proveniente de la EDAR “El pueblo” al 50% + inculo de *Chlorella* sp.

Se consideraron las variaciones mencionadas en los diferentes tratamientos teniendo en cuenta que las aguas residuales municipales generadas diariamente en el territorio evaluado, presentan características fisicoquímicas variables que se deben tener en cuenta en el diseño de

los sistemas de tratamiento para las mismas, así como también se debe tener en cuenta las dinámicas de los territorios que generan el aumento de las concentraciones de contaminantes y su caudal, como las poblaciones flotantes (Aguilar, 2018; Cuatis, 2018; Vargas, 2016).

El diseño experimental usado en la investigación fue de tipo factorial. Este tipo de diseño es altamente eficiente para conocer los efectos producidos por diferentes factores, la interrelación entre factores y la relación con factores principales (De la Vara y Gutiérrez, 2012). Por su potencia y sencillez, este tipo de diseño experimental posee un campo de aplicación significativamente amplio (Mandeville, 2012). Lo cual ha desencadenado que varios estudios similares a este como los de Ávila et al. (2018) y Meza, Ortiz y Romero (2018), lo adapten en el desarrollo de sus experimentos.

La figura 7 representa la relación entre las etapas experimentales llevadas a cabo para el desarrollo de la investigación.

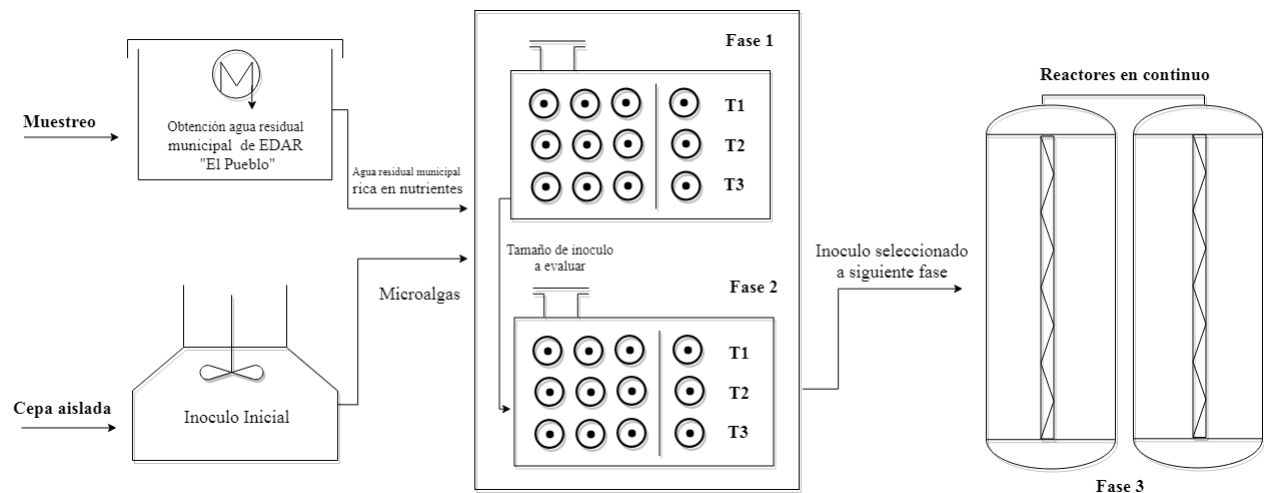


Figura 7. Esquema general del diseño experimental de la investigación. Fuente: Autores

5.4.1. Consideraciones técnicas para la determinación del tamaño de inóculo óptimo de *Chlorella* sp. usado en un sistema de fotobiorreactores verticales con columna de burbujeo a escala piloto

5.4.1.1 Preparación del cultivo 'stock'

Para la obtención de cultivos monoespecíficos se utilizó la técnica Rayado en Placas de Agar. Inicialmente, se preparó el medio de cultivo agar-agar a una concentración de 25.3g/L, se esterilizó y se vertió en cajas de Petri de 100 x 15 mm. Una vez solidificado a temperatura ambiente, se adicionaron 2 gotas del cultivo provenientes de viales y mediante asa de siembra se esparcieron formando estrías en la superficie del medio (ver figura 8). Este procedimiento se realizó con mechero de Bunsen encendido para evitar contaminación cruzada. Cada caja sembrada fue sellada con papel Parafilm y ubicada de forma invertida cerca de una fuente de luz natural durante 8 días (Arce et al., 2017).



Figura 8. Rayado en placas de Agar para obtención de cultivo monoespecífico. Fuente: Autores

Paralelamente se preparó el medio de cultivo Basal de Bold (MBB) debido a que su composición es rica en concentraciones de nutrientes que simulan las requeridas para el

crecimiento de la cepa en estudio en su medio natural, facilitando así su adaptación y el crecimiento poblacional (Gonzalo, 2018).

Tabla 1

Composición estándar del medio de cultivo basal de bold (MBB)

Solución de macroelementos		Solución de microelementos		Soluciones complementarias	
Componente	mg/l	Componente	g/l	Solución 1	
KH ₂ PO ₄	175	ZnSO ₄	8.82	Componente	g/l
CaCl ₂	25	MnCl ₂	1.44	Na ₂ EDTA	50
MgSO ₄	75	MoO ₃	0.71	KOH	3.1
NaNO ₃	250	CuSO ₄	1.57	Solución 2	
K ₂ HPO ₄	75	Co(NO ₃) ₂	0.49	Componente	Por litro
NaCl	25			FeSO ₄	4.98g
				H ₂ SO ₄ (Conc)	1 mL

Nota: De cada solución se agregó un mL en agua destilada previamente esterilizada en autoclave a 120°C y 1,1 kg/cm² de presión durante 15 min por cada litro de MBB a preparar. Adaptado de “*Incidencia del nitrógeno en la producción de biomasa y ácidos grasos de la microalga Chlorella vulgaris en un fotobiorreactor de panel plano a escala laboratorio*”, por Ángel, Pimienta y Rubio, 2013

Al observarse crecimiento significativo de colonias microalgales en la superficie del medio, se removió con asa estéril una pequeña porción y se diluyó en una gota de MBB, con el fin de verificar la pureza de la cepa de *Chlorella* sp. a través de observación en el microscopio óptico

Leica DM500. Las cepas aisladas fueron inoculadas en Erlenmeyers de 50 mL con 30 mL de medio BBM durante 15 días (López y Meza, 2017).

5.4.1.2 Obtención del agua residual municipal

Las muestras de agua residual para todas las pruebas experimentales fueron adquiridas del efluente de la EDAR “El Pueblo” ubicada en las coordenadas $10^{\circ}58'17,12''$ N y $74^{\circ}50'44,82''$ O la cual cuenta con un sistema de estabilización y un caudal aproximado de 800 L/s que es vertido directamente al Arroyo León (ver figura 9). El muestreo fue manual y se obtuvieron muestras puntuales de acuerdo con lo establecido por la guía para el monitoreo de vertimientos, aguas superficiales y subterráneas del Instituto de hidrología, meteorología, y estudios ambientales de Colombia (IDEAM, 2010), donde se establecen los parámetros para la selección del tipo de muestreo.

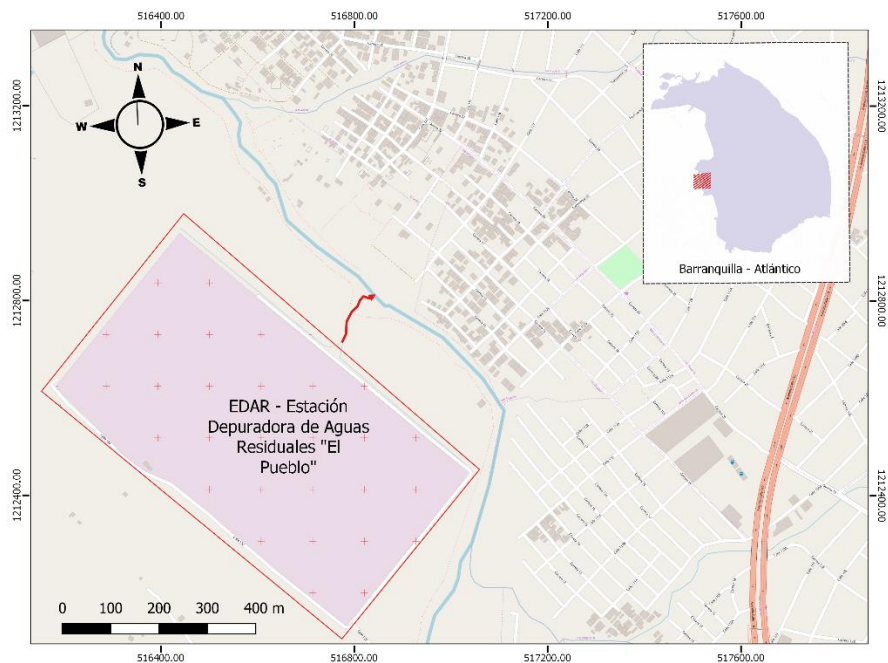


Figura 9. Punto de vertimiento directo de EDAR “El Pueblo” a Arroyo León. Adaptado de Open Street Map, 2019.

5.4.1.3 Monitoreo de crecimiento poblacional del cultivo

Los tamaños de los inóculos iniciales de *Chlorella* sp. para las unidades experimentales de bioensayos de la fase 1 oscilaron entre 1.13×10^6 cel/mL a 9×10^5 cel/mL y en la fase 2 oscilaron entre 1.15×10^6 cel/mL a 9×10^5 cel/mL. Estos tamaños son los más adecuados para estudios de seguimiento de las etapas de crecimiento de *Chlorella* sp. en cultivos discontinuos (Mariano, Mayta, Montoya y Tarazona, 2017).



Figura 10. Montaje experimental de las fases 1 y 2 del proyecto. Fuente: Autores

El crecimiento poblacional de cada réplica fue monitoreado cada ± 24 horas, durante 7 días durante la fase 1, y 5 días durante la fase 2 (Valenzuela, 2013). Para ello se empleó el hematocitómetro de Neubauer de profundidad 0.1 mm, tal como se observa en la figura 11 (Valenzuela, 2013). Usando una micropipeta de 50 μ L se tomó una alícuota luego de homogenizar la muestra de cada uno de los cultivos, se agregó al borde del cubreobjetos en el extremo de la cámara, dejando que el líquido penetrara por capilaridad y se procedió a realizar el conteo en el microscopio Leica DM500, usando el objetivo 40X.

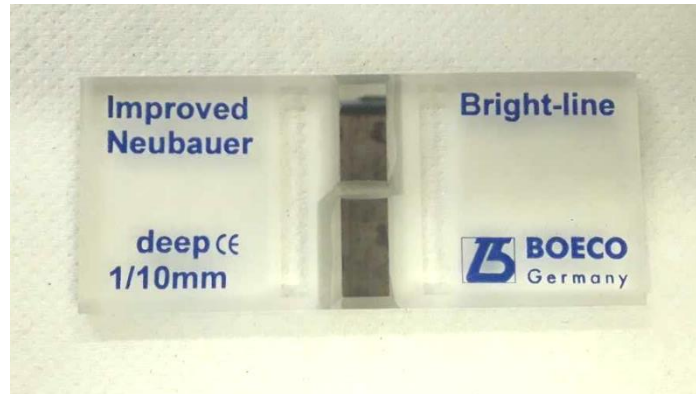


Figura 11. Hematocitómetro de Neubauer usado para conteo celular en las diferentes fases del proyecto. Fuente: Autores

A través del hematocitómetro se realizó conteo de células en el cuadro central de este, el cual consta de 25 cuadros, cada uno con un área de 0.04 mm^2 ($0.2 \text{ mm} \times 0.2 \text{ mm}$), a su vez divididos en 16 cuadros más pequeños, de ellos se leen cinco cuadros menores, los 4 extremos y el centro (ver figura 12), lo anterior teniendo en cuenta que el tamaño de las células de *Chlorella* sp. es inferior a $6 \mu\text{m}$ y se presentan cultivos con altas concentraciones (Arce et al., 2017).

Posteriormente se aplicó la fórmula propuesta por Bastidas (2019) para obtener datos de concentración en unidades de cel/mL (ver anexos). Los datos calculados se procesaron a través del software Microsoft Excel 2016 para generar la curva de crecimiento celular respecto al tiempo de cada fase 1 y 2.

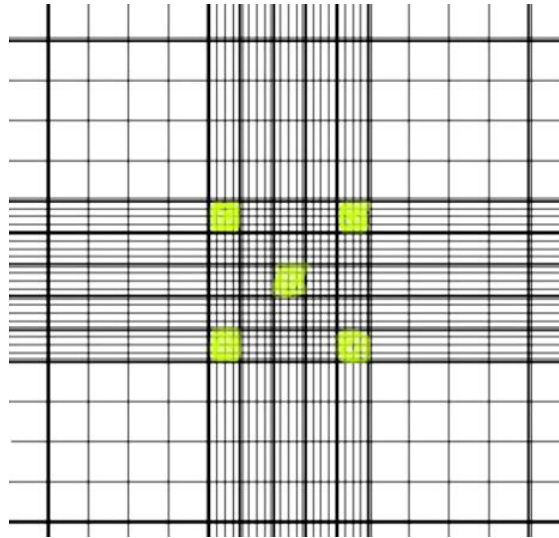


Figura 12. Unidades de conteo de hematócitos de Neubauer. Adaptado de “*Crecimiento de la microalga Dunaliella salina en un cultivador Raceway en condiciones de laboratorio*”, Manso y Mayorga, 2017.

Adicionalmente en la fase 1 del proyecto, se determinó contenido de clorofila, y se calculó tiempo de duplicación y tasa específica de crecimiento.

5.4.1.3.1 Tasa específica de crecimiento

En la fase de crecimiento exponencial se calculó la tasa específica de crecimiento que representa la velocidad de crecimiento del cultivo, expresada en número de divisiones al día por medio de la ecuación de Guillard (Andersen y Kawachi, 2005; Mariano et al., 2017).

5.4.1.3.2 Tiempo de duplicación

El tiempo de duplicación (T_d), hace referencia al tiempo que requiere una población para dividirse, se calculó usando la ecuación de Guillard expresada en divisiones/día (Andersen y Kawachi, 2005; Mariano et al., 2017).

5.4.1.3.3 Contenido de clorofila

Entre los pigmentos naturales que hacen parte de las biomoléculas presentes en la biomasa de microalgas, se encuentra la clorofila, esta representa entre 0.50 y 1.50% del peso seco de la

biomasa microalgal, por ello la cuantificación permite analizar el crecimiento del cultivo (Jacob, Queiroz, Queiroz, Ramírez y Streit, 2015). Para la determinación del contenido total de la clorofila α y β se recolectaron 3 mL de cultivo en tubos de ensayo de 15 mL de capacidad, durante las fases de crecimiento exponencial y estacionaria, la muestra se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos con el propósito de sedimentar la biomasa microalgal y descartar el sobrenadante, empleando la centrifugadora 'Megafuge™ 8 Small Benchtop' de ThermoFisher.

Para la extracción de los pigmentos del material sedimentado, se disolvió en 10 mL de acetona al 90% de referencia Merck, y agitó durante un minuto en tubos de ensayo de 15 mL; luego éstos se almacenaron sellados con papel craft para evitar la degradación de las muestras, en un refrigerador a una temperatura de 3°C durante 24 horas, lapso en el que se da el proceso de extracción Wegmann y Metzner (1971), (García, Moncayo y Pastuzo, 2016). Por último, al solvente con los pigmentos extraídos (ver figura 13) se les determinó la absorbancia (A) a longitudes de onda de 570, 600 y 650 nm en un espectrofotómetro HACH DR3900 contra un blanco de acetona al 90% marca Merck.

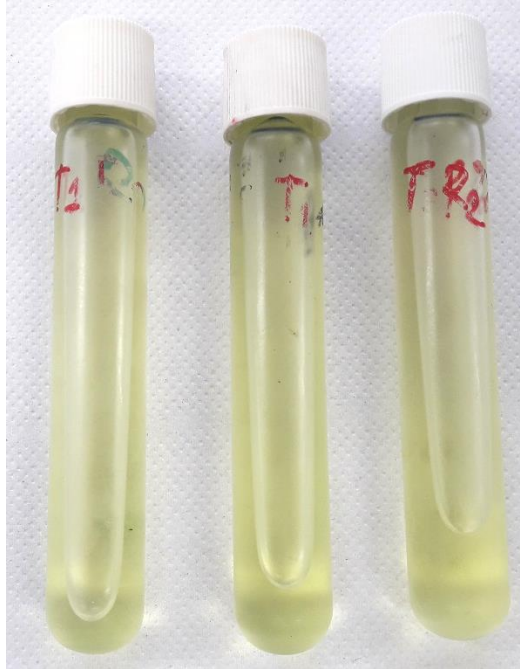


Figura 13. Extracción de pigmentos con acetona al 90%. Fuente: Autores

La concentración de los pigmentos de clorofila α y β se calculó según la ecuación de Jeffrey y Humphrey (1975), (García et al., 2016). Dicha ecuación se puede consultar en los anexos de este documento.

