

UNIVERSIDAD DEL NORTE
Departamento de Ingeniería Mecánica



DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES ACUOSOS
ALQUITRANADOS USANDO MICROALGAS NATIVAS DEL DEPARTAMENTO DEL
ATLÁNTICO

Para la obtención del título de:
Magíster en Ingeniería Mecánica

ADRIANA FERNANDA RINCÓN MONTENEGRO

Director:

Ph.D ANTONIO JOSE BULA

Co Director:

MSc ALMA POLO

Barranquilla, Colombia

NOVIEMBRE 2015

Dedicatoria:

Cuando miro hacia atrás y me doy cuenta de todo este proceso de lucha, esfuerzo, alegrías y aprendizaje, solo salen de mi corazón sentimientos y palabras de agradecimiento con Dios y la vida por haberme dado la maravillosa oportunidad de realizar este viaje que culmina hoy con este resultado, resultado que no solamente es mío, siempre conté con la colaboración y apoyo de mis amigos, mi familia y personas que se involucraron de alguna manera con este logro. Quiero agradecerles de manera especial a mis amigos Jesús García e Iván Gómez, saben que son mis hermanos, su cariño, cuidado, enseñanzas, apoyo, tesón y trabajo fueron fundamentales para alcanzar esta meta. Dedico este logro a mis ángeles de luz, Daniel y David, su sacrificio de tiempo a mi lado se ve reflejado en lo que alcanzamos hijos, quiero que de este proceso les quede la enseñanza que no importa lo que cuesten los sueños son para alcanzarlos, para esto hay que ser perseverantes y trabajadores no basta solo con soñar. A mis padres sé que mis triunfos son también de ustedes.

Agradecimientos:

A mis docentes, Alma Polo y Antonio Bula, por todo su apoyo y orientación

A Alberto Albis, tu orientación, exigencia y apoyo sobretodo en la culminación del proceso.

A Kevin Meléndez, por toda su colaboración y apoyo

Al profesor Amner Muñoz, por sus enseñanzas y exigencia.

Al Señor Ricardo Jiménez por toda su colaboración, al empezar con este proyecto faltaban muchas cosas y usted siempre estuvo ahí.

Por último pero no menos importante a Yuleis Sanes por ser mi mano derecha con mis hijos y la casa.

TABLA DE CONTENIDO

1. Resumen.....	6
2. Introducción.....	8
2.1. Relevancia del tema de investigación	10
2.2. Objetivos de la investigación	12
2.2.1. Objetivo General	13
2.2.2. Objetivos Específicos.....	13
3. Revisión del estado del arte	14
3.1. Composición de los alquitranes producidos durante la gasificación de biomasa	15
3.1.1. Composición de los alquitranes dependiendo del tipo de biomasa.....	18
3.1.2. Alquitranes obtenidos dependiendo del tipo de gasificador	20
3.2. Remoción de los compuestos tipo Tar de la corriente de producción en gasificación	22
3.3. Tratamiento de efluentes a partir de microalgas.....	24
3.4. Crecimiento de cultivos de microalgas	26
3.5. Medición del crecimiento de los cultivos de microalgas	32
3.6. Métodos para la Caracterización de aguas alquitranadas provenientes del proceso de gasificación y muestras tratadas por biorremediación.....	34
3.7. Factores que intervienen en la biorremediación de aguas de desecho usando microalgas	38
3.8. Efecto de condiciones estresantes en el cultivo de microalgas	40
4. Metodología	41
4.1. Ubicación.....	42
4.2. Materiales y equipos.....	43
4.2.1. Materiales	43
4.2.2. Equipos.....	44
4.3. Métodos.....	45

4.3.1. Recolección, mantenimiento y Cultivo de Microalgas:	45
4.3.2. Caracterización de aguas alquitranadas provenientes del proceso de gasificación	48
4.3.3. Tratamiento del Agua alquitranada con microalgas.	51
4.3.3.1. Prueba de supervivencia I:	52
4.3.3.2. Prueba de supervivencia II:	53
4.3.3.3. Prueba de supervivencia III:	54
4.3.3.4. Prueba de supervivencia IV:.....	57
4.3.3.5. Diseño Factorial para microalgas adaptadas y sistema modelo de contaminantes:.....	58
5. Resultados	61
5.1. Cultivos de Microalgas	61
5.2. Caracterización de aguas alquitranadas provenientes del proceso de gasificación	72
5.3. Tratamiento de Agua alquitranada con microalgas.	75
5.3.1. Prueba de supervivencia I:.....	75
5.3.2. Prueba de supervivencia II.....	77
5.4. Resultados y análisis.....	78
5.4.1. Prueba de supervivencia III:.....	94
5.4.2. Prueba de supervivencia IV:	101
5.4.3. Diseño experimental factorial :	103
6. CONCLUSIONES	110
7. Trabajos futuros:	113

1. Resumen

Las necesidades energéticas del momento han desencadenado diferentes estudios para el desarrollo de nuevas tecnologías que presentan alternativas para la producción de nuevos combustibles. La gasificación se presenta como una alternativa promisoría para cubrir la demanda de combustibles alternativos en regiones apartadas donde se tiene alta disponibilidad de biomasa, la cual no es de fácil aprovechamiento en términos de producción de energía. Sin embargo se producen diferentes sustancias intermedias, comúnmente llamados alquitranes, indeseables para los fines del gas de síntesis y altamente tóxicas para el ambiente y los seres vivos. Así, se plantea como alternativa la biorremediación de dichos residuos a partir de microalgas. En esta investigación se establecieron varios enfoques para abordar el problema. En primer lugar, se construyeron las metodologías necesarias para la recolección, identificación, cultivo, preservación, almacenamiento, aislamiento y adaptación de microalgas. En el caso específico de esta investigación, estas microalgas pertenecen a cuatro cuerpos de agua del departamento del Atlántico: ciénaga de Mallorquin, laguna de Luruaco, Lago del Cisne y un brazo del río Magdalena en inmediaciones del municipio de Sabanagrande. En segundo lugar, la producción de los alquitranes depende de muchos factores, como temperatura de gasificación, tipo de gasificador, composición de la biomasa, entre otras. Por lo tanto los efluentes alquitranados provenientes de los postratamientos del producto de la gasificación de cuatro biomásas diferentes fueron analizados y caracterizados por grupos generales de alquitranes. Las biomásas bajo estudio, propias de la región caribe, fueron: *zea mays* (maíz), *Coco nutifera* (coco), *Sesamun indicum* (ajonjolí), y *Oryza sativa* (arroz). Por último, con el fin de evaluar el potencial de biorremediación de los efluentes del proceso de remoción de alquitranes indeseables en la corriente de producto de gasificación de dichas biomásas se realizaron diferentes pruebas de supervivencia que orientaron la ruta de trabajo a seguir. La estructura temática del estudio se muestra en la Figura 1.