5.4.2. Cuantificación de la concentración de nutrientes removidos usando *Chlorella* sp

El monitoreo de nutrientes, pH y temperatura en cada muestreo se hizo siguiendo las metodologías propuestas por el ‘Standar Methods’ para la examinación de agua y agua residual (Baird, Eaton y Rice, 2017). Cada procedimiento será expuesto en los siguientes ítems.

Previo a la medición de dichos parámetros, se tomaron 30 mL de la muestra, se llevó a centrifugación durante 15 minutos en el equipo ‘Megafuge™ 8 Small Benchtop’ de ThermoFisher, con el fin de separar la biomasa microalgal del medio.

5.4.2.1 *Monitoreo de concentración nitratos*

A cada muestra extraída de los bioensayos (en todos los casos 10 mL de solución) se adicionó el reactivo NitraVer 5 (en polvo) con rango de reacción entre 0.3 – 30 mg/L $\text{NO}_3\text{-N}$, el cual se agitó vigorosamente durante 1 minuto hasta que la muestra de solución se tornó a un color ámbar y se dejó en reposo para que reactivo actuara sobre la muestra, por un tiempo de 5 minutos. Esta solución se agregó a una celda cuadrada de cuarzo propia del equipo DR 3900 de HACH, donde se seleccionó el programa ‘Nitrate’ y se ajustó a la función NO_3^- , para la lectura inicial del blanco o testigo, seguida de la muestra con reactivo. El método usado por este equipo corresponde a la 8039 HR reducción de cadmio, y los datos obtenidos se expresan en mg/L (Baird et al., 2017; HACH, 2019; IDEAM, 2018).

5.4.2.2 *Monitoreo de concentración de fosfatos*

En 10 mL de muestra se vertió 0.5 mL de reactivo molibdovanadato (en líquido) de alto rango de reacción entre 1–100 mg/L PO_4 , con una micro pipeta Thermo de 50 μL , esto se agitó durante 7 minutos mientras se obtenía un color amarillo tenue en la muestra. Posteriormente, esta solución se trasegó a una celda cuadrada de cuarzo de 1 pulgada destinada para la lectura del espectrofotómetro DR 3900 de HACH con el programa ‘Phosphorus Reactive’ incorporado y ajustado a la función PO_4^- para su lectura. Previo a la lectura de la muestra con reactivo, se agrega a una celda como la descrita anteriormente 10mL del blanco o testigo, y se lee inicialmente. El método usado por este equipo para la determinación de este parámetro corresponde a 8114 Molibdovanadato, y los datos obtenidos se expresan en mg/L (Baird et al., 2017; HACH, 2019; IDEAM, 2018).

5.4.2.3 Monitoreo de concentración de pH y temperatura

Los datos de pH y temperatura (°C) se obtuvieron diariamente en todos los ensayos con pHmetro YSI Ecosense 100A. Esta información fue útil para establecer relaciones entre la dinámica del crecimiento poblacional de la cepa y las condiciones experimentales de los ensayos (Pizarro y Ramos, 2018).

5.4.3. Evaluación de la remoción de NO_3^- y PO_4^{3-} del inóculo escogido de *Chlorella* sp. en un sistema de fotobiorreactores verticales con columna de burbujeo a escala piloto

Una vez determinado el tamaño de inóculo óptimo para la remoción de NO_3^- y PO_4^{3-} en aguas residuales domésticas de la EDAR “El Pueblo” éste se adicionó a un sistema de fotobiorreactores verticales con columna de burbujeo diseñado y construido en el marco del proyecto “Desarrollo de un sistema de tratamiento de aguas residuales domésticas mediante la implementación de filtración múltiple con material bioadsorbente y microalgas”. En esta fase se evaluó la remoción de NO_3^- y PO_4^{3-} del inóculo escogido de *Chlorella* sp. y se relacionó con los parámetros de operación del sistema de fotobiorreactores utilizado para este estudio. Además de la evaluación de NO_3^- y PO_4^{3-} , pH, temperatura y crecimiento poblacional de *Chlorella* sp. en el sistema de fotobiorreactores se aportaron (basado en una revisión bibliográfica especializada) algunas consideraciones sobre las condiciones ingenieriles del sistema relacionadas con la efectividad del cultivo y el tipo de sistema seleccionado.

5.4.3.1. Características del sistema de fotobiorreactores

El sistema contó con dos reactores, construidos en material acrílico, con 1 metro de altura y volumen de 6 litros cada uno (ver figura 14). Estos reactores estuvieron conectados a través de una serie de tuberías externas con diámetro de 1/2 pulgada. Dichas tuberías externas se

comunicaban con un depósito de almacenamiento de agua de referencia ‘Acuaviva 250L’ con el fin de garantizar la circulación de agua a través del sistema (Mažeikienė, 2019), para ello se contó con una bomba de suministro con caudal máximo de 40 L/min, presión de 57 PSI y rodete periférico, de referencia Electrobomba PKM 60. Para lograr mantener la microalga en suspensión a través de todo el sistema, se usó una bomba de aireación con una presión de 4.35 PSI, volumen de aireación de 50 LPM, de referencia Air Pump Kit PT 1620, que dosificó el aire al sistema de reactores a través de una piedra porosa en cada reactor (Álvarez et al., 2016; Lei et al., 2015; Bellucci et al., 2019).

El inóculo inicial agregado al sistema fue de 3.5×10^6 cel/mL de *Chlorella* Sp. Se monitoreó los parámetros de interés cada 4 horas, en total se hicieron nueve muestreos.



Figura 14. Sistema de reactores usados durante la fase 3 de la investigación. Fuente: Autores

5.5. Análisis Estadístico

En esta investigación se desarrolló un diseño experimental de tipo factorial con un factor de tratamiento, y más de una variable respuesta, con tres niveles experimentales, y tres réplicas de las unidades experimentales. En el experimento de la fase 1 se definieron como variables dependientes las concentraciones de NO_3^- y PO_4^{3-} y la variable independiente la densidad celular de la que se derivan los parámetros de crecimiento (Máxima densidad celular, tasa específica de crecimiento y tiempo de duplicación). En el caso del experimento de la fase 2 se definieron como variables dependientes las concentraciones de NO_3^- y PO_4^{3-} y pH, la variable independiente a los tratamientos establecidos (T1, T2, T3), y una variable de bloqueo correspondiente a los días en los que se desarrolló el experimento (esta variable no fue movida). Para analizar los resultados obtenidos en la fase 1 del experimento se aplicó análisis de varianza ANOVA con un intervalo de confianza del 95% ($\alpha=0.05$) y modelos de regresión lineal simple, y en la fase 2 se aplicó modelos lineales generalizados. Los análisis de datos se realizaron a través del software Statgraphic Centurion XVII.

6. Análisis de resultados

6.1 Determinación del tamaño de inóculo inicial de la cepa de *Chlorella sp.* para su uso en la remoción de NO_3^- y PO_4^{3-} en un sistema de fotobiorreactores verticales con columna de burbujeo

El desarrollo de las actividades de investigación de la fase 1 se dirigieron al acondicionamiento del tamaño de inóculo inicial mejorado de *Chlorella sp.*. Se analizó en las unidades experimentales del bioensayo el comportamiento de la dinámica poblacional de la cepa con relación a sus etapas de crecimiento: adaptación, logarítmica o exponencial, estacionaria, y muerte (Gómez, Kufundala, Ortega, Salazar y Silveira, 2018). En la figura 15 se observa que entre los días 5 y 6 del experimento la curva de crecimiento alcanza la fase exponencial con un evidente pronunciamiento. La fase exponencial está relacionada a una máxima densidad celular (MDC), alta tasa específica de crecimiento (TEC) y menor tiempo de duplicación (Td), lo que se vincula con el momento de mayor actividad metabólica de la microalga, incremento de la incorporación y transformación de nutrientes del medio y biosíntesis de compuestos orgánicos de vital importancia para su crecimiento y reproducción (Castañeda y Consuelo, 2016).

La incorporación de un inóculo inicial de una población de 1×10^6 cel/mL para cada uno de los tratamientos (T1, T2 y T3) es decisiva para el alcance del objetivo de esta fase, debido a que, la población de las células microalgales se encuentran en los inicios de la fase exponencial temprana, lo cual facilita la adaptación del microorganismo a las condiciones del medio de cultivo y obtener mayores rendimientos en el crecimiento (ver figura 15), según lo observado por Forero et al. (2016). Este comportamiento del crecimiento es usual en los cultivos discontinuos, a través del cual se puede analizar el comportamiento general de la microalga respecto a cada tratamiento establecido (Arbib et al., 2015; Estrada y Tafur, 2015).

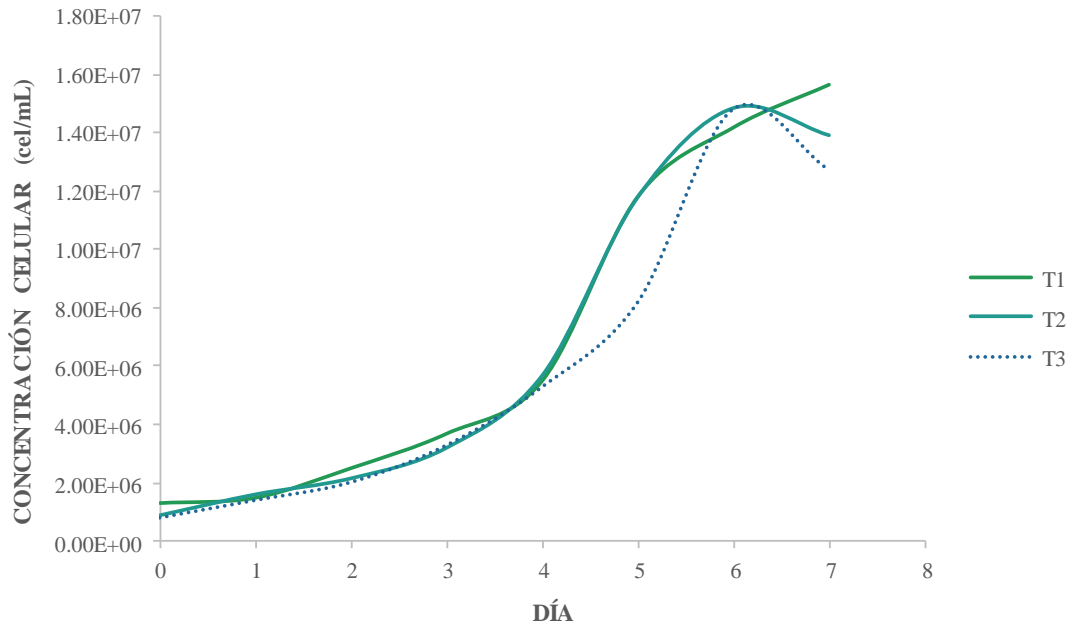


Figura 15. Curva de crecimiento de *Chlorella* sp. inoculada en los diferentes tratamientos establecidos. Fuente: Autores

Se observa que en todos los tratamientos el crecimiento poblacional se presentó un comportamiento similar durante los primeros 3 días, correspondiente a la fase de adaptación. Esta fase fue más corta respecto a las reportadas en otras fuentes, la cual corresponde a un tiempo de 5 días (Forero et al., 2016; Araujo y Vargas, 2017). Este comportamiento en la dinámica del crecimiento de la cepa está asociado probablemente al periodo de adaptación a las condiciones outdoor del experimento y a que el tamaño del inóculo inicial se encontraba en fase logarítmica temprana (mencionado anteriormente). Referente a la cepa utilizada se ha planteado que posee una plasticidad metabólica y resistencia a los cambios ambientales (Colorado et al., 2013), lo que permite que su adaptación sea más fácil y rápida en diferentes medios de cultivo (Angulo, Plaza, Puentes, Torres y Vacca, 2017). Se obtuvo al tercer día una tasa de crecimiento

menor a 0.49 div/día, y un tiempo de duplicación máximo de 1.79 días (ver tabla 2). Para los diferentes tratamientos las MDC de 3.68×10^6 , 3.2×10^6 y 3.26×10^6 cel/mL de agua residual municipal. Resultados similares a los obtenidos por Aranda et al. (2012), en el uso de *Chlorella vulgaris* bajo tres densidades diferentes para evaluar su crecimiento bajo condiciones mixotróficas, y por Mendoza (2019) utilizando *Chlorella vulgaris* para evaluar su crecimiento en efluentes de remojo de curtiembre.

Tabla 2

Tasa específica de crecimiento (TEC) y tiempo de duplicación (Td) en las fases de adaptación y exponencial

Fase	Tratamiento	TEC	Td
Adaptación	T1	0,39	1,79
	T2	0,40	1,74
	T3	0,49	1,41
Exponencial	T1	0,76	0,91
	T2	0,73	0,95
	T3	0,44	1,58

Nota: Los valores reportados corresponde al cálculo de la tasa específica de crecimiento y el tiempo de duplicación de *Chlorella* sp. en la fase de adaptación y exponencial.

Los T1 y T2 presentaron un crecimiento similar en la fase exponencial, ocurrida entre los días 4 y 6. En esta fase se presentaron las mayores tasas de crecimiento, con valores de 0.73 y 0.76 div/día y los menores tiempos de duplicación, requiriéndose solo 0.95 y 0.91 días respectivamente, valores dentro del rango usual de acuerdo con lo obtenido por Forero et al.

2016, en ensayos con *Chlorella vulgaris*. Tal como se observa en la figura 15, la concentración celular en el tratamiento 3 presentó un crecimiento más lento, entre los días 4 y 5, con tasas de crecimiento de 0.44 div/día y tiempo de duplicación de 1.58 días, como consecuencia de la probable disminución de los nutrientes disponibles en el medio (ver tabla 2).

Finalmente, en el día 6 se presentó la fase estacionaria, similar a lo observado por (Pizarro y Ramos, 2018), en ensayos con *Chlorella vulgaris*. Para los tratamientos 2 y 3, a partir del sexto día se presentó la disminución de la densidad celular como consecuencia de la limitación de fosfatos y nitratos, la población entró en una etapa de reciclado de nutrientes, de células muertas y en descomposición, con lo que se presume la presencia de metabolitos auto inhibidores que generaron el detrimento del cultivo (Colorado et al., 2013).

Las MDC alcanzadas durante la fase exponencial coincidieron con las mayores concentraciones de clorofila. En la tabla 1, se observa las diferencias de concentraciones de pigmentos en relación con las fases de adaptación y exponencial del cultivo. Se ha reportado que los especímenes de la Clase *Clorofícea* como otros taxones algales presentan una correlación directamente proporcional entre la producción de pigmentos clorofílicos α y β con el crecimiento celular durante la fase exponencial (Gallego et al., 2013). Dicha relación se evidencia en los valores de clorofila obtenidos en cada una de las concentraciones de ARM tratadas, similares a los presentados por Ávila et al. (2015) con cepas de *Chlorella* sp. inmovilizada utilizando agua residual como medio de cultivo, se observó el incremento significativo en la concentración de clorofila a los 10 días de experimentación (fase exponencial), respecto a los valores presentados durante la fase de adaptación del cultivo. Así mismo, Andrade et al., (2004) obtuvo una producción significativamente mayor de pigmentos clorofílicos en el punto en el que el cultivo de *Chlorella* sp. en agua residual filtrada presentó una mayor densidad.

Tabla 3*Concentración de clorofila α y β en las fases de adaptación y exponencial*

Fase	Tratamiento	Clorofila α	Clorofila β	Clorofila total ($\mu\text{g/mL}$)
Adaptación	T1	8,51	6,46	14,97
	T2	8,91	6,28	15,19
	T3	15,95	8,22	24,17
Exponencial	T1	86,43	51,01	137,45
	T2	77,08	29,37	106,44
	T3	128,36	90,09	218,46

Nota: Los valores reportados corresponde al cálculo de la clorofila de *Chlorella* sp. en la fase de adaptación y exponencial.