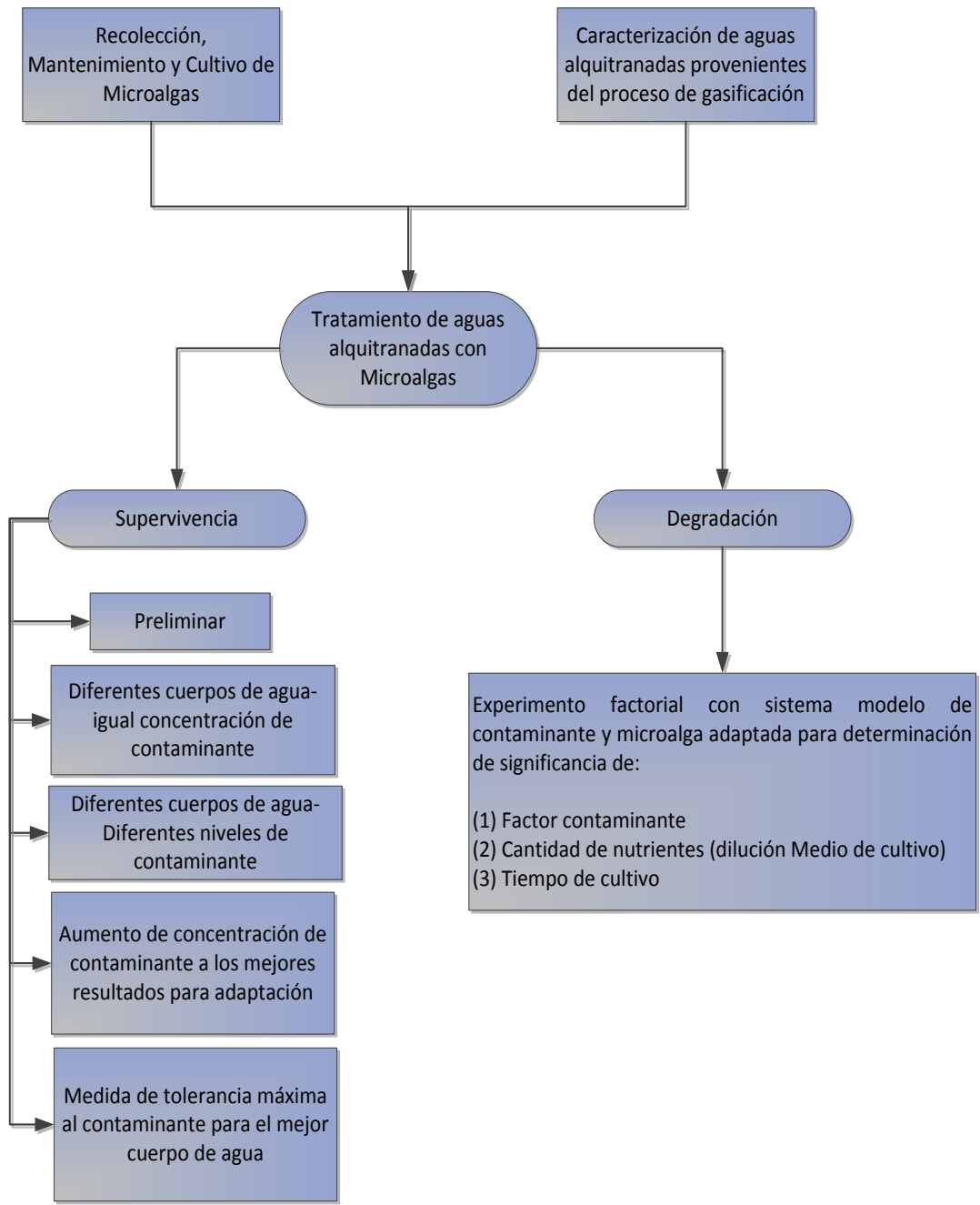


Figura 1. Abstract gráfico del estudio

2. Introducción

La contaminación de las aguas debido a componentes orgánicos es uno de los temas que más preocupan a nivel mundial por su alta toxicidad y potencial daño en la salud de los seres humanos y en los ecosistemas; entidades como la OSHA (Occupational Safety and Health Administration) y la EPA (Environmental Protection Agency), se encargan de vigilar cualquier efluente, bien sea aguas costeras o ríos tierra adentro, son fácilmente susceptibles a muchos tipos de desechos industriales, urbanos y rurales. Un efecto no deseado ya que dichos cuerpos de agua se encuentran en constante uso. En este sentido, los componentes hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH, en inglés), representan la familia de compuestos orgánicos que más ha recibido atención, debido a su comprobado efecto cancerígeno en muchos experimentos llevados a cabo con animales [1]. Tal y como trata de ser explicado por su nombre, los PAH son componentes que poseen varios anillos de benceno fusionados. De esta manera la estructura resultante es una molécula donde todos los átomos de carbono e hidrógeno se encuentran contenidos en un mismo plano. Así, la diversidad de estos compuestos es enorme, teniendo desde compuestos como el naftaleno ($C_{10}H_{18}$), o el coroneno ($C_{24}H_{12}$), donde además es posible tener diferentes tipos de sustituyentes en varias posiciones del anillo aromático [2], algunos ejemplos de este tipo de compuestos se muestran en la Figura 2.

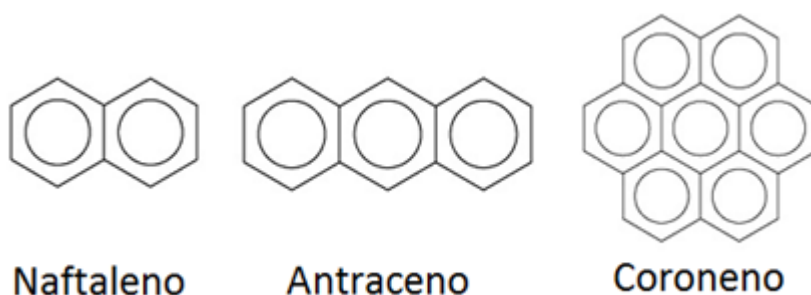


Figura 2. Ejemplos de compuestos tipo PAH, modificado de [3].

La mayor fuente de compuestos PAH se deriva del uso de material orgánico para llevar a cabo procesos de combustión y pirólisis [1], [4]. Por lo tanto, pueden tener tanto causas meramente naturales como la combustión de materia vegetal en bosques así como un origen antropomórfico, mediante muchos procesos llevados a cabo por los seres humanos. Dentro de estas actividades se pueden mencionar el procesamiento, combustión y disposición de combustibles fósiles. La contaminación de zonas industriales con PAH

comúnmente se asocia con derrames y fugas en tanques de almacenamiento durante el transporte, procesamiento y disposición de combustibles y olefinas [5], [6].

Uno de los procesos que llevan inherentemente la producción de compuestos tipo PAH es la gasificación. Esta se considera una tecnología antigua (practicada comercialmente desde 1812 por una compañía de gas en Londres) en la que se puede producir combustibles gaseosos a partir de materia que contenga carbón. Dicha tecnología se basa en la destilación seca o pirolisis, en la cual se calienta la materia prima en ausencia de oxígeno, lo que conlleva a una descomposición térmica que produce gases combustibles volátiles y carbón sólido.

De manera tal que, dependiendo del tipo de aplicación que se tenga pensada para usar el gas producido a través de la gasificación, la presencia de estos compuestos alquitranados puede resultar perjudicial. Para el caso que compete a esta investigación el gas producido mediante este proceso es utilizado para alimentar motores de combustión interna. El principal problema en dichos motores es la condensación de los Tars y posterior taponamiento en las líneas de suministro de combustible, en el mezclador de aire-combustible y en las válvulas de entrada. Esta última trae problemas cuando se quiere reiniciar el motor después de que se ha enfriado. La razón para este comportamiento se encuentra en el endurecimiento del sistema de válvulas, lo cual evita que se puedan abrir nuevamente [7].

Remover los Tars del gas producido en la gasificación es un inconveniente al cual se le han dedicado diversos recursos en investigación [8]. Actualmente, las tecnologías para llevar a cabo esta tarea pueden ser divididas en dos enfoques. En primer lugar, se tienen los métodos indirectos entre los cuales se incluye el craqueo catalítico o térmico de dichos compuestos aguas abajo del proceso. También se tienen métodos mecánicos tales como los ciclones, los filtros, los separadores rotatorios de partículas y los despojadores (scrubbers, termino en inglés). Y en segundo lugar, en los métodos directos, se inclinan por la manipulación del proceso de gasificación para eliminar dichos compuestos. Enfoques de este procedimiento incluyen la manipulación de parámetros de operación del proceso, modificaciones al esquema del gasificado y el uso de catalizadores/aditivos [8].

La remoción de los compuestos alquitranados a través de un método indirecto es una opción que ha demostrado ser efectiva en el tratamiento de los gases provenientes del proceso de gasificación [9]. En el equipo experimental al cual se tiene acceso en la Universidad del Norte, se tiene un sistema con remoción indirecta de los compuestos

alquitranados a través del lavado con agua del producto gaseoso. Ésta opción permite mover dichos compuestos desde una fase gaseosa hasta una líquida. Esto significa que la remediación de los efluentes acuosos derivados de este proceso es un paso crítico que debe ser estudiado con la finalidad de promover este tipo de alternativas.

A pesar de la necesidad inherente de producir energía y de tener nuevas alternativas de combustibles disponibles para los diferentes procesos que los requieren, no se puede desconocer que en esta carrera se producen sustancias contaminantes indeseadas en diferentes efluentes como el aire y agua, estos al llegar al ambiente pueden presentar transformaciones físicas, químicas, y/o biológicas, cuyo efecto puede desencadenar afectaciones al ecosistema y a los seres vivos, por lo tanto es necesario evaluar medidas sostenibles, con las cuales se reduzca el impacto que se genera sobre el ambiente con los diferentes efluentes.

2.1. Relevancia del tema de investigación

Como se mencionó anteriormente, los compuestos alquitranados tienen un efecto perjudicial para la salud, sobre todo por sus efectos cancerígenos. Tradicionalmente para su remoción se han empleado técnicas que incluyen la alteración o aislamiento del contaminante, como por ejemplo la excavación del suelo contaminado para posterior incineración o almacenamiento. No obstante, este tipo de tratamiento es costoso, y en muchos casos el contaminante se transfiere de una fase a otra. Es en este punto donde la biorremediación se convierte en una alternativa válida para tratar dichos desechos. Así, el principal objetivo de un tratamiento biológico sobre desechos peligrosos consiste en transformar a compuestos menos peligrosos (o no peligrosos) usando una menor cantidad de químicos, energía y tiempo [3]. En este sentido, el uso de organismos tales como las microalgas han tenido en una gran variedad de aplicaciones para el tratamiento de aguas residuales, para la generación de energía e incluso como intercambiadores fotosintéticos de gases para viajes espaciales. De hecho, muchas de estas aplicaciones apuntan a tener una sostenibilidad industrial que sea capaz de lograr una producción estable a través de “diseños para el ambiente” [10].

Dado que dichos compuestos se consideran peligrosos, existen varias instituciones encargadas de indicar los estándares de exposición a estos. Se tiene un estándar asociado

al lugar de trabajo y otro para los niveles en el agua potable. Por ejemplo, la OSHA (“Occupational Safety and Health Administration”, de EEUU) sugiere un nivel máximo permisible en el lugar de trabajo de $0,2 \text{ mg/m}^3$ para un periodo de 8 horas. El NIOSH (“National Institute for Occupational Safety and Health”, de EEUU) indica que valores de $0,1 \text{ mg/m}^3$ para un día laboral de 10 horas. Por otro lado la EPA (“Environmental Protection Agency” de EEUU) declaró en 1980 una medida de exposición en el agua cuya meta es cero compuestos del tipo PAH, así el nivel máximo de benzo(a)pireno, el PAH más cancerígeno, debe encontrarse a lo sumo en $0,2 \text{ ppb}$ (Partes por billón) [11].

En el caso de Colombia se tiene la norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes: recurso agua, libro VI anexo 1. Esta norma técnica ambiental se dicta bajo el amparo de la Ley de Gestión Ambiental y del Reglamento a la Ley de Gestión Ambiental para la Prevención y Control de la Contaminación Ambiental. En dicha norma se especifican los siguientes límites para los compuestos aromáticos policíclicos.

Tabla 1. Límites máximos permisibles para aguas de consumo humano y uso doméstico, que únicamente requieren tratamiento convencional.

Parámetros	Expresado Como	Unidad	Límite Máximo Permissible
Hidrocarburos Aromáticos			
Benceno	C_6H_6	$\mu\text{g/l}$	10,0
Benzo(a)pireno		$\mu\text{g/l}$	0,01
Etilbenceno		$\mu\text{g/l}$	700
Estireno		$\mu\text{g/l}$	100
Tolueno		$\mu\text{g/l}$	1 000

Tabla 2. Límites máximos permisibles para aguas de consumo humano y uso doméstico que únicamente requieran desinfección.

Parámetros	Expresado Como	Unidad	Límite Máximo Permissible
------------	----------------	--------	---------------------------

Hidrocarburos Aromáticos			
Benceno	C ₆ H ₆	mg/l	0,01
Benzo-a- pireno		mg/l	0,00001

Tabla 3. Criterios de calidad admisibles para la preservación de la flora y fauna en aguas dulces, frías o cálidas, y en aguas marinas y de estuario.

Parámetros	Expresados como	Unidad	Límite máximo permisible		
			Agua fría dulce	Agua cálida dulce	Agua marina y de estuario
Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)	Concentración total de HAPs	mg/l	0,0003	0,0003	0,0003

Tabla 4. Criterios referenciales de calidad para aguas subterráneas, considerando un suelo con contenido de arcilla entre (0-25,0) % y de materia orgánica entre (0 - 10,0)%.

Parámetros	Expresado como	Unidad	Límite máximo Permissible
Compuestos aromáticos.			
Benceno.	C ₆ H ₆	µg/l	15
Tolueno.		µg/l	500
Estireno		µg/l	150
Etilbenceno		µg/l	75
Xileno (Suma) ¹		µg/l	35
Fenol		µg/l	1 000
Cresol ²		µg/l	100
Hidroquinona		µg/l	400
Hidrocarburos aromáticos policíclicos.			
Naftaleno		µg/l	35
Fenantreno.		µg/l	2,5
Antraceno		µg/l	2,5
Fluoranteno		µg/l	0,5

2.2. Objetivos de la investigación

¹ Sumatoria de las formas: Meta, orto y paraxileno

² Sumatoria de las formas: Meta, orto y paracresol.

2.2.1. Objetivo General

Determinar el potencial de aplicación de microalgas nativas del departamento del Atlántico en la biorremediación de efluentes acuosos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos.

2.2.2. Objetivos Específicos

- Establecer una metodología de recolección, almacenamiento, clasificación, cultivo, aislamiento y adaptación necesario para las microalgas que se van a trabajar en la remediación de compuestos alquitranados.
- Recolectar, almacenar, clasificar, cultivar y adaptar microalgas para realizar pruebas de supervivencia en medios de cultivo contaminados con compuestos alquitranados.
- Crear una metodología para la identificación de grupos de contaminantes en los efluentes resultantes del lavado de los gases producto de la gasificación de diferentes biomasa.
- Llevar a cabo pruebas analíticas que muestren los tipos de sustancias contenidas en el agua de lavado.
- Desarrollar una metodología para determinar la ruta de remediación con microalgas de efluentes de la remoción de alquitranes de corrientes gaseosas producto de gasificación de biomasa.
- Determinar que combinación de microalgas de las estudiadas son capaces de sobrevivir y crecer en el medio de cultivo contaminado con hidrocarburos policíclicos aromáticos

3. Revisión del estado del arte

La biomasa es uno de los materiales orgánicos que se encuentran en mayor proporción en la tierra. Este tipo de materia se produce mediante las reacciones de fotosíntesis en las plantas, por lo que es considerada una de las maneras más comunes de almacenar la energía solar en forma de energía química. Esta energía puede ser recuperada mediante conversiones termoquímicas entre las cuales se tienen combustión, gasificación y pirolisis. En este sentido las reacciones de combustión permiten liberar directamente dicha energía al promover el rompimiento de los enlaces primarios de la biomasa. Sin embargo, no es precisamente la mejor opción, de manera que utilizar los procesos de gasificación o pirolisis permite convertir esta energía en productos secundarios que pueden ser mucho más adecuados para el alimento de dispositivos como hornos o motores. Basándose en las ventajas en términos de eficiencia energética, la gasificación es considerada como la mejor opción para explotar la energía contenida en la biomasa [12].

La tecnología tuvo un auge importante en Europa entre los años 1920 y 1940, como respuesta anticipada al suministro irregular de petróleo. De esta manera durante la Segunda Guerra Mundial, miles de gasificadores tipo co-corriente (*downdraft*) se usaron como alternativa para aplicaciones automotrices, para luego ser discontinuados debido a la disponibilidad de combustibles líquidos económicos que secundo dicha época. Posteriormente, durante la crisis energética de la década de 1970, se volvió a mirar la gasificación como una alternativa económica para ser aplicada a pequeña escala en la generación de electricidad en países en desarrollo que sufrían los estragos de los altos precios del petróleo [7].