Basado en la interpretación del análisis de regresión simple utilizado en esta fase de la investigación se logró establecer una relación entre las concentraciones celulares y las concentraciones de NO_3^- y PO_4^{3-} presentes en los diferentes tratamientos de esta fase. En el primer caso, el valor-*P* obtenido a través del análisis de varianza (ANOVA) correspondió a 0.0000, evidenciando que existe una relación significativa entre ambos parámetros mencionados. Para valorar la bondad de la regresión lineal simple ajustado al modelo ‘Raíz Cuadrada-Y Cuadrado-X’, se obtuvo un coeficiente de correlación igual a -0.59, mostrando una asociación lineal negativa moderadamente fuerte, pues a medida que aumentan los valores de una variable disminuyen los de la otra, dicho esto, la concentración de nitratos guarda una relación inversamente proporcional respecto a la densidad celular presentes en los distintos tratamientos (ver figura 16). Una vez analizada la intensidad de la relación entre las variables, se procedió a

estimar los parámetros de predicción a través del criterio de mínimos cuadrados, aplicando el estadístico T donde se obtuvo un valor- P igual a 0.000 permitiendo así, comprobar la regresión que existe entre ambas variables.

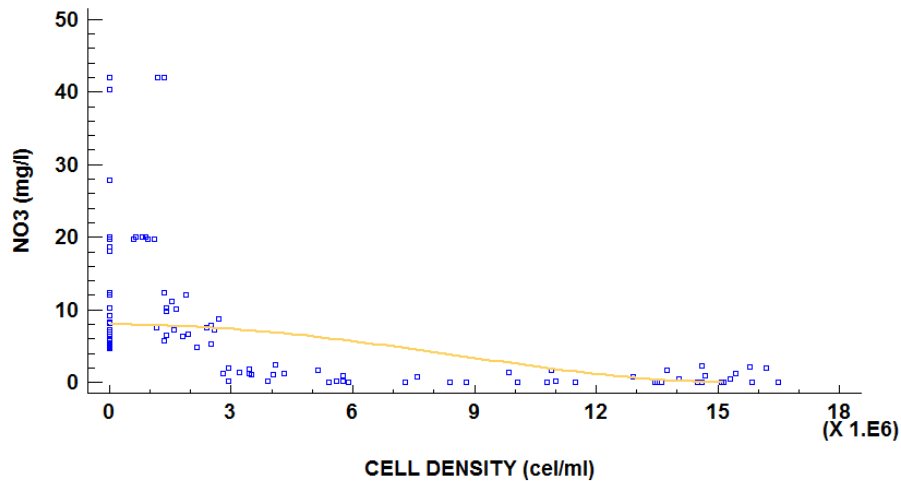


Figura 16. Grafico del modelo ajustado de la relación establecida entre la variable de crecimiento celular y de concentración de NO_3^- . Fuente: Autores

En el segundo caso, para identificar la relación entre la variable de densidad celular y concentración de PO_4^{3-} , se obtuvo del análisis de varianza un valor- p igual 0.0000, indicando una relación altamente significativa entre ambas variables. Como resultado de la regresión lineal simple ajustada al modelo ‘Raíz Cuadrada de X’, se obtuvo un coeficiente de correlación de -0.63, evidenciando una conexión negativa fuerte, pues a medida que se incrementa la concentración de células por mililitro la cantidad de PO_4^{3-} disminuye (ver figura 17). A través del estadístico T se estimaron los parámetros de predicción con el criterio de mínimos cuadrados, al obtener un valor- P de 0.000 se corrobora que la regresión que existe entre ambas variables es significativa.

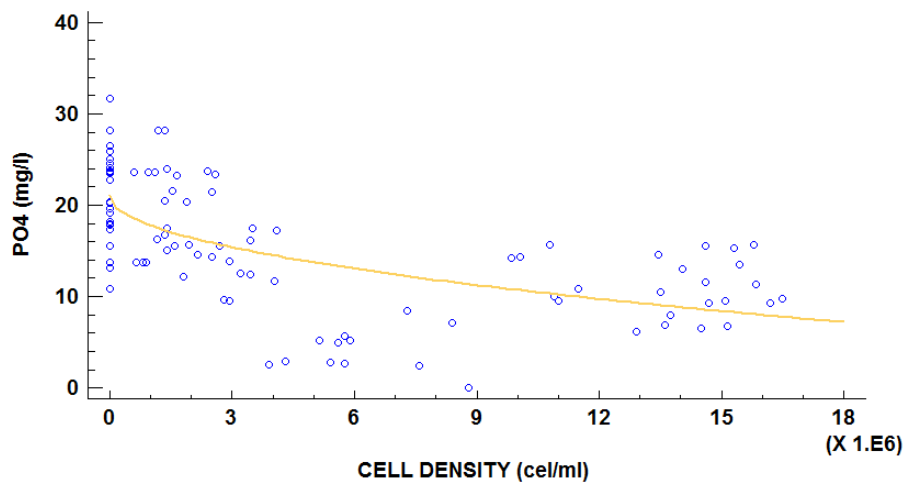


Figura 17. Grafico del modelo ajustado de la relación establecida entre la variable de crecimiento celular y de concentración de PO_4^{3-} . Fuente: Autores

La fase exponencial es el momento en el cual los microorganismos muestran signos de adaptación a las condiciones del medio e incrementan su metabolismo para la remoción de la mayor cantidad de compuestos inorgánicos posibles (Castañeda y Consuelo, 2016). De acuerdo con los resultados obtenidos por Arbib et al. (2015), quienes reportaron que la clorofita *Coelastrum sp.*, presentó el mayor incremento de la biomasa y una relación directamente proporcional con la eliminación de nutrientes en el medio de cultivo. La MDC de 3.63×10^6 cel/mL obtenido en la fase exponencial presentó cierta similaridad con la obtenida por (Pizarro y Ramos, 2018) con cepas de *Chlorella vulgaris* en el punto previo a la fase exponencial del estudio en condiciones outdoor utilizando como medio de cultivo el efluente de la producción del pescado *Siorela lalandi*. Es de destacar que durante la fase de acondicionamiento *Chlorella sp.* alcanzó porcentajes de remoción de NO_3^- que oscilaron entre 54% y 95% y para el PO_4^{3-} entre el 49% y 65%.

6.2 Análisis de la capacidad de remoción de NO_3^- y PO_4^{3-} de aguas residuales de la EDAR “El Pueblo” (Barranquilla) en cultivos discontinuos de *Chlorella* sp. en condiciones outdoor

El uso de cultivos de microalgas ha sido una alternativa sostenible y accesible para el tratamiento de aguas residuales con alta carga de concentraciones de NO_3^- y PO_4^{3-} (Hernández y Labbé, 2014). En relación con el inóculo inicial de 1×10^6 cel/mL se logró evidenciar diferencias en la remoción de NO_3^- y PO_4^{3-} en cada uno de los tratamientos de esta fase del estudio. En la figura 18 se observan el comportamiento de los valores de concentraciones de NO_3^- y PO_4^{3-} analizados durante esta fase del estudio para el tratamiento 1. En el caso del T1 con concentraciones iniciales de 5.8 mg/L de NO_3^- y 30.5 mg/L de PO_4^{3-} exhibieron disminuciones significativas (77% de NO_3^- y 59.2% de PO_4^{3-}) en el día cuarto cuando el cultivo alcanzó la densidad de 9.1×10^6 cel/mL.

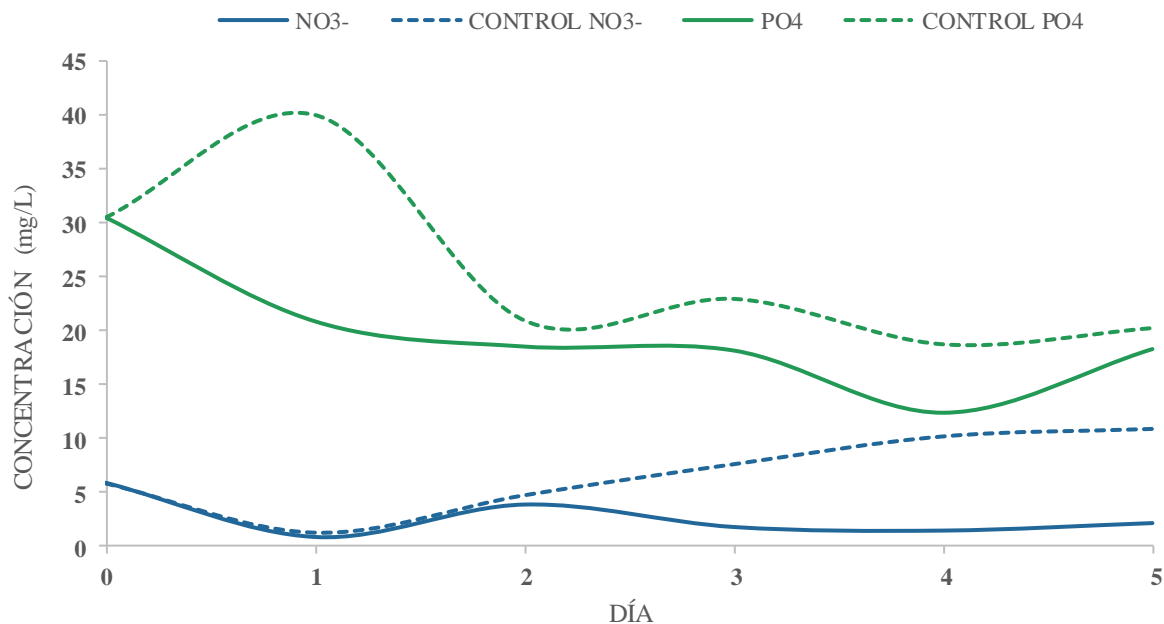


Figura 18. Comportamiento de nutrientes en el tratamiento 1 respecto a los días experimentales. Fuente: Autores

En el tratamiento 2, la concentración inicial del PO_4^{3-} pasó de 23.8 mg/L a 8.2 mg/L en el día tercero, lo que representó una remoción del 65.54% mientras que el NO_3^- con una concentración inicial de 4.7 mg/L pasó a una de 1 mg/L (ver figura 19) lo que representó una remoción del 95% cuando la cepa presentó una densidad poblacional de 7.75×10^6 cel/mL en el tercer día de la fase experimental.

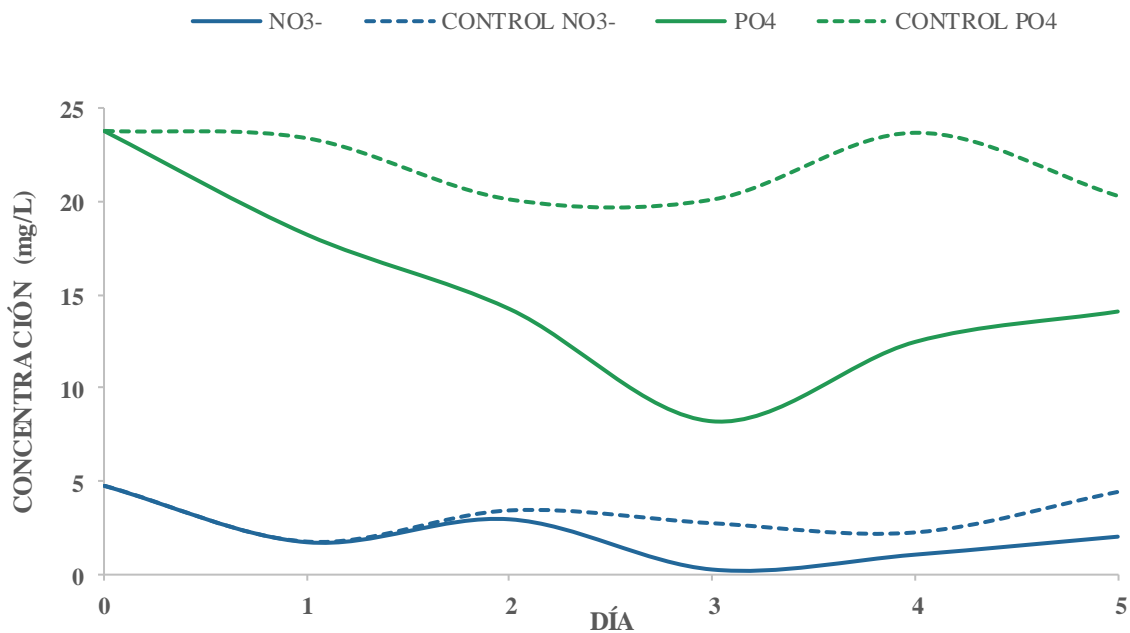


Figura 19. Comportamiento de nutrientes en el tratamiento 2 respecto a los días experimentales. Fuente: Autores

En el caso del tercer tratamiento, se observaron niveles de remoción del 54% en las concentraciones de NO_3^- y 49.7% en las de PO_4^{3-} . El crecimiento celular fue inferior a los cultivos anteriores, alcanzando una concentración de 5×10^6 cel/mL en el punto de mayor remoción, ocurrido al tercer día, similar a lo obtenido en los tratamientos 1 y 2 (ver figura 20).

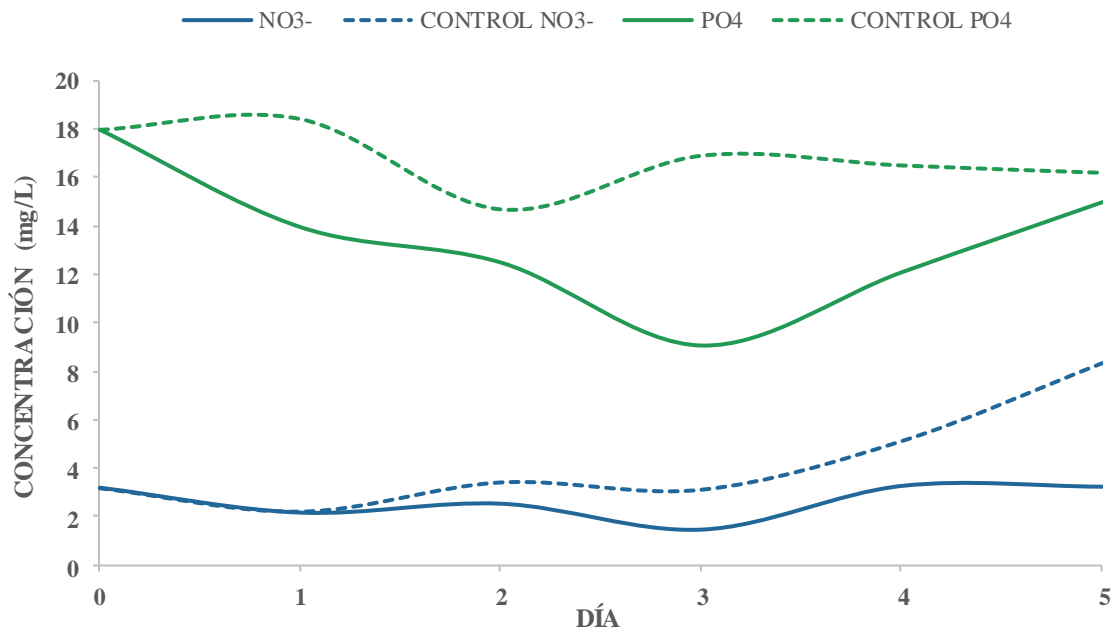


Figura 20. Comportamiento de nutrientes en el tratamiento 3 respecto a los días experimentales. Fuente: Autores

Para corroborar estadísticamente la significancia, y el impacto de las variables independientes, frente a las variables dependientes establecidas en el diseño experimental se aplicaron modelos lineales generalizados, teniendo en cuenta que valor- P menores de 0.05 indica que el factor influye significativamente sobre la respuesta (Meza et al., 2018). El valor- P obtenido del análisis de varianza para PO_4^{3-} fue igual a 0.000, indicando que al menos un factor (Días o Tipo de Tratamiento -T1, T2, T3-) en el modelo está significativamente relacionado con la variable dependiente establecida PO_4^{3-} . De la suma de cuadrados tipo III arrojada por el modelo ajustado, se obtuvo un valor- P igual a 0.000 para ambos factores predictivos (es decir, las variables independientes), lo que indica una alta significancia de dichas variables dentro del modelo ajustado, principalmente la variable días.