El objetivo principal de la gasificación es obtener un gas de síntesis homogéneo con poder calorífico alto, principalmente está formado de monóxido de carbono (CO), hidrógeno (H₂), dióxido de carbono (CO₂), vapor de agua (H₂O), metano (CH₄), nitrógeno (N₂), algunos hidrocarburos en muy baja cantidad y contaminantes como las partículas de carbono, alquitrán y cenizas [13] pero variables como el tipo de reactor (gasificador), tiempo de residencia, temperatura y presión a la cual se llevan a cabo las reacciones, material a gasificar entre otras, son determinantes en la composición de los productos obtenidos, sobre todo de las impurezas que acompañan al gas de síntesis [14]. Los productos obtenidos de la gasificación dependen entre otras variables del material de partida, en este

estudio se manejarán los residuos de la gasificación de una biomasa, los principales componentes de la biomasa son extractos, fibras y cenizas [15], [16]. Comprenden cuatro elementos principales, que son: carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O) y nitrógeno (N). Aunque también puede contener pequeñas cantidades de cloro (Cl) y azufre (S). El último rara vez presente en la biomasa vegetal.

3.1. Composición de los alquitranes producidos durante la gasificación de biomasa

Específicamente, dentro de los procesos de gasificación, los compuestos no deseados (entre ellos los aromáticos en su mayoría) que se producen se conocen como Tar o compuestos alquitranados, cuya naturaleza dependerá de muchos factores como el tipo de gasificador, las condiciones de gasificación, y el tipo de biomasa. Dichos componentes tienen un origen en común el cual proviene de la lignina, la celulosa y la hemicelulosa. Los Tars primarios (alcoholes, cetonas, aldehídos) pueden formarse de cualquiera de estas tres materias primas, específicamente de la celulosa y hemicelulosa por su alto contenido de oxígeno. Contrariamente los bi y trifuncional monoaromáticos mayormente sustituidos a fenoles ocurren de la lignina. Así, dependiendo de las proporciones de cada uno de estos compuestos en la biomasa a ser gasificada, entonces se tendrán diferentes proporciones de los Tars mencionados anteriormente, el proceso de gasificación está compuesto por algunas etapas que son generales independientemente del tipo de gasificador, o el tipo de biomasa que se utilice para producir el gas producto, en la Figura 3 se ilustra de manera general el proceso de gasificación. Es importante mencionar que ninguna de estas fuentes podría desencadenar la formación de Tars terciarios, estos son producto de la condensación de los Tars primarios y secundarios a temperaturas altas (superiores de 700 °C). En la Figura 4 se muestra un esquema de los Tars obtenidos a partir de la lignina [17]. Una de las variables que puede indicar de mejor forma las proporciones en que se encuentran los compuestos alquitranados es la temperatura. En este sentido, a medida que aumenta la temperatura se favorece la producción en principio de los Tars secundarios y posteriormente de los Tars terciarios. Esto puede observarse en la Figura 5 presentada por Milne y colaboradores [18].

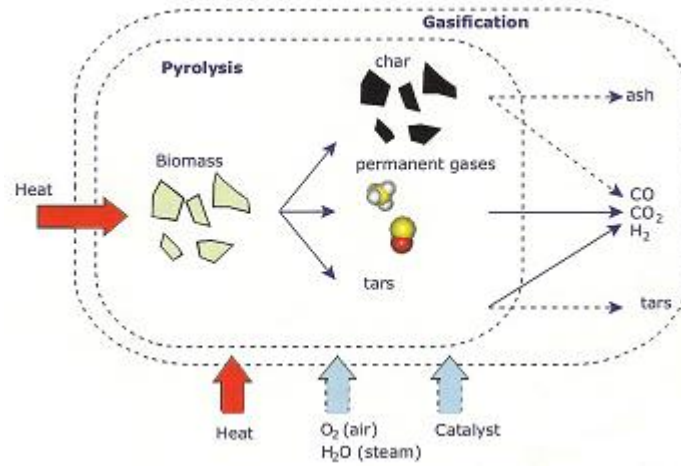


Figura 3. Diagrama general de la gasificación.[19]

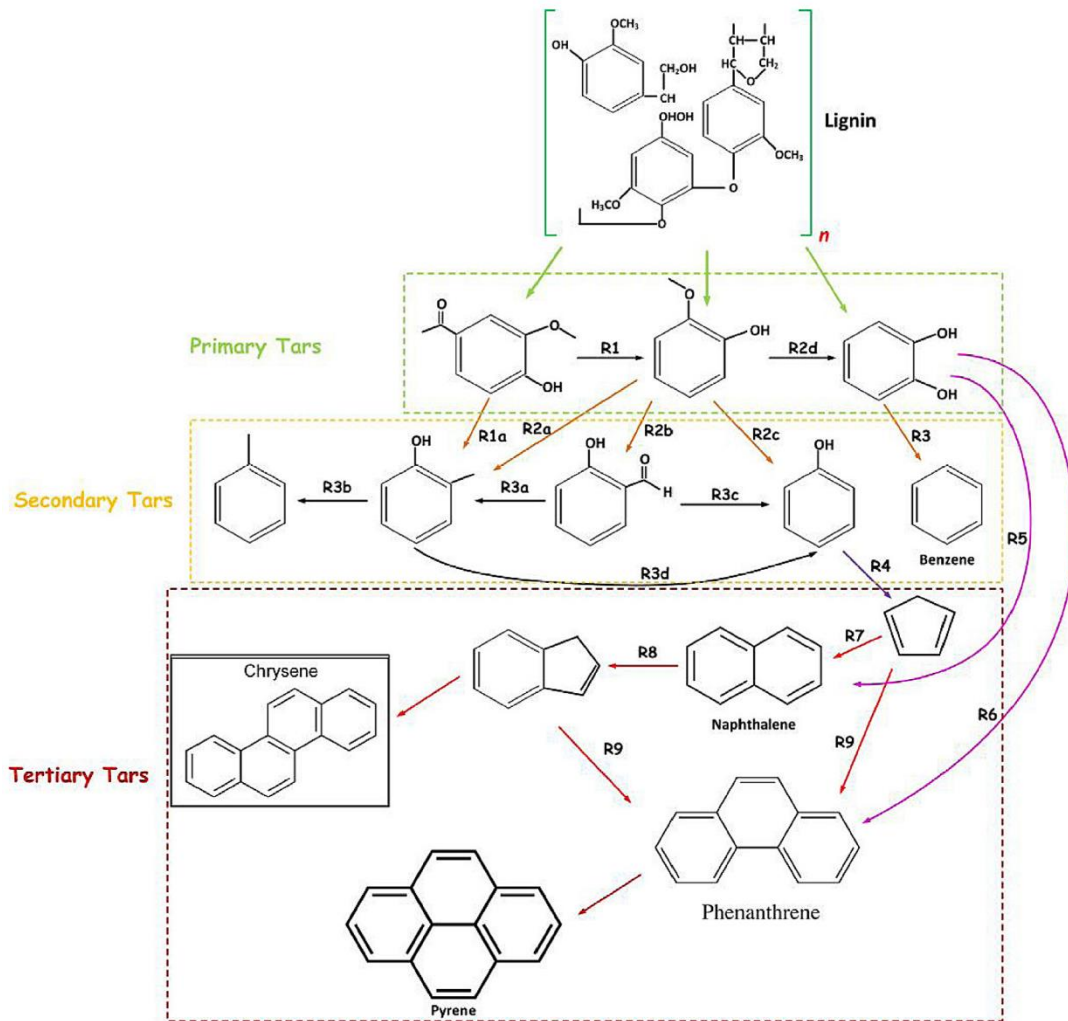


Figura 4. Tars producidos a partir de la lignina [20].