La gráfica del modelo ajustado permite observar una relación inversamente proporcional (ver figura 21), en la que al aumentar el número de días en el experimento disminuye la concentración de PO_4^{3-} , lo que evidencia la remoción obtenida en el paso del tiempo, tal como lo observa (Ávila et al., 2018) en ensayos con cepas de *Chlorella* sp. en suspensión, utilizando como medio de cultivo agua residual estéril bajo condiciones controladas de laboratorio, allí el porcentajes de remoción se incrementa a medida transcurre el experimento y se alcanzan los mayores al tercer día. Así mismo, (Haro y Perales, 2015) utilizando un bloom de microalgas, cuya especie dominante fue *Coelastrum* sp., cultivadas en medios sintéticos y bajo condiciones controladas de luz y temperatura, observó que los mayores niveles de remoción se presentaron a mayores tiempos experimentales, coincidentes con altas densidades poblacionales encargadas de metabolizar los nutrientes.

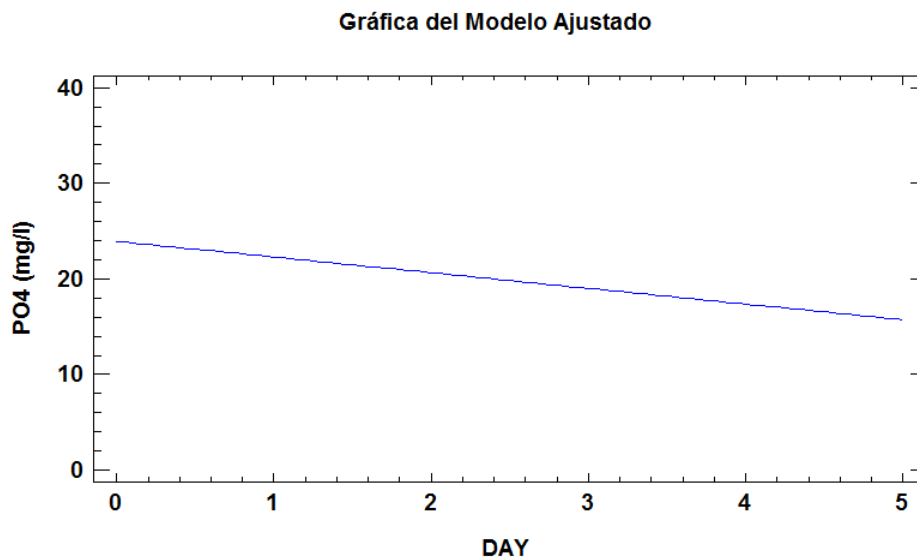


Figura 21. Grafico del modelo ajustado que explica significancia entre el factor día y la variable dependiente PO_4^{3-} .

Fuente: Autores

Para determinar qué medias de los factores categóricos (es decir del tipo de tratamiento -T1, T2, T3-) son significativamente diferentes se aplicó el procedimiento de intervalos LSD. La figura 22 muestra las medias por mínimos cuadrados con los intervalos de incertidumbre de cada tratamiento y su respectivo blanco. Se observa a través de dicha gráfica que las medias de los tratamientos T2 y T3 se traslapan indicando que no hay diferencias significativas frente a las medias de las concentraciones de PO_4^{3-} , las medias de los tratamientos no se traslapan con las medias de los blancos de estos, dado que si hay diferencias significativas en dicha relación. A excepción del T3, en el cual se observa que la muestra se traslapa en un mínima proporción con su blanco, lo que cual corrobora los resultados obtenidos en los niveles de remoción ofrecidos por este tratamiento.

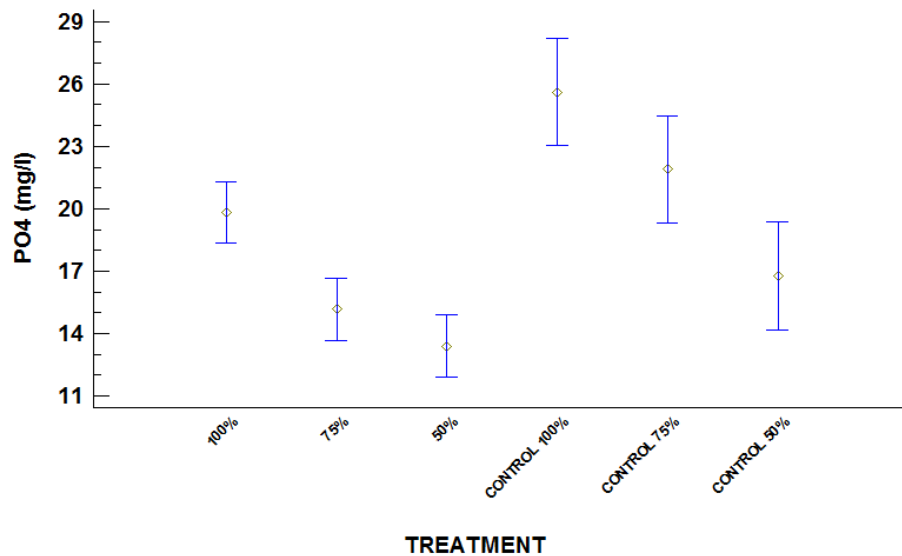


Figura 22. Significancia entre medias categoricas y concentraciones de PO_4^{3-} a través de intervalos LSD de Fisher.

Fuente: Autores.

El valor-*P* obtenido del análisis de varianza para NO_3^- fue de 0.0001, demostrando el alto grado de relación con los tipos de tratamientos. El factor días presentó un Valor-*P* de 0.76, lo que evidencia una relación poco significativa entre los días establecidos y las diferentes

concentraciones de nitratos, probablemente a razón de la alta velocidad en la asimilación de los nutrientes por parte de los microorganismos en los primeros días. En la figura 23, se observa que las medias de los tratamientos se traslapan entre sí indicando que no hay diferencias significativas frente a las medias de las concentraciones NO_3^- . Las medias de los tratamientos no se traslapan con las medias de los blancos de estos, dado que si hay diferencias significativas en dicha relación. En otros términos, lo anterior indica que los porcentajes de remoción presentados son muy similares en los tres tipos de tratamiento, y las concentraciones de NO_3^- , en los controles de los tratamientos estuvieron por encima de las concentraciones determinadas en cada tratamiento, lo cual muestra que los niveles de remoción obtenidos a través del tratamiento son atribuibles a la asimilación de moléculas de nitratos por las microalgas en los cultivos.

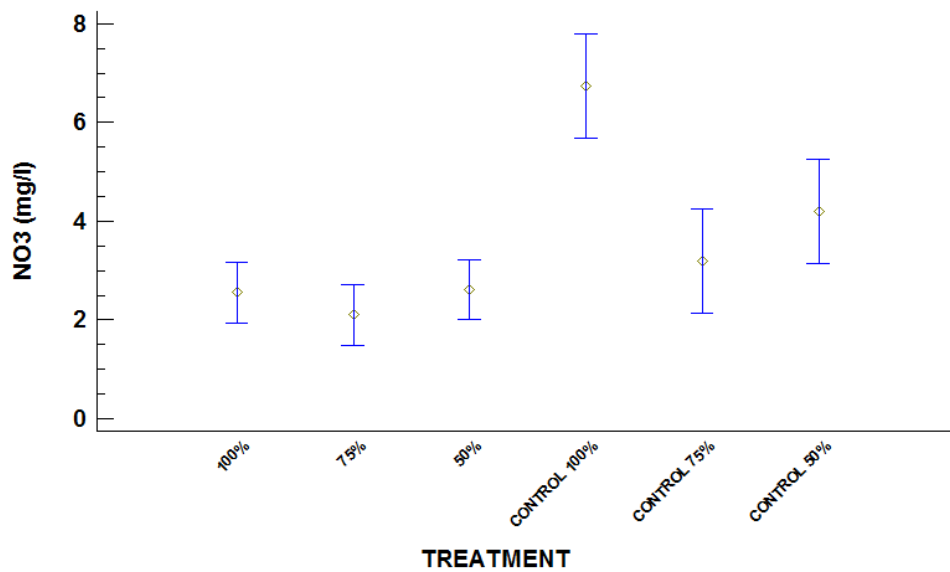


Figura 23. Significancia entre medias categóricas y concentraciones de NO_3^- a través de intervalos LSD de Fisher.

Fuente: Autores.

Otra de las variables que se incluyeron dentro del modelo lineal generalizado fue pH dado que dentro del diseño experimental se contempló su importancia en el desarrollo del cultivo de las cepas en estudio como una variable dependiente.

El comportamiento de dicho parámetro durante esta fase se observa en la figura 24. Se muestran rangos de pH de 7 durante el día 0, y se evidencian aumentos significativos durante los días 2 y 3 a valores entre 8.9 y 9.4. Los niveles de pH aumentan durante estos días (que representa la fase exponencial de las microalgas) como consecuencia de que el CO_2 diluido en el agua (formando ácido carbónico $-\text{H}_2\text{CO}_3^-$), es asimilado por las microalgas durante la fase luminosa de la fotosíntesis, lo cual eleva el consumo de carbono lo que origina un incremento en los niveles de pH (Arbib et al., 2015).

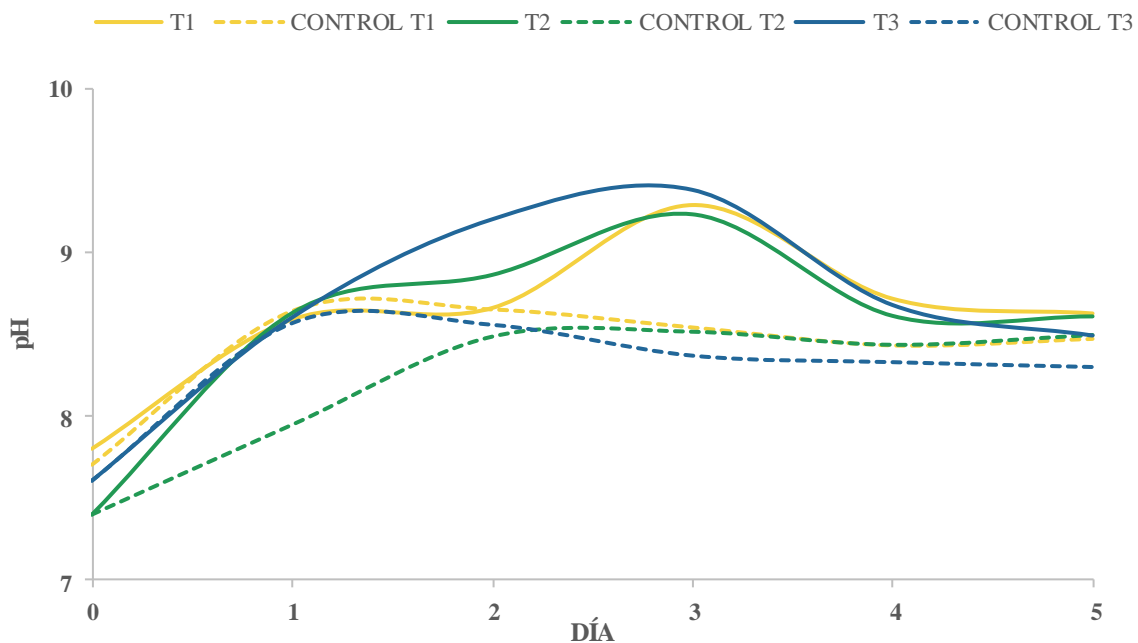


Figura 24. Comportamiento de pH en los distintos tratamientos establecidos respecto a los días experimentales.

Fuente: Autores

Como resultado del modelo lineal generalizado en el análisis de varianza para pH se generó un Valor-*P* de 0.0005, demostrando una relación significativa frente a la variable día, y un Valor-*P* de 0.2450 para el factor predictivo Tratamiento. Es decir que, el factor día tiene una significancia moderada en relación con el parámetro pH, pero el tipo de tratamiento no, dado que no guarda una relación importante frente al parámetro.

El nivel de pH durante el experimento en general fue favorable, se considera que el valor óptimo oscila entre 7-9, encontrándose mejores resultados entre 8.2-8.7, similar a los presentados en todos los ensayos. Relacionado con lo obtenido en cultivos continuos de *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella vulgaris*, en los que se evidencia el efecto del pH sobre la producción de biomasa. (Álvarez et al., 2016; Adbin et al., 2019; Ación et al., 2014).

De los resultados obtenidos en esta fase del experimento, es posible afirmar que los porcentajes de remoción de nitratos y fosfatos por la microalga *Chlorella* sp., en cada tratamiento fueron significativos, alcanzándose valores superiores al 95% en concentraciones de nitratos y del 65,5% en concentraciones de fosfatos en el tratamiento 2, durante el tercer día del experimento.

Tabla 4

Porcentajes de remoción obtenidos al tercer día del experimento (fase 2)

Tratamiento	Nutriente	Concentración	Concentración	Porcentaje de remoción
		inicial	final	(%)
1	NO ₃ ⁻	5,8	1,7	70,7
	PO ₄ ³⁻	30,5	18,2	40,3

2	NO ₃ ⁻	4,7	0,2	95,7
	PO ₄ ³⁻	23,8	8,2	65,5
3	NO ₃ ⁻	3,2	1,4	56,3
	PO ₄ ³⁻	18,0	9,0	50,0

Nota: las concentraciones iniciales y finales están en unidades de mg/L

La biorremediación observada se fundamenta en la capacidad natural que posee el microorganismo estudiado para incorporar contaminantes en sus procesos metabólicos y usarlos como fuente de energía o carbono (Meza et al., 2018), en el caso de los nutrientes como nitratos y fosfatos son esenciales en la formación de biomasa, donde los iones son incorporados por absorción directa (Álvarez et al., 2016; Angulo et al., 2017; Pizarro y Ramos, 2018). La microalga *Chlorella* sp. es un organismo que puede ser cultivado mixotróficamente (Ardila, Barajas y González, 2017), en ese caso para su alimentación fija el dióxido de carbono por medio de fotosíntesis y posteriormente consumen los nutrientes del medio en donde se encuentran, como se hizo en esta investigación (Jiménez, 2017).

6.3 Evaluación de la remoción de NO_3^- y PO_4^{3-} del inóculo escogido de *Chlorella* sp. en relación con los parámetros de operación de un sistema de fotobiorreactores verticales con columna de burbujeo

La fase 3 de esta investigación se desarrolló con el objetivo de evaluar la remoción de NO_3^- y PO_4^{3-} del inóculo escogido de *Chlorella* sp. en relación a la puesta en marcha de un sistema de fotobiorreactores verticales con columna de burbujeo en el marco del proyecto-patente “Desarrollo de un sistema de tratamiento de aguas residuales domésticas mediante la implementación de filtración múltiple con material bioadsorbente y microalgas”.

Las microalgas se han propuesto como microorganismos valiosos para varias aplicaciones, desde la producción de productos farmacéuticos hasta el tratamiento de aguas residuales. Cualquiera que sea la aplicación final, uno de los factores esenciales del proceso es el fotobiorreactor en el que se producen las microalgas. Para que el diseño de los fotobiorreactores sea adecuado, es indispensable entender los principales fenómenos que limitan el rendimiento y productividad de las células de las microalgas, tales como son la disponibilidad de luz, el suministro de nutrientes, las condiciones ambientales, incluyendo la temperatura y la radiación solar, así como también la mezcla y pH adecuados (Acién et al., 2017). El buen control de dichas variables mejora significativamente el crecimiento y óptimo desarrollo de las microalgas, según lo analizado por Huang, Jiang, Wang y Yang (2017).

Según las características del sistema de reactores utilizado, y lo establecido por Patyna, Płaczek y Witczak (2017), se implementó un sistema de cultivo cerrado basado en fotobiorreactores verticales con columna de burbujeo. Este tipo de sistema ha sido exitoso para el tratamiento de aguas residuales puesto que pueden garantizar una relación óptima de la superficie del reactor con su volumen, un fácil control, reproducibilidad y mantenimiento de las condiciones óptimas

del cultivo tales como la temperatura, la luz, el pH, que consecuentemente permiten un mejor control de los posibles contaminantes. Son compactos y asequible, además sencillos de esterilizar y de operar anéxicamente (AST Ingeniería S.L., 2013; Chang et al., 2017; Vo et al., 2019).

El material óptimo para la construcción de los reactores para tratamiento de aguas residuales con microalgas debe permitir principalmente el acceso de la luz al sistema. Los reactores proporcionados para la fase 3 del proyecto estaban elaborados de polimetilmetacrilato (PMMA), un material que proporciona dicha condición al cultivo por su transparencia del 93%, alta resistencia al impacto y a la intemperie, dureza similar al del aluminio y baja densidad (Fernández, 2013).

La iluminación suministrada al sistema de reactores fue proporcionada a través de luz natural. En el área sobre el que se instaló, según el IDEAM (2014) los niveles de irradiación media presentados durante el tiempo en que se desarrolló la presente fase fueron entre 5.0 y 5.5 kWh/m², y la radiación ultravioleta media correspondió a un rango entre 5 y 6 IUUV. Estos niveles de iluminación se han demostrado que son los adecuados para la actividad fotosintética de la microalga *Chlorella* sp. debido a que dichos rangos no influyen en la disminución poblacional por efecto de la fotoinhibición (Gutiérrez, 2017; Chang et al., 2017).

En cuanto al suministro de aire, dentro del sistema se realizó con una bomba de aireación con volumen de 50 LPM y presión de 4.35 PSI, a través de una piedra porosa en cada reactor que permitió la correcta re-suspensión de los microorganismos a través de los mismos, esto evitó la sedimentación celular en el sistema y obligó a las células a moverse entre las zonas oscuras y claras, mejorando la fotosíntesis, y consecuentemente la remoción de nutrientes (Acién et al., 2001; Ramírez et al., 2015).

Tabla 5*Resultados obtenidos en la tercera fase experimental*

Muestreo	Concentración		NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	pH	Temperatura
	Celular					
1	3,5x10 ⁶		7,25	11,15	8,47	28,43
2	3,55x10 ⁶		7,8	11,6	8,63	32,86
3	4,6x10 ⁶		2	7,55	8,72	34,03
4	5,1x10 ⁶		2	7,5	8,75	33,46
5	5,8x10 ⁶		4	7,8	8,79	32,76
6	6,1x10 ⁶		4,4	10,3	8,83	31,76
7	5,0x10 ⁶		4	10	8,28	27,9
8	6,05x10 ⁶		3,6	9,5	8,37	28,7
9	5,12x10 ⁶		2,9	9,3	8,73	30,7
10	5,95x10 ⁶		1,1	6,8	8,96	32,73

Nota: La densidad celular está reportada en unidades de cel/mL, las concentraciones de nutrientes en mg/L, y la temperatura en °C

La densidad celular del inoculo agregado en el sistema de reactores tuvo un comportamiento exponencial durante los primeros 6 muestreos (durante las primeras 24 horas), alcanzando una concentración celular de 6,1x10⁶ cel/mL (ver tabla 4). Durante dicho intervalo de tiempo de la etapa experimental, se presentaron porcentajes de remoción en la concentración de nitratos del 72.4% y 32.7% en la concentración de fosfatos.

El pH varió entre 8.28 y 8.96, rango óptimo para la especie. Según Yen et al. (2019), estos rangos varían de neutro a ligeramente alcalino entre 7 y 10, debido a reacciones relacionadas con

el consumo de carbono y nitrógeno del medio en que se encuentran, en este caso agua residual municipal. Autores como Anderson, Au, Lam, Liu y Wu (2007) reportaron comportamientos del pH similar con la especie *Chattonella marina*.

La temperatura varió de acuerdo con los diferentes momentos del día en que se realizaron los muestreos, en horas de la mañana y noche las temperaturas medidas correspondieron a grados bajos entre 28.4 °C y 31.7°C, respecto a las horas de la tarde donde se registraron temperaturas de hasta 34°C. Los rangos relacionados anteriormente se consideran óptimos para la productividad de la especie según Singh y Singh (2015), quienes afirma que intervalos de temperaturas mayores podrían producir daños en las células de la microalga o la muerte. Otras investigaciones obtuvieron resultados favorables en el desarrollo de la especie *Chlorella pyrenoidosa* al exponerla al mismo rango de temperatura (Han et al., 2013).

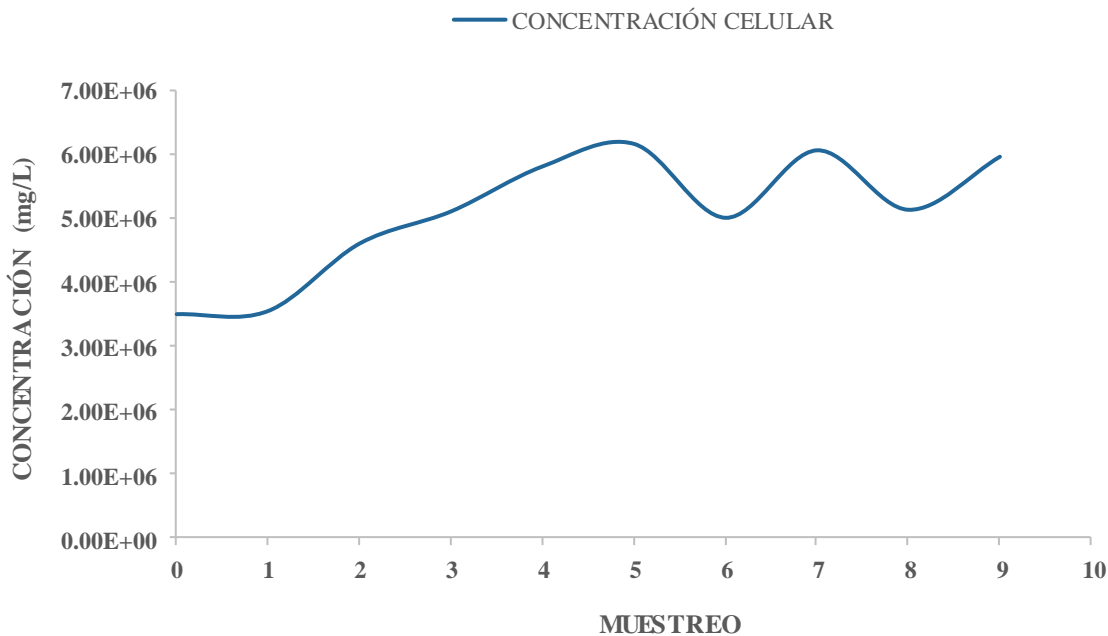


Figura 25. Comportamiento de la densidad poblacional de *Chlorella* sp. en el sistema de fotobiorreactores verticales con columna de burbujeo. Fuente: Autores

A partir del muestreo número seis la concentración celular en el sistema de fotobiorreactores empezó a variar intermitentemente, se generaron aumentos y disminuciones consecutivas entre sí como se observa en la figura 25. En dicho periodo, las concentraciones de nutrientes aumentaron probablemente por el efecto del caudal de retroalimentación de agua residual en el sistema (con una velocidad de 0.058L/s y una presión de 0.5 Hp desde el depósito de suministro). Dicho caudal posterior a su ingreso al sistema de reactores regresaba nuevamente al depósito desde una altura de 95cm. Aunque no se analizaron observaciones microscópicas de las células cultivadas en los fotobiorreactores se ha planteado que la velocidad y presión del caudal genera tensión de corte o efecto de cizallamiento en las células de *Chlorella* sp. que en consecuencia provoca daño y disminución del crecimiento celular (Lan y Wang, 2018). No obstante, las células de *Chlorella* sp. tienen una pared celular de 17 a 21 nm de espesor lo que las hace resistentes al estrés hidrodinámico, incluso respecto a otras especies de microalgas (Michels, Van, Vermú y Wijffels, 2015). Aunque la inyección de burbujeo usado en el sistema de fotobiorreactores en este estudio resulta ser un parámetro de importancia vital para el rendimiento del crecimiento celular se ha demostrado que cultivos de *Dunaliella salina* obtienen una mejora en la capacidad de remoción de nutrientes si implementan presiones y caudales de aireación leves (Gallego et al., 2013; Díaz y Ordoñez, 2006).

Los resultados discutidos anteriormente muestran que la capacidad asimilatoria del inóculo de *Chlorella* sp. en el sistema de fotobiorreactores fue significativa alcanzando porcentajes de remoción altos como se muestra en la figura 26. Lo anterior evidencia la capacidad de la *Chlorella* sp. en la asimilación de nitrógeno inorgánico y fosforo presente en las aguas residuales municipales, y la importancia de un correcto diseño de los reactores para su desarrollo. En paralelo, autores como Álvarez et al. (2016) obtuvieron porcentajes de remoción de nitrógeno

total del 78.9% y Fosforo de 73.7%, con cultivos de microalgas en medio con agua residual municipal.

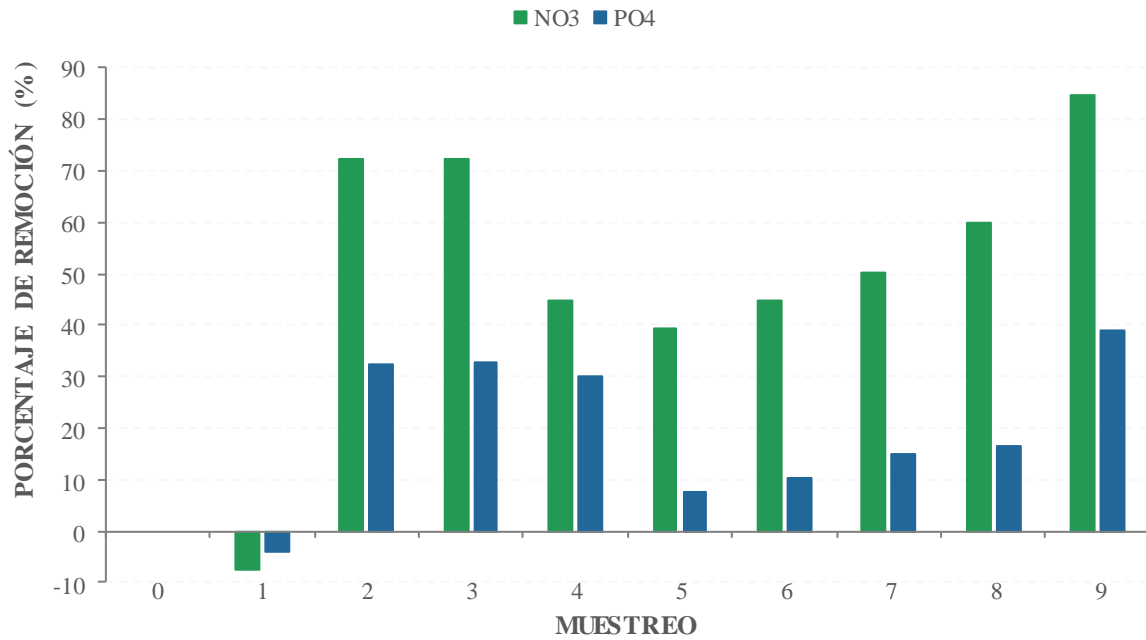


Figura 26. Porcentajes de remoción de nutrientes obtenidos por *Chlorella* sp. en el sistema de fotobiorreactores verticales con columna de burbujeo. Fuente: Autores

7. Conclusiones

Esta investigación en sus diferentes etapas permite concluir que la remoción de nutrientes, especialmente de nitratos y fosfatos en aguas residuales municipales provenientes de la EDAR "El Pueblo" con la microalga *Chlorella* sp. representa una alternativa viable para el tratamiento terciario de estos efluentes. Y que la virtud de dicho microorganismo llevada a un sistema de fotobiorreactores verticales con columna de burbujeo resulta una propuesta innovadora para el tratamiento de aguas residuales municipales en pro del aumento a la accesibilidad del saneamiento en el territorio local y su dinamización.

Como resultado de la fase 1 se obtuvo un inóculo óptimo de 3.63×10^6 cel/mL al tercer día de desarrollo de la fase experimental. Ratificado a través de los contenidos de clorofila determinados y recuento celular con hematocitómetro, además de los porcentajes de remoción obtenidos entre el 54% y 95% para concentraciones nitratos y entre 49% y 65% para concentraciones de fosfatos. Lo que permite afirmar que el proceso de adaptación de la cepa es fundamental para la obtención de resultados satisfactorios, puesto que la evaluación del comportamiento de crecimiento poblacional de inóculos de células de *Chlorella* sp. previo a su implementación en sistemas de tratamiento permite tomar mejores decisiones frente a su capacidad de remoción y resistencia en condiciones outdoor. Así mismo, es fundamental que, al iniciarse un cultivo, el inóculo inicial presente una baja densidad, aproximadamente de 1×10^6 cel/ml, con el que se obtiene una mejor curva de crecimiento que permita analizar el comportamiento de la microalga; este debe ser obtenido de una cepa que se encuentre en fase exponencial, punto en el que se encuentra la mayor tasa específica de crecimiento y el menor tiempo de duplicación lo que facilitará su reproducción en el nuevo medio.

Durante la fase 2 la microalga *Chlorella* sp., en cada tratamiento obtuvo resultados significativos, lo que comprueba que esta es capaz de remover nutrientes independientemente de las concentraciones iniciales que el ARM posea. Destaca el porcentaje de remoción de nutrientes del inóculo del T2 con valores superiores al 95% para NO_3^- y del 65.5% para PO_4^{3-} , obtenidos al tercer día del experimento, lo que permite concluir que esta cepa es bastante efectiva en la remediación de aguas residuales con alta carga de nutrientes y que la previa adaptación de la cepa empleada permitió obtener los resultados en un menor tiempo. Las mayores densidades celulares se obtienen al inocular la cepa en aguas residuales con altas concentraciones de nutrientes, dado que, por la alta velocidad de degradación de los compuestos, al presentar bajas concentraciones iniciales rápidamente se convierten un factor limitante del crecimiento, tal como ocurrió con el T3. La relación entre las densidades celulares y la concentración de nutrientes es inversamente proporcional respecto al paso del tiempo, debido a que se presenta mayor degradación metabólica de fosfatos a medida que crece el cultivo celular. La concentración de nitratos no presentó una relación significativa en relación a la variable días, como consecuencia de la alta velocidad en la asimilación de los nutrientes por parte de los microorganismos en los primeros días.

Por otra parte, se concluye que el comportamiento del pH influye significativamente en el crecimiento de la *Chlorella* sp., siendo el rango óptimo entre 8.2 y 8.7, este tiene una tendencia a incrementar como consecuencia de la disminución de CO_2 del agua (responsable de la acidificación) al ser asimilado por la microalga.

La evaluación de la remoción de NO_3^- y PO_4^{3-} mediante el cultivo de *Chlorella* sp. con relación a los parámetros de operación de un sistema de fotobiorreactores verticales con columna de burbujeo ratifica la importancia de comprender el control y manejo de condiciones técnicas e

ingenieriles para el éxito de biorremediación de aguas residuales basado en biotecnología de microalgas. La sinergia de factores como la luz, burbujeo, suministro de nutrientes, tipo de reactores y otras condiciones ambientales son vitales para el rendimiento de la microalga en los fotobiorreactores. A pesar de los posibles inconvenientes relacionados con el cizallamiento de las células de *Chlorella* sp. por el caudal en los fotobiorreactores se logró demostrar que el inóculo previamente adaptado y mejorado de *Chlorella* sp. en el sistema de fotobiorreactores del estudio, representa una alternativa tecnológica viable para su aprovechamiento y aplicación en el tratamiento de aguas residuales con elevadas cargas de nutrientes. Se demostró que en sistema de reactores pueden remover la concentración de 72.4% de NO_3^- y 32.7% de PO_4^{3-} de aguas residuales derivadas de efluentes de EDAR convencionales y que la obtención del tamaño de inóculo de *Chlorella* sp., constituye un procedimiento eficiente para la eliminación de fosfatos y nitratos en un sistema de fotobiorreactores verticales con columna de burbujeo a escala piloto de aguas residuales municipales de Barranquilla provenientes de la EDAR “El Pueblo” que permite el aumento de la accesibilidad al saneamiento en el territorio local.

8. Recomendaciones

Para diseñar un sistema de reactores en donde se encontrarán cultivos de microalgas (fotobiorreactores), como en este caso. Es de vital importancia que previamente se estudien las condiciones ambientales del lugar donde se instalaran estas unidades, la optimización, transferencia de materia y energía del o los fotobiorreactores. Pues a pesar de que se obtuvieron resultados bastante satisfactorios bajo las características y condiciones del sistema de reactores proporcionado, estas fueron bastante descomedidas frente al objetivo y la población estudiada.