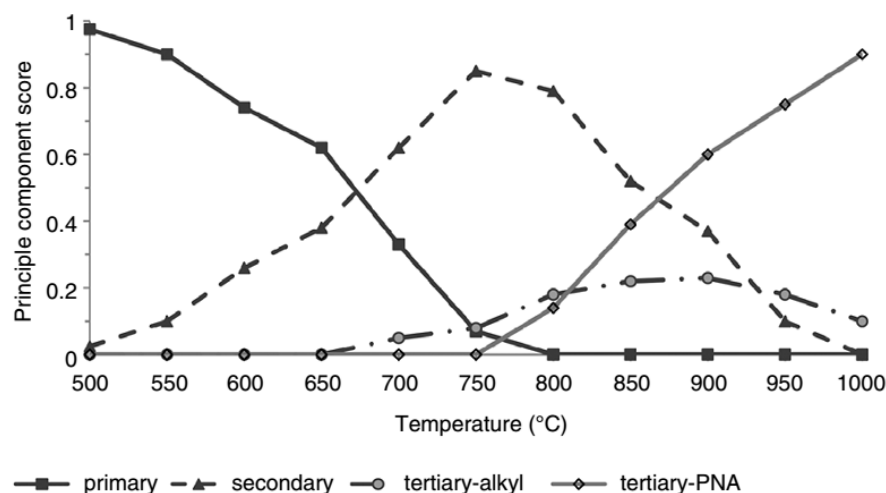


Figura 5. Proporción de los Tars obtenidos en la gasificación de biomasa en función de la temperatura de operación [18].

Como se mencionó anteriormente, los compuestos alquitranados consisten en cientos de hidrocarburos condensables, entre los cuales se incluyen desde anillos simples hasta anillos múltiples aromáticos, asociados además con otros hidrocarburos oxigenados e hidrocarburos complejos policíclicos aromáticos. Dado que la variedad de compuestos es tan extensa, amplios esfuerzos se encuentran orientados hacia la identificación de estos componentes y la manera en que interaccionan entre sí. Como consecuencia también se han desarrollado clasificaciones de estos componentes dependiendo de su comportamiento [21], [22]. Una de las posibles clasificaciones es la presentada por Milne et al [18]. Donde se define que los Tars pueden ser divididos en cuatro grupos los cuales son: (1) “Productos Primarios” los cuales se caracterizan por ser derivados de la celulosa, hemicelulosa y la lignina. (2) “Productos Secundarios” caracterizados por compuestos fenólicos y olefinas. (3) “Productos alquilo-terciarios” los cuales son derivados metílicos de los compuestos aromáticos. Y (4) “Productos condensados terciarios” conformados por los compuestos PAH (*Poly-Aromatic Hydrocarbon*, en inglés) sin grupos sustituyentes. Otra clasificación que puede resultar un poco más fácil de entender es la realizada por el Energy research Center of The Netherlands (ECN), Toegepast Natuurwetenschappelijk Onderzoek (TNO) y University of Twente (UT). Dicha clasificación se basa principalmente en la solubilidad y condensabilidad de los diferentes componentes Tar. En la Tabla 5 se muestra dicha clasificación [22], [23].

Tabla 5. Clasificación de los Tars respecto a su solubilidad [22], [23].

Grupo	Nombre del grupo	Propiedad	Compuestos representativos
1	Indetectables por la cromatografía de gases	Tars muy pesados que no pueden ser detectado por la cromatografía de gases	Compuestos con siete o más anillos aromáticos
2	Aromáticos Heterocíclicos	Tars que contienen hetero-átomos. Son altamente solubles en agua	Piridina, fenol, cresol, quinolina, iso-quinolina, dibenzofenol
3	Aromáticos ligeros	Usualmente son hidrocarburos ligeros con un solo anillo	Tolueno, etil-benceno, xileno, estireno (No se incluye el benceno)
4	Poli-aromáticos ligeros	Compuestos de dos y tres anillos. Condensan a baja temperatura incluso si se encuentran en baja concentración	Indeno, naftaleno, metil-naftaleno, bi-fenil, acenaftaleno, fluoreno, fenantreno, antraceno
5	Poli-aromáticos pesados	Compuestos con más de tres anillos. Estos condensan a altas temperaturas y baja concentración	Fluoranteno, pireno, criseno, perileno, coroneno

3.1.1. Composición de los alquitranes dependiendo del tipo de biomasa

Uno de los parámetros que afecta dicha composición es el tipo de biomasa usada como punto de partida, la composición de la misma es variable en proporción de los componentes principales en la biomasa. En la Tabla 2 se presentan composiciones de diferentes biomazas similares a las que se trabajaron en este estudio. En este sentido, en uno de los estudios realizado por Aigner y colaboradores [24], se presenta de manera general la composición de los Tars en dos escenarios que pueden cubrir un rango relativamente amplio de la composición de dichos componentes. En el primer escenario, Figura 6, se presenta los promedios de las composiciones de los Tars para un proceso donde se lleva a cabo pirolisis de biomasa. Por otro lado en la Figura 7 se presentan también las

composiciones promedio de los Tars provenientes de un proceso de gasificación del mismo tipo de biomasa.

Tabla 6. Composición de diferentes biomásas [25]

Biomasa	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	Extractos
Fibra de coco	47,7	25,9	17,8	6,8
Cascara de coco	36,3	25,1	28,7	8,3
Concha coco	28,6	15,3	31,2	15,8
Tusa de maíz	40,3	28,7	16,6	15,4
Bagazo de maíz	42,7	23,6	17,5	9,8
Cascara de arroz	31,3	24,3	14,3	8,4
Bagazo de arroz	37,0	22,7	13,6	13,1

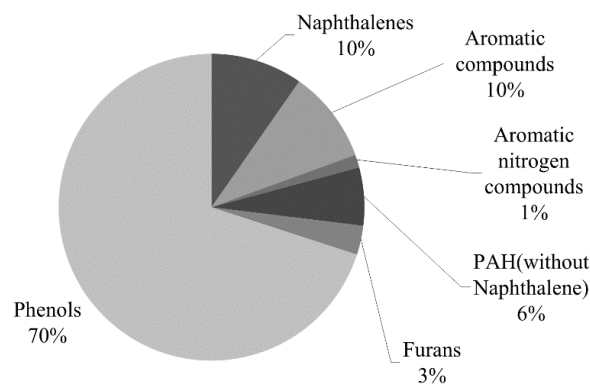


Figura 6. Composición promedio de los Tars para un proceso de pirólisis.

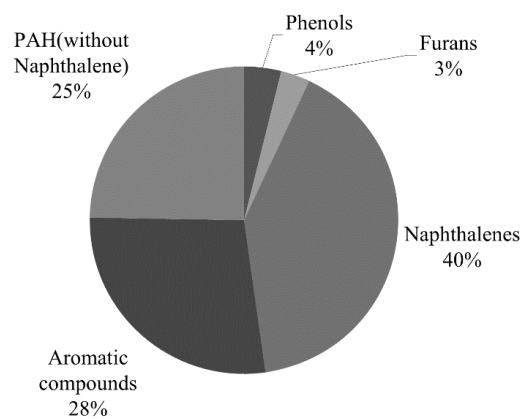


Figura 7. Composición promedio de los Tars para un proceso de gasificación.

Como se puede ver el componente principal para el proceso de pirolisis pertenecen al grupo de los fenoles, seguido por el naftaleno y compuestos aromáticos ligeros. Cuando el proceso llevado a cabo es la gasificación, la tendencia cambia significativamente teniendo que los componentes en mayor proporción son el naftaleno, los compuestos aromáticos ligeros y los hidrocarburos poli-aromáticos, en este caso la composición de fenoles es bastante inferior a la encontrada en la pirolisis. Por otro lado, dichos resultados se pueden comparar con la composición de los Tars obtenidos en el proceso de gasificación de biomasa obtenida de los residuos de la producción del aceite de palma [26]. Así, se puede ver que es precisamente el naftaleno el componente que se encuentra en mayor proporción, seguido por el fenantreno, y el pireno. También es evidente la presencia de impurezas derivadas de esterres, en el artículo donde se presentan estos resultados no se hace referencia a estas, probablemente debido a que no se consideran como potenciales contaminantes del agua de lavado.