Con el fin de optimizar la productividad del sistema de reactores estudiado, es importante que se prueben otros caudales de suministro, y se varíe la presión a la que se somete al cultivo de microalgas, pues a pesar de que *Chlorella* es una especie resistente al estrés hidrodinámico, altas presiones disminuyen sus capacidades depuradoras a raíz de cizallamientos en las células, y en múltiples ocasiones se ha encontrado que dichas presiones pueden ocasionar lisis celular.

Para futuras investigación de este carácter se dejarán en el anexo C las ecuaciones que se obtuvieron de los ajustes de los modelos de regresión simple con el fin de permitir que se evalúe a futuro el comportamiento de las variables estudiadas en la fase 1.

Se recomienda, explorar en distintas alterativas que permitan separar la biomasa microalgal de las aguas residuales tratadas, así como procesos en los que se pueda aprovechar y reincorporar dicha biomasa.

9. Referencias

- Abass O, A., Abdul, M. I., Alam, M. Z., Jameel, A. T. y Muyubi, S. A. (2011). Removal of oil and grease as emerging pollutants of concern (EPC) in wastewater stream. *IIUM Engineering Journal*, 12(4), 161–169. doi: 10.31436/iiumej.v12i4.218
- Abdel, N., Al, A. y Ibraheem, I. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(3), 257-275. doi: 10.1016/j.sjbs.2012.04.005
- Acién, F., Berenguel, M., Fernández, I., Guzmán, J., Normey, J., y Pawlowski, A. (2014). Event-based predictive control of pH in tubular photobioreactors. *Computers y Chemical Engineering*, 65, 28-39. doi: 10.1016/j.compchemeng.2014.03.001
- Acién, F., Chisti, Y., Fernández, J. y Molina, E. (2001). Tubular photobioreactor design for algal cultures. *Journal of Biotechnology*, 92(2), 113-131. doi: 10.1016/S0168-1656(01)00353-4
- Acién, F., Fernández, J., Gómez, C., Molina, E. y Morales. (2016). Wastewater treatment using microalgae: how realistic a contribution might it be to significant urban wastewater treatment? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(21), 9013-9022. doi: 10.1007/s00253-016-7835-7
- Acién, F., Molina, E., Reis, A., Torzillo, G., Zittelli, G., Sepúlveda, C., y Masojídek, J. (2017). Photobioreactors for the production of microalgae. *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*, 1-44. doi: 10.1016/b978-0-08-101023-5.00001-7

- Acosta, M., Ramírez, E. y Vélez, J. (2017). Análisis de condiciones climatológicas de precipitaciones de corto plazo en zonas urbanas: caso de estudio Barranquilla, Colombia. *Idesia (Arica)*, 35(2), 87-94. doi: 10.4067/s0718-34292017005000023
- Adbin, M., Kumar, S., Nawkarkar, P., y Singh, A. (2019). Life cycle assessment of *Chlorella* species producing biodiesel and remediating wastewater. *Journal Of Biosciences*, 44(4). doi: 10.1007/s12038-019-9896-0
- Agarwal, N., Agarwal, P. y Gupta, R. (2019). Advances in Synthesis and Applications of Microalgal Nanoparticles for Wastewater Treatment. *Journal of Nanotechnology*, 2019, 1-9. doi: 10.1155/2019/7392713
- Agudelo, D., Castillo, M., Mendoza, M., Morgado, W., Parody, A., Posso, H. y Viloría A. (2018). Hospital admission and risk assessment associated to exposure of fungal bioaerosols at a municipal landfill using statistical models. En H., Yin, D., Camacho, P., Novais y A. Tallón (Eds.), *Intelligent Data Engineering and Automated Learning* (210-218). Madrid, España: Springer. Doi: https://doi.org/10.1007/978-3-030-03496-2_24
- Aguilar, E. A. (2018). Elimination of chemical oxygen demand from domestic residual water by electrocoagulation with aluminum and iron electrodes. *Revista Ambiente & Agua*, 13(5), 1-16. doi: 10.4136/ambi-agua.2240
- Aguirre, N., Chalarca, D. y Mejía, R. (2007). Aproximación a la determinación del impacto de los vertimientos de las aguas residuales domésticas del municipio de Ayapel, sobre la calidad del agua de la ciénaga. *Revista Facultad de Ingeniería*, (40), 41-58. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/rfiua/n40/n40a03.pdf>

Alfonso, E., y Leal, S. (1998). Creación y mantenimiento de un cepario de microalgas. Centro de Investigaciones Marinas. Universidad de la Habana, La Habana, Cuba.

Ali, S. y Aziz, S. (2017). Characterization of municipal and dairy wastewaters with 30 quality parameters and potential wastewater treatment by biological trickling filters.

International Journal of Green Energy, 14(13), 1156-1162. doi:

10.1080/15435075.2017.1370594

Almendariz, C. (2019). Evaluación del efecto biológico del hongo *Ustilago quitensis* sobre la maleza *Cortaderia jubata* (tesis de pregrado). Universidad de Las Américas, Quito, Ecuador. Recuperado de <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/5465>

Álvarez, P., Arbib, Z., Barragán, J., Garrido, C., Perales, J. y Ruiz, J. (2011). Effect of Nitrogen and Phosphorus Concentration on Their Removal Kinetic in Treated Urban Wastewater by *Chlorella Vulgaris*. *International Journal of Phytoremediation*, 13(9), 884-896. doi:

10.1080/15226514.2011.573823

Álvarez, P., Arbib, Z., Barragán, J., Garrido, C., Perales, J. y Ruiz, J. (2013). Long term outdoor operation of a tubular airlift pilot photobioreactor and a high rate algal pond as tertiary treatment of urban wastewater. *Ecological Engineering*, 52, 143-153. doi:

10.1016/j.ecoleng.2012.12.089

Álvarez, V., López, I. y Vásquez, J. (2016). Remoción biológica de nutrientes en aguas residuales urbanas con fotobiorreactores utilizando microalgas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, (17), 3569-3580. Recuperado de

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263149506015>

- Andersen, R. y Kawachi, M. (2005). Traditional microalgae isolation techniques. Ámsterdam, Países Bajos: Elsevier. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/285783816_Traditional_microalgae_isolation_techniques
- Anderson, D., Au, D., Lam, P., Liu, W. y Wu, R. (2007). Effects of nutrients, salinity, pH and light: dark cycle on the production of reactive oxygen species in the alga *Chattonella marina*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 346(1-2), 76-86. doi: 10.1016/j.jembe.2007.03.007
- Andrade, C., Araujo, I., Cárdenas, C., Chacón, C. y Morales E. (2004). Uso de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 38(2), 94-108. Recuperado de http://bdigital.ula.ve/storage/pdf/bolcib/v38n2/art_03.pdf
- Andreottola, G., Foladori, P. y Petrini, S. (2018). Evolution of real municipal wastewater treatment in photobioreactors and microalgae-bacteria consortia using real-time parameters. *Chemical Engineering Journal*, 345, 507-516. doi: 10.1016/j.cej.2018.03.178
- Ángel, M., Pimienta, W. y Rubio, D. (2013). Incidencia del nitrógeno en la producción de biomasa y ácidos grasos de la microalga *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor de panel plano a escala laboratorio. *Revista De Investigación*, 6(1), 7-18. doi: 10.29097/2011-639x.140
- Angulo, E. R., Plaza, M. E., Puentes, D. M., Torres, J. G. y Vacca, V. A. (2017). Uso de la microalga *Chlorella* sp. viva en suspensión en la decoloración del agua residual de una empresa textil. *Revista Prospectiva*, 15(1), 93-99. doi: 10.15665/rp. v15i1.829

- Ansari, A. A., Gill, S. S. y Khan, F. A. (2010). Eutrophication: Threat to Aquatic Ecosystems. En A. Ansari, S. Gill, G. Lanza y W. Rast (Eds.), *Eutrophication: Causes, Consequences and Control* (pp. 143-170). Nueva York, Estados Unidos: Springer, Dordrecht. doi: 10.1007/978-90-481-9625-8_7
- Aranda, J., Flores, G., Luna, A., Rodas, H., Rodríguez, H., y Vidales, J. (2012). Efecto de la densidad celular de inoculación en el crecimiento de *Chlorella vulgaris* clv2 cultivada bajo condiciones mixotróficas. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 5(35), 83-86. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61024388015>
- Araujo, J. J. y Vargas, S. M. (2017). *Evaluación del efecto de tres concentraciones de microalgas Chlorella sp. y Scenedesmus sp. en la densidad poblacional del cladóceros Ceriodaphnia sp. en condiciones de laboratorio* (tesis de pregrado). Universidad Nacional De La Amazonia Peruana, Iquitos, Perú. Recuperado de <http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/handle/UNAP/5025>
- Arbib, Z., García, C. y Perales, J. (2015). Cinéticas de crecimiento y consumo de nutrientes de microalgas en aguas residuales urbanas con diferentes niveles de tratamiento. *Tecnología y Ciencias del Agua*, 6(1), 49-68. Recuperado de <http://www.scielo.org.mx/pdf/tca/v6n1/v6n1a3.pdf>
- Arce, M., Arredondo, B., Gómez, G., Voltolina, D. y Zenteno, T. (2017). *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*. La Paz, México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Recuperado de <https://www.cibnor.gob.mx/libro-de-microalgas>

- Ardila, A. M., Barajas, A. F. y González, Á. D. (2017). Producción de biomasa y proteínas de *Chlorella vulgaris* Beyerinck (Chlorellales: Chlorellaceae) a través del diseño de medios de cultivo selectivos. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 18(3), 451-461. doi: 10.21930/rcta.vol18_num3_art:736
- Arrieta, M., Castillo, M., Kamatkar, S., Morgado, W., Parody, A. y Vilorio, A. (2018). Concentrations and size distributions of fungal bioaerosols in a municipal landfill. En Y. Tan, Y, Shi y Q. Tang (eds.), *Data Mining and Big Data* (pp. 244–253). Shanghai, China: Springer. doi: 10.1007/978-3-319-93803-5_23
- AST Ingeniería S.L. (2013). *Aplicaciones de las microalgas: estado de la técnica*. Recuperado de <http://proyectomalgas.com/wp-content/uploads/2014/04/guiamalgas.pdf>
- Atlas, R. y Bartha, R. (2008). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Madrid, España: Pearson.
- Ávila, J. G. (2015). *Evaluación de la remoción de nitratos y fosfatos a nivel laboratorio por microalgas libres e inmovilizadas para el Tratamiento Terciario de Aguas Residuales Municipales* (tesis de pregrado). Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú. Recuperado de <http://repositorio.urp.edu.pe/handle/urp/899>
- Avila, J., Ayala, A., Montoya, H. y Silvera, R. (2018). Remoción de nitratos y fosfatos por cepas nativas de *Chlorella* sp. (Chlorellaceae) y *Chlamydomonas* sp. (Chlamydomonadaceae) libres e inmovilizadas en aguas residuales municipales. <http://dx.doi.org/http://doi.org/10.22497/arnaldoa.252.25210>
- Ávila, J., Laos, A. y Verano, R. (2018). Remoción de nitratos y fosfatos por cepas nativas de *Chlorella* sp. (Chlorellaceae) y *Chlamydomonas* sp. (Chlamydomonadaceae) libres e

- inmovilizadas en aguas residuales municipales. *Arnaldoa*, 25(2), 499-514. doi: 10.22497/arnaldoa.252.25210
- Baird, R. B., Eaton, A. D. y Rice, E. W. (2017). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd Edition*. Washington D.C., Estados Unidos: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. ISBN: 9780875532875.
- Bastidas, O. (2019). *Fórmula de la cámara de Neubauer*. Recuperado de <https://studylib.es/doc/4540608/f%C3%B3rmula-de-la-c%C3%A1mara-de-neubauer>
- Bellucci, M., Ficara, E., Fornaroli, R., Marazzi, F., Mezzanotte, V. y Rossi, S. (2019). Outdoor pilot trial integrating a sidestream microalgae process for the treatment of centrate under non optimal climate conditions. *Algal Research*, 39, 1-11. doi: 10.1016/j.algal.2019.101430
- Bernal, G. (2018). Bioprospección aplicada al tratamiento de aguas residuales: Estudio de casos y metodologías exitosas. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional Abierta y a Distancia.
- Blowers, P., Canter, C., Handler, R., Kalnes, T., Kholiqov, O., Lupton, F. y Shonnard, D. (2012). Evaluation of environmental impacts from microalgae cultivation in open-air raceway ponds: Analysis of the prior literature and investigation of wide variance in predicted impacts. *Algal Research*, 1(1), 83-92. doi: 10.1016/j.algal.2012.02.003
- Böchlzelt, H., Braunegg, G., Koinigg, M., Koller, M., Mittelbach, M., Pieber, S., ..., Tuffner, P. (2012). Characteristics and potential of micro algal cultivation strategies: a review. *Journal of Cleaner Production*, 37, 377-388. doi: 10.1016/j.jclepro.2012.07.044

- Cabrera, M. y Pulla, M. (2014). Línea base para el aprovechamiento de microalgas de sistemas de tratamiento de agua residual, (tesis de pregrado). Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador. Recuperado <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/20739>
- Caetano, N. S., Mata, T. M. y Martins, A. A. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217-232. doi: 10.1016/j.rser.2009.07.020
- Cai, T., Li, Y. y Park, S. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 19, 360-369. doi: 10.1016/j.rser.2012.11.030
- Caraballo, A. M. (2010). *Evaluación de los beneficios de las actividades de bioprospección realizadas por tres centros de investigación en Colombia* (tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. Recuperado de <http://bdigital.unal.edu.co/6276/1/699697.2010.pdf>
- Cárdenas, G. L. y Sánchez, I. A. (2013). Nitrógeno en aguas residuales: orígenes, efectos y mecanismos de remoción para preservar el ambiente y la salud pública. *Universidad y Salud*, 15(1), 72-88. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/reus/v15n1/v15n1a07.pdf>
- Carvajal, C., Castillo, M., Morgado, W., Parody, A., Perez, R., Posso, H. y Tarón, A. (2020) Evaluation of Enzymatic Extract with Lipase Activity of *Yarrowia Lipolytica*. An Application of Data Mining for the Food Industry Wastewater Treatment. En C. Yang, S. Peng y L. Jain (Eds.), *Security with Intelligent Computing and Big-data Services* (304-313). Cham, Alemania: Springer. doi: 10.1007/978-3-030-16946-6_24

- Castañeda, E. y Consuelo, L. (2016). Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus* sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova*, 13(26), 53-62. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v14n26/v14n26a06.pdf>
- Cervera, O. (2011). *Tratamiento de purines para la producción de biomasa microalgal*. Universidad de Almería, Almería, España. Recuperado de <http://hdl.handle.net/10835/473>
- Chai, L., Chen, L., Chen, Z., Crittenden, J., Du, H., Li, R. y Mao, G. (2019). Evaluation of eutrophication in freshwater lakes: A new non-equilibrium statistical approach. *Ecological Indicators*, 102, 686-692. doi: 10.1016/j.ecolind.2019.03.032
- Chang, J., Chen, C., Ho, S., Ling, T., Nagarajan, D., Phong, W., ..., Tan, C. (2017). Photobioreactors. En A. Pandey, C. Larroche, G. Du y M. Sanromán (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Bioprocesses, Bioreactors and Controls* (pp. 313-352). Amsterdam, Países Bajos: Elsevier. doi: 10.1016/b978-0-444-63663-8.00011-2
- Chen, P., Chen, Y., Li, Y., Liu, Y., Min, M., Ruan, R., ..., Wang, Y. (2010). Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(4), 1174-1186. doi: 10.1007/s12010-009-8866-7
- Chihara, M., Karube, I., Kishimoto, N., Sakai, N. y Sakamoto, Y. (1995). *Chlorella* strains from hot springs tolerant to high temperature and high CO₂. *Energy Conversion and Management*, 36(6-9), 693-696. doi: 10.1016/0196-8904(95)00100-R

- Chirivella, J., García, J., García, T., Pavía, M. y Serrano, Á. (2017). Principios de Biotecnología y Bioingeniería en el cultivo de microalgas: importancia, problemas tecnológicos, tipos y sistemas de cultivos, crecimiento, factores limitantes, selección, aislamiento, escalado y caracterización bioquímica. *Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación*, (9), 115-129. Recuperado de <https://revistas.ucv.es/index.php/Nereis/article/view/100/80>
- Choi, M., Leek, J., Park, S., Shin, C., y Sung, K. (1999). CO₂ fixation by *Chlorella* sp. KR-1 and its cultural characteristics. *Bioresource Technology*, 68(3), 269-273. doi: 10.1016/s0960-8524(98)00152-7
- Colorado, M. A., Moreno, D. A. y Pérez, J. L. (2013). Desarrollo, producción y beneficio ambiental de la producción de microalgas. La experiencia en La Guajira, Colombia. *Ambiente y Desarrollo*, 17(32), 113-126. Recuperado de <https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/ambienteysesarrollo/article/view/6049>
- Consejo Nacional de Política Económica y Social (CONPES). (2002). Acciones prioritarias y lineamientos para la formulación del plan nacional de manejo de aguas residuales. Bogotá, Colombia. Recuperado de <http://www.minvivienda.gov.co/conpesagua/3177%20-%202002.pdf>
- Corporación Autónoma Regional del Atlántico (CRA). (17 de agosto de 2017). Resolución No. 000580 de 2017. Recuperado de http://www.crautonomia.gov.co/documentos/resoluciones/18238_resol%20000580%20de%202017.pdf.