3.1.2. Alquitranes obtenidos dependiendo del tipo de gasificador

Existen cientos de gasificadores publicados en muchas patentes. Sin embargo estos se dividen de acuerdo a cuatro tipos de principios de funcionamiento de acuerdo al tipo de Tar que producen. Los pirolíticos, que producen en su mayoría tars primarios, donde se añade calor externo para llevar a cabo el proceso, el cual algunas veces proviene de la combustión de carbón. Los gasificadores en contracorriente (Updraft), donde una mezcla de aire/oxígeno/vapor se pone en contacto con carbón, alcanzando así temperaturas entre 1000°C y 1400°C. Este gas caliente sube a través de biomasa que desciende, lo cual produce la reacción de pirolisis. Para este tipo de gasificación se producen todos los tipos de Tars, aunque los dominantes son los primarios. Por otro lado, en los tipo co-corriente (downdraft) aire/oxígeno y combustible entran en la zona de reacción desde la parte superior para luego llevar a cabo la reacción de pirólisis, la cual es llamada “flaming pyrolysis”. Así la temperatura de la llama alcanza entre los 1000°C y 1400°C, pero solo entre los intersticios de las partículas, por lo que la temperatura de estas se encuentran entre los 500°C y 700°C, así alrededor de 0.1% de los Tars primarios se convierten en secundarios y el resto se quema para llevar a cabo la pirólisis.

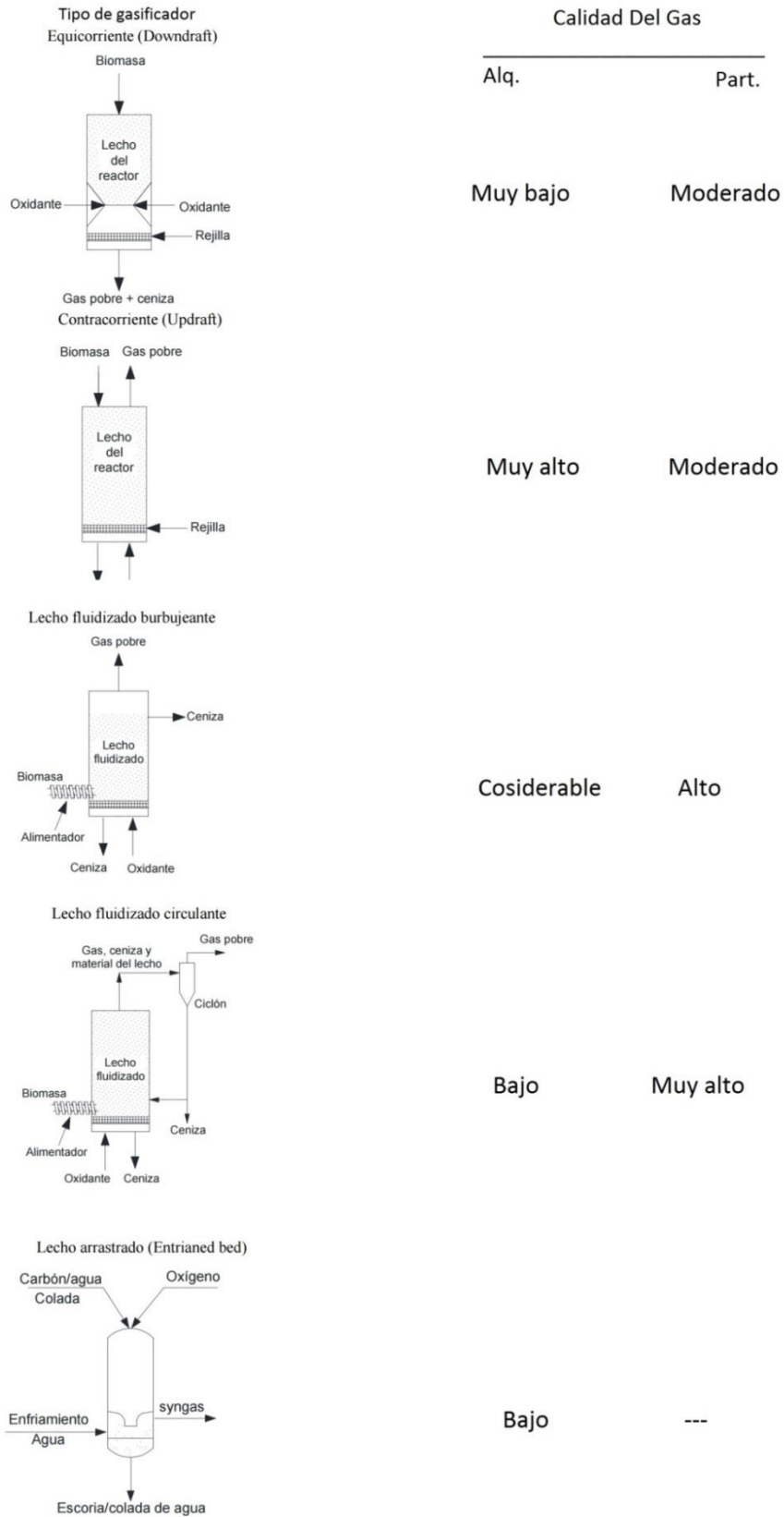


Figura 8. Producción de Tars dependiendo el tipo de gasificador [27]

Finalmente en los lechos fluidizados, una mezcla aire/oxígeno/vapor suspende las partículas las cuales se mantienen recirculando a través del lecho. Una parte del oxidante tiene contacto con la biomasa y quema los Tars a medida que se producen tal y como lo hace la gasificación tipo co-corriente (*downdraft*). Entonces, de manera general se tiene que los gasificadores en contracorriente (*updraft*) son los que más cantidad de Tars producen, los co-corriente (*downdraft*) son los que menos producen y los fluidizados son intermedios. Una generalización, que debe ser tomada de manera cuidadosa, indica que los gasificadores en contracorriente producen alrededor de 100 g/Nm^3 de Tars, los de lecho fluidizado unos 10 g/Nm^3 (gramos/ normal metro cúbico) y los co-corriente producen alrededor de 1 g/Nm^3 . También se tiene establecido que un gasificador en contracorriente en buen funcionamiento produce mayoritariamente Tars primarios con algo de secundarios, los gasificadores co-corriente producen exclusivamente Tars terciarios, y los fluidizados producen una mezcla de secundarios y primarios [18]. En la Figura 8 se muestran los niveles de alquitranes producidos dependiendo el tipo de gasificador.

3.2. Remoción de los compuestos tipo Tar de la corriente de producción en gasificación

Aun cuando se tienen muy buenas razones para llevar a cabo el proceso de gasificación en la biomasa, es necesario desarrollar métodos efectivos para retirar algunas impurezas del gas producido, y que de esta forma no se ocasionen problemas en los procesos aguas abajo. De esta manera entre las impurezas a retirar se tienen los compuestos Tars, material en partículas, NH_3 , H_2S , HCl y SO_2 , los cuales se producen de manera inevitable en la gasificación. Uno de los componentes que se desean remover de manera efectiva, debido a su característica nociva para los procesos donde se usa el gas producido, son los Tars. Hasta ahora, se presenta como el principal obstáculo en la gasificación de biomasa no sólo causando problemas de funcionamiento sino afectando la eficiencia energética de todo el proceso y los usos finales del gas de síntesis [28]. Por esta razón se han realizado diversas investigaciones enfocadas en la remoción efectiva de estos compuestos. Los métodos para ello se han dividido en dos grandes grupos: por un lado se tiene los métodos primarios en los cuales se intenta remover los Tars directamente en el proceso de gasificación. Por otro lado se tienen los métodos secundarios en los cuales los Tars se remueven luego del proceso de gasificación a través de un variado tipo de

procedimientos. A su vez los procedimientos para la remoción pueden subdividirse en procesos químicos, catalíticos y no catalíticos, y en procesos físicos tales como la adsorción y absorción. Entre estas dos ramas los procesos físicos son los más atractivos ya que son más simples técnicamente hablando y además son más económicos [21]. Con la finalidad de mostrar una visión del panorama que se tiene para la remoción de los Tars, se presenta en la Figura 9 un esquema que nos puede dar una idea global presentado por Milne y colaboradores [18].