- Cuatis, L. N. (2018). *Propuesta de diseño de una planta de tratamiento de agua residual (PTAR) por lodos activados en el municipio de Soatá Boyacá* (tesis de pregrado). Universidad Católica de Colombia, Bogotá, Colombia. Recuperado de <https://hdl.handle.net/10983/22826>
- Dawson, C. y Hilton, J. (2011). Fertiliser availability in a resource-limited world: Production and recycling of nitrogen and phosphorus. *Food Policy*, 36, S14-S22. doi: 10.1016/j.foodpol.2010.11.012
- De la Vara, R. y Gutiérrez, H. (2012). *Análisis y diseño de experimentos*. México D.F., México: McGraw-Hill. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/44401609_Analisis_y_Disenio_de_Experimentos
- Díaz, V. y Ordoñez, C. (2006). *Evaluación del pH y la agitación del medio más adecuada para el crecimiento de Dunaliella salina en condiciones de laboratorio* (tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Recuperado de <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis19.pdf>
- Doran, P. (2013). *Bioprocess engineering principles, second edition*. Waltham, Mass.: Academic Press.
- Duarte, O. (2011). La bioprospección en Colombia. *Expediño*, (7), 17-25. Recuperado de <http://bdigital.unal.edu.co/6276/1/699697.2010.pdf>
- Escobar, R., Restrepo, J. y Tomic, M. (2018). Fluvial fluxes from the Magdalena River into Cartagena Bay, Caribbean Colombia: Trends, future scenarios, and connections with

upstream human impacts. *Geomorphology*, 302, 92-105. doi:
10.1016/j.geomorph.2016.11.007

Estrada, L. y Tafur, J. (2015). Tratamiento de aguas residuales in vitro por medio de la microalga *Chlorella* sp en el municipio de Barrancabermeja, Colombia. *Revista Ciencia, Tecnología, Sociedad y Ambiente*, 6(10), 5-19. Recuperado de <http://www.unipaz.edu.co/ojs/index.php/revcitecsa/index>

Fernández, M. (2013). Diseño, montaje y caracterización de fotobiorreactores airlift para el cultivo de la microalga *Chlorella sorokiniana* (tesis de pregrado). Universidad EAFIT, Medellín, Colombia. Recuperado de <https://repository.eafit.edu.co/handle/10784/8219>

Forero, M. A., Melgarejo, L. M., Montenegro, L. C. y Pinilla, G. A. (2016). Inmovilización de las microalgas *Scenedesmus ovalternus* (Scenedesmaceae) y *Chlorella vulgaris* (Chlorellaceae) en esferas de alginato de calcio. *Acta Biológica Colombiana*, 21(2), 437-442. doi: 10.15446/abc.v21n2.51253

Gallego, E., Herrera, L., Leal, E. y Manjarrez, L., (2013). Efecto de un carbón subbituminoso sobre el crecimiento y concentración de pigmentos de *Dunaliella salina* (Teodoresco, 1905) cultivada en fotobiorreactor de múltiples cámaras oscilantes. *Intropica*, 8, 69 - 78. Recuperado de <http://revistas.unimagdalena.edu.co/index.php/intropica/article/view/741>

García, L., Moncayo, S. y Pastuzo, M. (2016). Caracterización de pigmentos por espectrofotometría en una cepa de *Dunaliella viridis*, aislada de las salinas de Ecuasal. *Revista Científica Ciencias Naturales y Ambientales*, 10(2), 76-81. Recuperado de https://issuu.com/fcienciasnaturalesug/docs/revista_cientifica_ciencias_natural/84

- Gerba, C. P. y Pepper, I. L. (2019). Municipal Wastewater Treatment. En M. Brusseau, C. Gerba e I. Pepper (Eds.), *Environmental and Pollution Science* (pp. 393-418). San Diego, Estados Unidos: Academic Press. doi: 10.1016/b978-0-12-814719-1.00022-7
- Gómez, L., Kufundala, M., Ortega, Y., Salazar, D. y Silveira, Y. (2018). Variación de la composición de pigmentos de *Chlorella vulgaris* Beijerinck, con la aplicación del campo magnético estático. *Revista Cubana de Química*, 30(1), 55-67. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/ind/v30n1/ind05118.pdf>
- Gonçalves, A., Pires, J. y Simões, M. (2017). A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Research*, 24, 403-415. doi: 10.1016/j.algal.2016.11.008
- Gonzalo, F. G. (2018). *Evaluación del potencial de oxigenación de cepas autóctonas de microalgas y aplicación en procesos de depuración de aguas residuales* (tesis de maestría). Universidad de Valladolid, Valladolid, España. Recuperado de <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/32977>
- Gross, M., Kumar, K., Kunetz, T., Wen, Z. y Zhao, X. (2018). Evaluation of revolving algae biofilm reactors for nutrients and metals removal from sludge thickening supernatant in a municipal wastewater treatment facility. *Water Research*, 143, 467-478. doi: 10.1016/j.watres.2018.07.001
- Gutiérrez, L. R. (2017). *Diseño de un fotobiorreactor para la producción de biomasa a partir de la luz solar* (tesis de pregrado). Fundación Universidad de América, Bogotá, Colombia. Recuperado de <http://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/6569/1/6122918-2017-2-IQ.pdf>

- HACH. (2019). *DR3900 Espectrofotómetro con tecnología RFID*. Recuperado de <https://es.hach.com/dr3900-espectrofotometro-con-tecnologia-rfid/product-details?id=24821585772>
- Han, F., Li, Y., Shen, G., Wan, M., Wang, J. y Wang, W. (2013). Changes of biomass, lipid content and fatty acids composition under a light–dark cyclic culture of *Chlorella pyrenoidosa* in response to different temperature. *Bioresource Technology*, 132, 182-189. doi: 10.1016/j.biortech.2012.12.175
- Hankins, N. y Parveen, F. (2019). Comparative performance of nanofiltration and forward osmosis membranes in a lab-scale forward osmosis membrane bioreactor. *Journal of Water Process Engineering*, 28, 1-9. doi: 10.1016/j.jwpe.2018.12.003
- Haro, S., y Perales, J. (2015). Cinética de consumo de nutrientes y crecimiento de un *bloom* de microalgas en un fotobiorreactor *High Rate Algae Pond* (HRAP). *Tecnología y Ciencias del Agua*, 6(3), 15-31. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=353541047002>
- Havens, K. (2008). Cyanobacteria blooms: effects on aquatic ecosystems. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 619, 733-747. doi: 10.1007/978-0-387-75865-7_33
- Hendricks, D. (2011). *Fundamentals of water treatment unit processes* (1st ed.). Boca Raton, EE.UU: CRC Press.
- Hernández, A. y Labbé, J. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 157-173. doi: 10.4067/s0718-19572014000200001

Horsman, M., Lan, C., y Wang, B. (2012). Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. *Biotechnology Advances*, 30(4), 904-912. doi:

10.1016/j.biotechadv.2012.01.019

Huang, Q., Jiang, F., Wang, L. y Yang, C. (2017). Design of Photobioreactors for Mass Cultivation of Photosynthetic Organisms. *Engineering*, 3(3), 318-329. doi:

10.1016/J.ENG.2017.03.020

Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM). (2014). *Atlas*

Climatológico de Colombia. Recuperado de

<http://atlas.ideam.gov.co/visorAtlasClimatologico.html>

Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM). (2010). *Guía para el*

Monitoreo de Vertimientos, Aguas Superficiales y Subterráneas. Recuperado de

http://corponor.gov.co/corponor/sigescor2010/TRAMITESYSERVICIOS/Guia_monitoreo_IDEAM.pdf

Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM). (2018). *Metodologías*

de Análisis. Recuperado de <http://www.ideam.gov.co/web/agua/metodos-analiticos>

Jacob, E., Queiroz, L., Queiroz, M., Ramírez, L. y Streit, N. (2015). Producción de pigmentos naturales (clorofila-a) en biorrefinerías agroindustriales. *Ciencia y Tecnología*, 8(2), 29-

36. doi: 10.18779/cyt.v8i2.108

Jimenez, J. D. (2017). *Estudio de la producción de biomasa de Chlorella vulgaris crecida*

heterotróficamente sobre vinazas de la caña de azúcar (tesis de pregrado). Universidad

Icesi, Valle del Cauca, Cali. Recuperado de

http://repository.icesi.edu.co/biblioteca_digital/bitstream/10906/82476/1/TG01745.pdf

- Lan, C. y Wang, B. (2011). Biomass production and nitrogen and phosphorus removal by the green alga *Neochloris oleoabundans* in simulated wastewater and secondary municipal wastewater effluent. *Bioresource Technology*, 102(10), 5639-5644. doi: 10.1016/j.biortech.2011.02.054
- Lan, C. y Wang, C. (2018). Effects of shear stress on microalgae – A review. *Biotechnology Advances*, 36(4), 986-1002. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.03.001
- Larroche, C., Pandey, A. y Soccol, C. (2013). *Fermentation processes engineering in the food industry*. Boca Raton, Estados Unidos: CRC Press. doi: 10.1201/b14070
- Lei, Z., Li, B., Lu, B., Huang, W., Zhang, C., Zhang, Z. y Zhou, B. (2015). Effect of algae growth on aerobic granulation and nutrients removal from synthetic wastewater by using sequencing batch reactors. *Bioresource Technology*, 179, 187-192. doi: 10.1016/j.biortech.2014.12.024
- Lemus, G. R. (2003). *Biodegradation and environmental impact of lipid-rich wastes under aerobic composting conditions* (tesis doctoral). The University of British Columbia, Vancouver, Canada. doi: 10.14288/1.0058966
- Lerma, H. D. (2016). *Metodología de la investigación: Propuesta, anteproyecto y proyecto*. Bogotá, Colombia: Ecoe Ediciones. Recuperado de <https://books.google.com.co/books?id=COzDDQAAQBAJ>
- Liu, L., Shu, J., Wang, X., Wang, Y., Zhou, J. y Zhu, Y. (2013). Phytoplankton and Eutrophication Degree Assessment of Baiyangdian Lake Wetland, China. *The Scientific World Journal*, 2013, 1-8. doi: 10.1155/2013/436965

- Lizarazo, J., y Orjuela, M. (2013). Sistemas de plantas de tratamiento de aguas residuales en Colombia. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. Recuperado de <http://bdigital.unal.edu.co/11112/1/marthaisabelorjuela2013.pdf>
- López, S., y Meza, J. (2017). Eficiencia de la microalga *Chlorella* sp. para la remoción de nutrientes en las lagunas de oxidación de la ciudad de Manta (tesis de pregrado). Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, Manta, Ecuador. Recuperado de <https://repositorio.ulead.edu.ec/handle/123456789/98>
- Mandeville, P. B. (2012). Tema 28: Diseños experimentales. *Ciencia UANL*, 15(57), 151-155. Recuperado de <http://www.redalyc.org/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=40223164022>
- Manso, L. y Mayorga, C. (2017). Crecimiento de la microalga *Dunaliella* salina en un cultivador *Raceway* en condiciones de laboratorio. *Revista de Iniciación Científica*, 3(1), 85-91. Recuperado de <https://revistas.utp.ac.pa/index.php/ric/article/view/1702/2439>
- Mariano, M., Mayta, E., Montoya, H. y Tarazona, R. (2017). Crecimiento Poblacional y Productividad de la Microalga Nativa *Chlorella peruviana* bajo Diferentes Salinidades. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(4), 976-986. doi: 10.15381/rivep.v28i4.13004
- Mažeikienė, A. (2019). Improving small-scale wastewater treatment plant performance by using a filtering tertiary treatment unit. *Journal of Environmental Management*, 232, 336-341. doi: 10.1016/j.jenvman.2018.11.076
- Mendoza, J. (2019). Influencia de la intensidad de luz y pH en la remoción de materia orgánica (DBO5), de efluentes de remojo de curtiembre, utilizando microalga *Chlorella vulgaris*, a nivel laboratorio (tesis de maestría). Universidad Nacional José Faustino Sánchez

Carrión, Haucho, Perú. Recuperado de

<http://repositorio.unjfsc.edu.pe/handle/UNJFSC/2985>

Meza, L. D., Ortiz, M. T. y Romero, M. A. (2018). La biorremediación con microalgas (*Spirulina* máxima, *Spirulina platensis* y *Chlorella vulgaris*) como alternativa para tratar la eutrofización de la laguna de Ubaque, Colombia. *Revista de Investigación, Desarrollo e Innovación*, 9(1), 163-176. doi: 10.19053/20278306.v9.n1.2018.8153

Michels, M., Van, A., Vermuë, M. y Wijffels, R. (2015). Cultivation of shear stress sensitive and tolerant microalgal species in a tubular photobioreactor equipped with a centrifugal pump. *Journal of Applied Phycology*, 28(1), 53-62. doi: 10.1007/s10811-015-0559-8

Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible (Minambiente). (17 de marzo de 2017).

Resolución No. 0631 de 2015. Recuperado de http://corpouraba.gov.co/wp-content/uploads/Resoluci%C3%B3n-0631_2015.pdf

Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible (Minambiente). (18 de mayo de 2018).

Resolución No. 0883 de 2018. Recuperado de:

<http://portal.anla.gov.co/normatividad/resoluciones/resolucion-0883>

Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible (Minambiente). (18 de mayo de 2018).

Resolución No. 0883 de 2018. Recuperado de:

<http://portal.anla.gov.co/normatividad/resoluciones/resolucion-0883>

Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible (Minambiente). (25 de julio de 2014).

Resolución No. 1207 de 2014. Recuperado de <https://acuameunier.com/resolucion-1207-de-2014-reuso-2/>

Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. (22 de junio de 2007). Resolución

No. 2115 de 2007. Recuperado de

http://www.minambiente.gov.co/images/GestionIntegraldelRecursoHidrico/pdf/normativa/Res_2115_de_2007.pdf

Ministerio de ambiente, vivienda, y desarrollo territorial. (25 de octubre de 2010). Decreto No.

3930 de 2010. Recuperado de

http://www.minambiente.gov.co/images/normativa/decretos/2010/dec_3930_2010.pdf

Mohd, M. Z. (2008). *Bioremediation of oil from domestic wastewater using mixed culture:*

effects of inoculum concentration and agitation speed (tesis de pregrado). Universiti

Malaysia Pahang, Pahang, Malasia. Recuperado de

<http://iportal.ump.edu.my/lib/item?id=chamo:30963&theme=UMP2>

Muñoz, A. (2008). *Caracterización y tratamiento de aguas residuales*. Universidad Autónoma

del estado de Hidalgo, Hidalgo, México. Recuperado de

<https://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/handle/123456789/10873>

Muñoz, A., Ortiz, K. y Trejo, C. (2015). El crecimiento poblacional y su impacto en la

contaminación ambiental. *Revista Contribuciones a las ciencias Sociales*,(27).