En el gasificador con el que cuenta la Universidad del Norte la remoción de Tars se llevar a cabo a través de un lavado con agua de los gases provenientes de la gasificación. Dicho proceso entra en la categoría de los sistemas húmedos, en los cuales es posible usar torres con rociamiento, o scrubbers de diferentes tipos [21], [29].

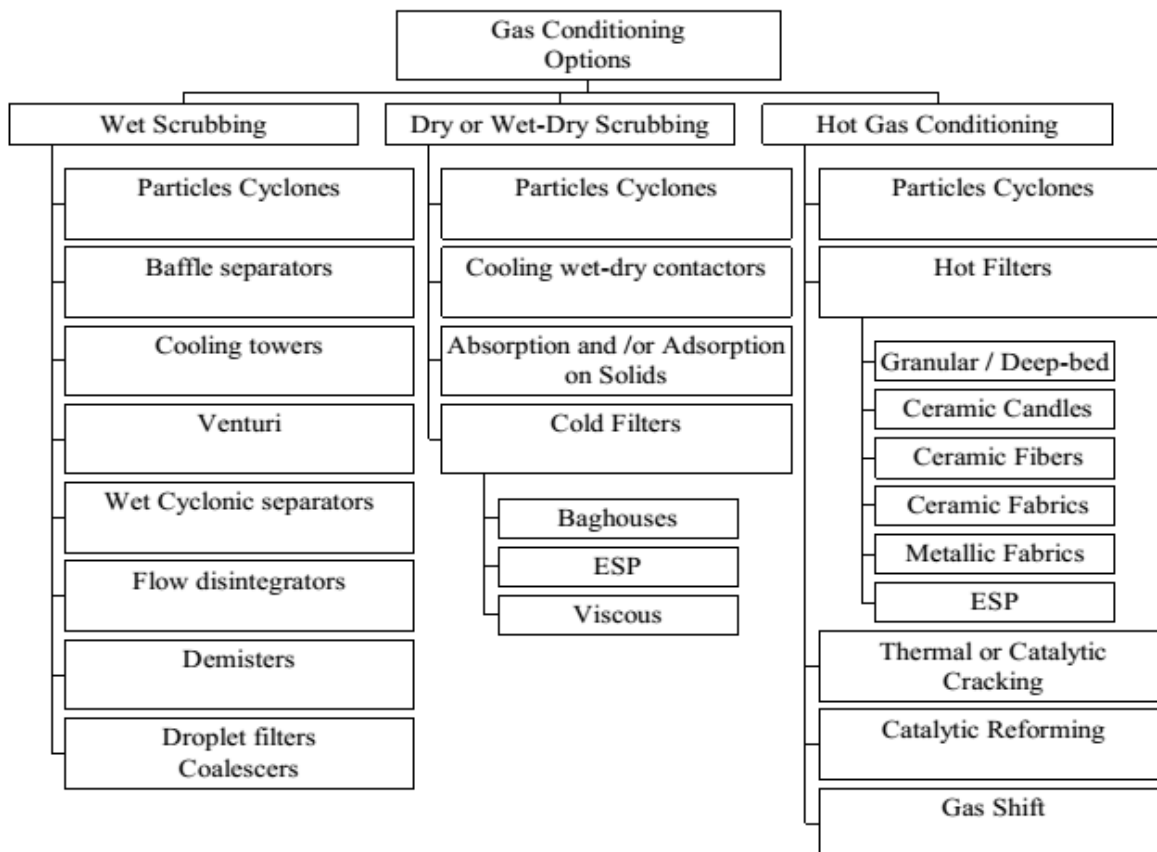


Figura 9. Opciones para llevar a cabo el proceso de remoción de Tars en los gases producidos por la gasificación [18].

La cantidad y tipo de alquitranes producidos, depende del tipo de gasificador, la materia prima utilizada y su composición, condiciones de operación, como la temperatura, entre otras variables. Las diferentes aplicaciones del gas obtenido demandaran diferentes niveles de remoción de alquitranes de la corriente gaseosa, con base en esto se derivaran los esfuerzos en su remoción, en la Tabla 7 se reportan algunos límites de concentración a partir de su uso final.

Tabla 7. Concentración límite de Tars para aplicaciones finales [30]

Application	Tar (mg/Nm ³)
Gas engine	< 50
Gas turbine	< 50
Syngas	< 0.1
Methanol synthesis	< 0.1
Fuel cell	< 1

3.3. Tratamiento de efluentes a partir de microalgas

Las microalgas son organismos unicelulares que se encuentran en la mayoría de cuerpos de agua. Su gran adaptabilidad a diferentes tipos de condiciones, como por ejemplo diferentes nutrientes, las hacen buenas candidatas para promover la transformación de desechos presentes en efluentes acuosos. En este sentido, los primeros estudios enfocados en la biorremediación de efluentes acuosos fueron llevados a cabo hace casi 60 años, donde se estudió el efecto combinado de bacterias y microalgas. Estos estudios preliminares confirmaron que las microalgas pueden proveer el oxígeno que las bacterias requieren para degradar compuestos orgánicos, que a su vez liberan nutrientes usados por las microalgas para su supervivencia. En este contexto, la selección de una especie de microalga es un paso importante para desarrollar un proceso eficiente. Entre los criterios de selección se deben tener altas tasas de remoción de carbono, lo cual se encuentra asociado con altas tasas de crecimiento, también es importante considerar su facilidad para sedimentarse, y la composición de la biomasa producida, ya que dicha biomasa puede ser usada como fuente de proteína, como biocombustible o como un biofertilizante [31].

Entre las desventajas de emplear microalgas en los esquemas de remediación de aguas de desecho se tienen dos principales. (1) Existe un conocimiento limitado de los detalles de los sistemas de tratamiento biológicos, lo cual resulta en mayores costos comparados con los tratamientos químicos convencionales. (2) Bajas tasas de remoción de algunos componentes dentro del sistema acuoso, teniendo así un proceso que por naturaleza tiene una alta variabilidad y que depende de muchos parámetros del entorno donde se llevan a cabo. Por otro lado, una de las ventajas que apoya este tipo de tecnologías, se presenta por la demanda de las personas para promover el uso de tecnologías verdes en muchos de los aspectos que los involucran, incluso en los países en vías de desarrollo [32].

Por otro lado, también se ha encontrado que es difícil encontrar un microorganismo que sea capaz de degradar completamente una mezcla de componentes a condiciones ambientales. Así, la acción combinada de microalgas con otros microorganismos ha sido referenciada como un proceso importante para la eliminación de compuestos indeseados [33], [34]. Para el caso específico de las microalgas, aunque es claro que una degradación completa de los contaminantes es poco probable, estas son capaces de realizar biotransformaciones de los PAH a compuestos hidroxilados intermedios, los cuales son más susceptibles a ser eliminados por otros microorganismos. Otro punto relevante es la capacidad de retención de estos compuestos dentro de la estructura de la microalga, lo cual también ayuda a disminuir los efectos tóxicos inmediatos [33].

Entre los estudios realizados para estimar el efecto de microalgas sobre PAHs se tiene el presentado por Hong et al [35], donde específicamente se estudió el efecto del fenantreno (PHE) y el fluoranteno (FLA) sobre *Skeletonema costatum* y la *Nitzschia sp.* De esta manera se encontró que estas especies son capaces de acumular y degradar ambos compuestos simultáneamente. Obteniendo también que la degradación del FLA fue más lenta que la del PHE [36]. En el estudio presentado por Lei et al [37] se muestra el estudio de cuatro microalgas *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus platydiscus*, *Scenedesmus quadricauda* y *Selenastrum capricornutum* para la remoción de fluoranteno (1mg/l) y pireno (1mg/l). Obteniendo que la *Selenastrum capricornutum* fue la más efectiva de las especies con un 78% de remoción durante un periodo de 7 días, mientras la *Chlorella vulgaris* mostró el rendimiento más bajo con un 48% de remoción durante el mismo período.