Recuperado de <http://www.eumed.net/rev/cccss/2015/01/poblacion.html>

Muñoz, C. I. (2015). *Metodología de la investigación*. Ciudad de México, México: Oxford

University Press México, S.A. de C.V. Recuperado de

<https://books.google.com.co/books?id=DflcDwAAQBAJ>

Nawarkar, C. J. y Salkar, V. D. (2019). Solar powered Electrocoagulation system for municipal

wastewater treatment. *Fuel*, 237, 222-226. doi: 10.1016/j.fuel.2018.09.140

Olguín, E. J. (2012). Dual purpose microalgae–bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a Biorefinery. *Biotechnology Advances*, 30(5), 1031-1046. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.05.001

Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO). (2017). *Hecho 15: La contaminación del agua*. Recuperado de <http://www.unesco.org/new/es/natural-sciences/environment/water/wwap/facts-and-figures/all-facts-wwdr3/fact-15-water-pollution/>

Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO). (2017). *Hecho 15: La contaminación del agua*. Recuperado de <http://www.unesco.org/new/es/natural-sciences/environment/water/wwap/facts-and-figures/all-facts-wwdr3/fact-15-water-pollution/>

Orozco, A. (2014). *Bioingeniería de aguas residuales. Teoría y diseño*. Medellín, Colombia: Asociación Colombiana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental (ACODAL).

Patyna, A., Płaczek, M. y Witczak, S. (2017). Technical evaluation of photobioreactors for microalgae cultivation. *E3S Web of Conferences*, 19, 1-10. doi: 10.1051/e3sconf/20171902032

Pino, J. (2005). *Síntesis de la situación actual de la Ciénaga de Mallorquín con énfasis en la contaminación*. Recuperado de <http://www.crautonomia.gov.co/documentos/mallorquin/MallorquinContaminacion.pdf>.

Pizarro, R. y Ramos, R. (2018). Crecimiento y capacidad de biorremediación de *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) cultivada en aguas residuales generadas en el

cultivo del pez dorado *Seriola lalandi* (Perciformes: Carangidae). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 53(1), 75-86. doi: 10.4067/S0718-19572018000100075

Programa Mundial de Evaluación de los Recursos Hídricos de las Naciones Unidas (WWAP). (2017). Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos 2017. Aguas residuales: El recurso desaprovechado. París, UNESCO. Recuperado de <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000247647>

Ramírez, J. y Roldan, G. (2008). *Fundamentos de limnología neotropical*. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia.

Ramírez, M., Rendón, L. y Vélez, Y. (2015). *Microalgas para la industria alimenticia*. Recuperado de <https://repository.upb.edu.co/handle/20.500.11912/2306>

Romero, J. A. (2004). *Tratamiento de aguas residuales. Teoría y principios de diseño*. Bogotá, Colombia: Escuela Colombiana de Ingeniería.

Ruiz, A. (2011). *Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente* (tesis de maestría). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España. Recuperado de <https://riunet.upv.es/handle/10251/12831?show=full>

Ruíz, J., y Tovar, J. (2016). Propuesta de escalamiento de un fotobiorreactor para la microalga *Chlorella vulgaris* a nivel piloto (Tesis de pregrado). Fundación Universidad de América, Bogotá, Colombia. Recuperado de <http://hdl.handle.net/20.500.11839/825>

- Salazar, M. (2005). Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. *Contactos*, 59, 64-70. Recuperado de <http://www2.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n59ne/algas.pdf>
- Silva, S. (2015). Aislamiento y cultivo de microalgas. Secretaria de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación, Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec>
- Singh, P. y Singh, S. (2015). Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 50, 431-444. doi: 10.1016/j.rser.2015.05.024
- Solano, M. (2011). *Impacto ambiental por aguas residuales y residuos sólidos en la calidad del agua de la parte media- alta de la microcuenca del río Damas y propuesta de manejo* (tesis de pregrado). Universidad Nacional de Costa Rica, Heredia, Costa Rica.
- Urrutia, R. (2014). *Eutroficación y floraciones algales*. Recuperado de http://www.eula.cl/fonis/wp-content/uploads/2014/06/PP-Clase-1-RUrrutia-Eutrofizacion_2014.pdf
- Valenzuela, E. (2013). *Manual de Prácticas de Laboratorio de Cultivos de Apoyo*. Recuperado de http://fcm.ens.uabc.mx/licenciatura/Manuales_Laboratorio/BA/Etapa%20Disciplinaria/Manual%20de%20Laboratorio%20Cultivos%20de%20Apoyo%202013.pdf
- Van Der Walle, N. (1927). Über synthetische Wirkung bakterieller lipasen. *Cbl Bakt Parasitenk Inktionskr*, 70, 369–373. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042012000300001

- Vargas, E. H. (2016). *Evaluación técnica de la planta de tratamiento de agua residual (PTAR), de la inspección de Pueblo Nuevo del municipio de Nilo Cundinamarca* (tesis de pregrado). Universidad Católica de Colombia, Bogotá, Colombia. Recuperado de <http://hdl.handle.net/10983/13901>
- Varicon Aqua. (2016). 5 – 600L Airlift Photobioreactor [Gráfico]. Recuperado de: <http://www.variconaqu.com/products-services/alr-photobioreactors/>
- Verdugo, K. B. (2016). *Cultivo discontinuo de la microalga Coenochloris sp. con fracción soluble de papa (Solanum phureja) en condiciones mixotróficas* (tesis de pregrado). Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador. Recuperado de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/13226/1/UPS-QT10476.pdf>
- Vo, H., Ngo, H., Guo, W., Nguyen, T., Liu, Y., y Liu, Y. et al. (2019). A critical review on designs and applications of microalgae-based photobioreactors for pollutants treatment. *Science Of The Total Environment*, 651, 1549-1568. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.09.282
- Yen, H., Hu, I., Chen, C., Nagarajan, D., y Chang, J. (2019). Design of photobioreactors for algal cultivation. *Biofuels From Algae*, 225-256. doi: 10.1016/b978-0-444-64192-2.00010-x

Anexos**Anexo A. Diagramas de flujos metodológicos**

Se determinó el contenido de pigmentos: clorofila α y β , como se muestra en la figura 27.

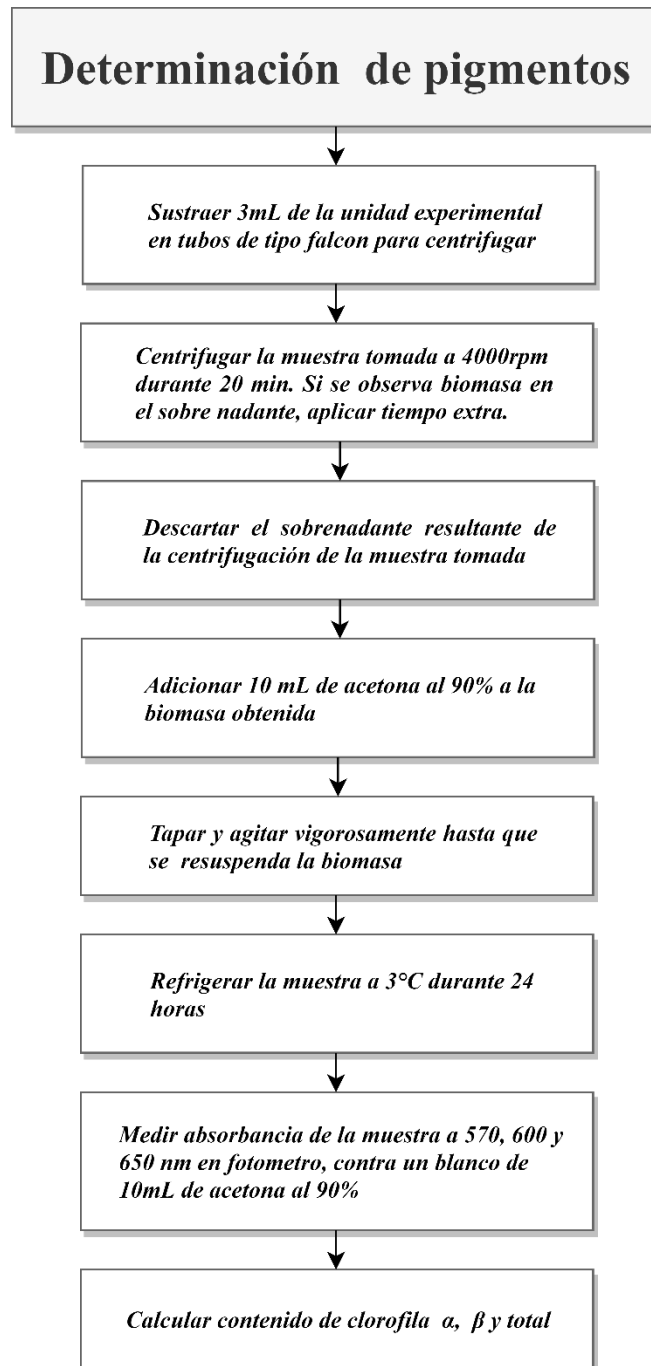


Figura 27. Diagrama de flujo sobre el método utilizado para la determinación de pigmentos. Fuente: Autores.

Para determinar las concentraciones de nitratos en las diferentes fases de la investigación se siguió la metodología que se muestra en la figura 28.

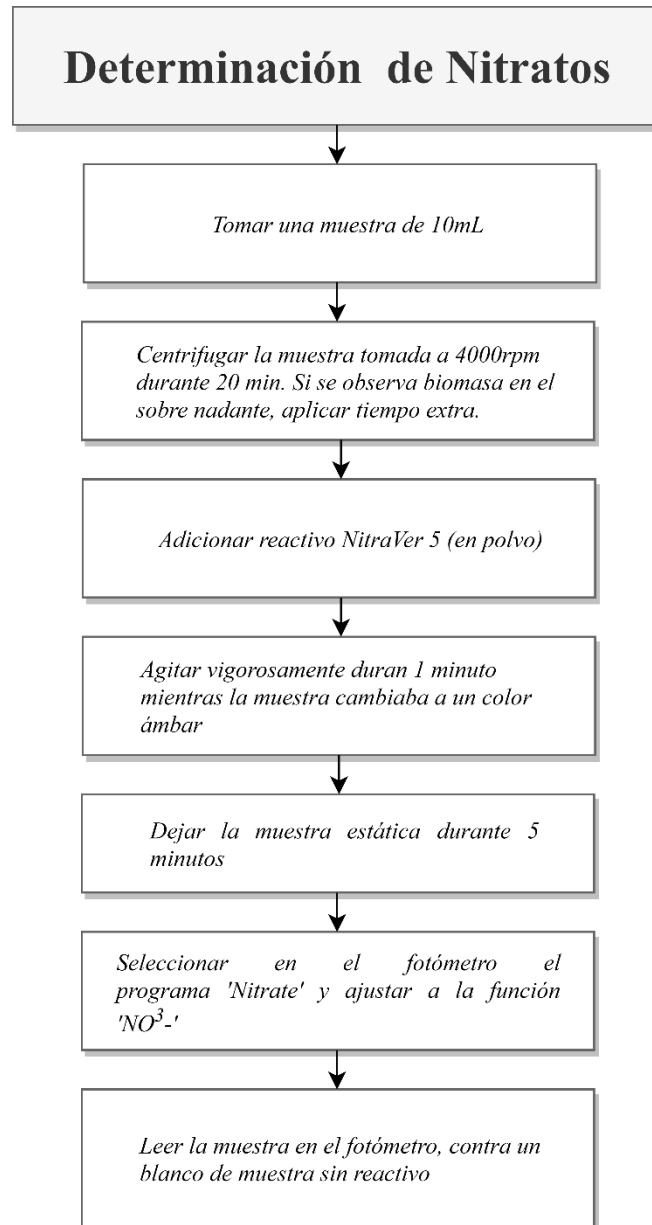


Figura 28. Diagrama de flujo sobre la determinación de la concentración de nitratos a través del método de reducción de cadmio. Fuente: Autores

Las concentraciones de fosfatos se determinaron a través del método Molibdovanadato como se muestra en la figura 29.

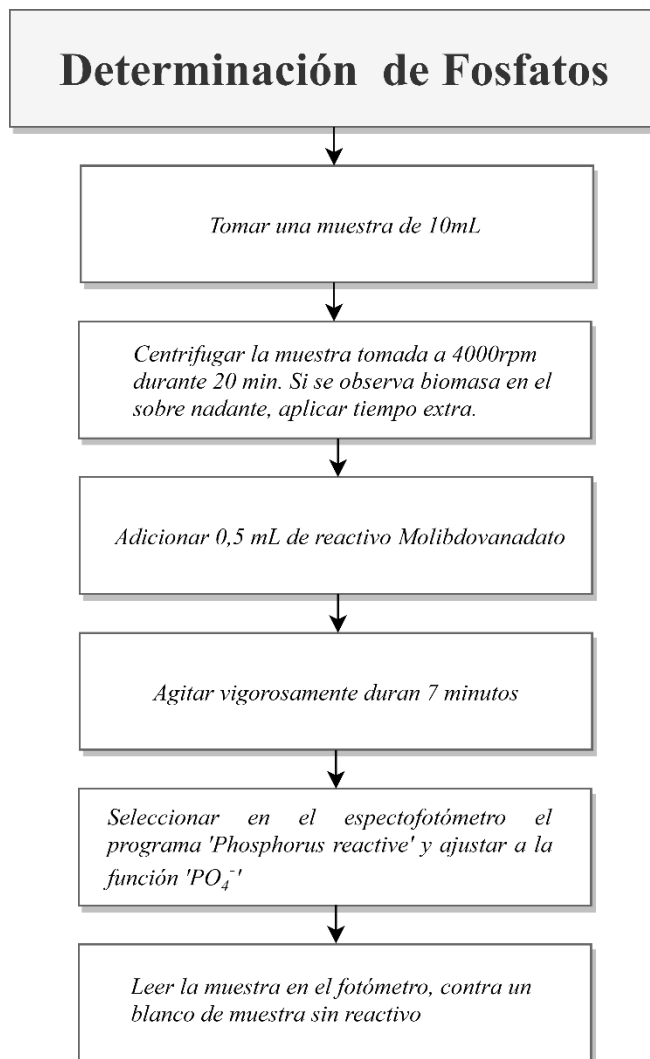


Figura 29. Diagrama de flujo sobre la determinación de fosfatos a través del método con Molibdovanadato. Fuente: Autores.

Anexo B. Ecuaciones matemáticas aplicadas

Para calcular la densidad celular en las diferentes fases, se aplicó la ecuación propuesta por Bastidas (2019):

$$\text{Concentración celular} = \frac{\text{Total de células contadas}}{\text{Número de cuadros contados}} \times 250000 \quad (\text{Ecuación 1})$$

Con el fin de calcular la tasa de duplicación, se utilizó la ecuación propuesta por Guillard:

$$r = \frac{\ln(X_1 - X_0)}{t_1 - t_0} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde “r” corresponde a la tasa específica de crecimiento de la población, “(X₁ - X₂)” es la diferencia entre la densidad celular final y la densidad celular inicial, y “(t₁ - t₀)” es la diferencia entre el tiempo final y el tiempo inicial.

El contenido de pigmentos, clorofila α y β, se calculó a través de la ecuación de Jeffrey y Humphrey (1975):

$$\text{Clorofila } \alpha \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \frac{11,93 \times A_{664} - 1,93 \times A_{647}}{v \times V} \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$\text{Clorofila } \beta \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \frac{20,36 \times A_{647} - 5,50 \times A_{664}}{v \times V} \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$\text{Clorofila } \alpha + \beta \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \text{Clorofila Total} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde “v” es el volumen de acetona en mL, “V” es el volumen de la muestra tomada del cultivo en L y “A” es la absorbancia medida en la longitud de onda indicada.

Con el fin de conocer la relación de una concentración de nutrientes respecto a otra, en unidades de porcentaje, se aplicó la siguiente ecuación (Cabrera, Carillo y Mejía, 2017):

$$\% \text{ Remoción} = \frac{\text{Afluente} - \text{Efluente}}{\text{Afluente}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 6})$$

Donde “Afluente - Efluente” es la diferencia entre la concentración inicial y la concentración final, y el “Afluente” es la concentración inicial de los parámetros evaluados.

Anexo C. Ecuaciones de modelos simples ajustados aplicados

La ecuación 7 fue obtenida de ajustar un modelo raíz cuadrada-X para describir la relación entre la concentración de PO_4^{3-} y la densidad celular en la fase 1.

$$PO_4 \left(\frac{mg}{L} \right) = 21.062 - 0.00327189 \times \sqrt{\text{Cell density}} \left(\frac{cel}{mL} \right) \quad (\text{Ecuación 7})$$

La ecuación 8 fue obtenida de ajustar un modelo raíz cuadrada-Y X-cuadrada para describir la relación entre NO_3^- y la densidad celular en la fase 1.

$$NO_3 \left(\frac{mg}{L} \right) = (2.81844 - 0.0 \times \text{Cell density} \left(\frac{cel}{mL} \right)^2) \quad (\text{Ecuación 8})$$