Por otro lado, se han presentado resultados de la degradación del naftaleno en presencia de microalgas eucariotas, teniendo así que estas son capaces de biotransformar el naftaleno a cuatro grupos principales de compuestos, los cuales son: 1-naftol, 4-hidroxi-4-tetralona, cis-naftaleno di-hidro-diol y trans-naftaleno di-hidro-diol. Sin embargo, la degradación total del naftaleno no fue muy alta, entre 1 y 1.9% [38]. Más a fondo, se ha obtenido también que la *Scenedsmus obliquus* es capaz de utilizar los ácidos sulfónicos como una fuente de azufre para la producción de biomasa, liberando el anillo de carbón desulfurado al medio, sin embargo, dicha desulfuración depende de la posición de los radicales sulfuro sobre la estructura del anillo [39]. De esta forma, en la Tabla 8 se muestran algunas microalgas y los componentes que estas pueden bioacumular o biotransformar [40].

Tabla 8. Componentes bioacumulados o biotransformados por algunos tipos de microalgas.

Microalga	Bioacumulación	Biotransformación
Chlamydomonas sp.	Mirex	Lindano, naftaleno, fenol
Chlorella sp.	Toxaphene, methoxychlor	Lindano, chlordimeform
Chlorococcum sp.	Mirex	
Cylindrotheca sp	DDT	
Dunaliella sp.	Mirex	DDT, naftaleno
Selenastrum capricornutum	Benceno, tolueno, cloro-benceno, di-cloro-benceno, nitrobenceno, naftaleno, pireno.	Benzo[a]pireno

3.4. Crecimiento de cultivos de microalgas

Existen dos grandes tipos de organismos de acuerdo a la forma química en que toman el carbono de su entorno; los autótrofos (directamente del CO₂) y heterótrofos (el carbono de su entorno, de una forma relativamente reducida y compleja). Nuestro interés está centrado en los organismos autótrofos, los cuales son relativamente autosuficientes, pero estos a su vez se dividen de acuerdo a sus requerimientos energéticos; quimiótroficas, que emplean la energía procedente de reacciones de oxidación ~ reducción y las células que utilizan luz como fuente de energía, denominadas fototróficas. Estas últimas abarcan células verdes,

fitoplancton (microalgas), algas cianofíceas, plantas y bacterias fotosintéticas. Las microalgas son microorganismo primitivos poco complejos, su clasificación no es muy sencilla debido a que son un grupo muy diverso de más de 30 mil especies, principalmente se dividen en dos grupos como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Tipos de microalgas por clasificación taxonómica

Procariotas	Eucariotas
Cianobacterias	Clorofitas
	Euglenofitas
	Dinoflagelados
	Criptofitas
Proclorofitas	Heterokontophya: diatomeas, crisofitas, xantofitas y otras

La Cinética de crecimiento, indiferente al tipo de especie analizada, todas sigue un patrón estándar descrito por cinco fases, ver Figura 10

1. Lag o fase de adaptación: No se presenta incremento celular, en algunas ocasiones puede incluso disminuir levemente el número celular, respecto al del inóculo.
2. Exponencial: Una vez adaptadas inicia la multiplicación de las células. Se presenta una aceleración en el crecimiento de forma exponencial.
3. Declinación relativa de crecimiento: Se presenta por la reducción de nutrientes o variaciones en factores limitantes como el pH, temperatura o sobrepoblación; ocasiona una reducción de la tasa de división celular.
4. Estacionaria: No se aprecia división celular neta, se mantiene estable durante un tiempo.
5. De muerte: En la fase estacionaria las células pueden permanecer por semanas o incluso meses, se presenta acumulación de metabolitos a niveles tóxicos e inicia el fallecimiento de las células.

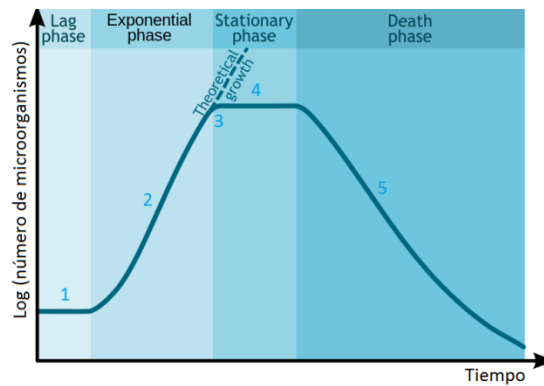


Figura 10. Curva representativa fases de crecimiento de microalgas (adaptado de Michal Komorniczak, Bacterial growth curve)

Promover el crecimiento de microalgas en una matriz acuosa conlleva tener en cuenta una gran cantidad de variables para lograr obtener tanto una disminución significativa de compuestos indeseados así como para lograr el aumento la biomasa producida. De esta manera, por ejemplo, se ha determinado que el crecimiento de microalgas en las aguas que se obtienen luego del primer proceso de decantación de aguas residuales se incrementa de manera significativa luego de someter el cultivo a largos periodos de luz, seguido de la adición de dióxido de carbono, mientras que un incremento de la temperatura produce un descenso en el crecimiento de las microalgas [41], [42].

Cabe mencionar que su crecimiento y desarrollo tiene comportamientos complejos e impredecibles que no solo están sujetos a variables ampliamente estudiadas como las que se mencionan a continuación, sino también a su competencia entre especies coexistentes en los mismos ecosistemas [43]. De manera general entonces, el crecimiento de microalgas depende de diversas variables entre las cuales se pueden mencionar:

1. **pH de la matriz acuosa:** El pH de un medio nutriente ejerce un efecto muy importante en la velocidad de crecimiento en las microalgas. En condiciones de crecimiento autotrófico (generación de alimento a partir de compuestos inorgánicos), las especies generalmente crecen en un pH de 4 a 5, y se caracterizan por tener un valor óptimo en el cual puede alcanzarse una velocidad máxima. Este pH óptimo puede diferir notoriamente de una microalga a otra, así para la Chlorella este se encuentra entre 6 y 7, y para la Spirulina puede estar entre 7 y 10. Por otro lado, también es posible que el pH tenga un efecto indirecto en el crecimiento de las microalgas. Esto se debe a la

influencia que puede llegar a tener sobre la disociación y solubilidad de los diferentes componentes en el medio de cultivo, originando de esta manera la aparición de efectos tóxicos, inhibitorios o deficiencias en algunos nutrientes [44].

2. **Temperatura del medio:** La temperatura impacta la fisiología de las microalgas a través de la alteración de las reacciones químicas y la estabilidad de los componentes celulares, la mayoría responde a incrementos en la temperatura con un crecimiento exponencial hasta que se alcanzan una temperatura máxima de crecimiento, luego de este punto se tiene una pérdida de la integridad estructural de la célula y por consiguiente se tiene un descenso abrupto de las tasas de crecimiento [45]. De esta forma se tiene que para la *Chlorella vulgaris* la temperatura de crecimiento se encuentra entre los 25 y los 30°C, reportándose también un incremento en el contenido de biomasa y clorofila con un contenido elevado de dióxido de carbono (6%) a una temperatura optima de 30°C. También se ha reportado un aumento en la cantidad de lípidos desde 5.9 hasta 14.7% cuando se pasa de un valor de 30°C hasta los 25°C. Por otro lado cuando se someten a choques de calor el contenido de proteína de las microalgas disminuirá y se producirá ácido abscísico. Así, se ha determinado que la *Chlorella* es menos resistente a un pH ácido, si crece por arriba de los 40°C, al ser comparada con una sepa que ha crecido por debajo de los 35°C [46].

3. **La concentración de nutrientes esenciales tales como nitrógeno, fósforo, carbono orgánico, y la relación entre estos.** El crecimiento de las microalgas también se ve bastante influenciado por el tipo componentes en el medio de cultivo, además también de su concentración. Entre los componentes inorgánicos que las microalgas son capaces de consumir se encuentran principalmente el nitrógeno y el fósforo. El nitrógeno es fundamental para la formación de proteínas y ácidos nucleicos, siendo así una parte esencial de moléculas tales como la ATP, y células transportadoras de energía. En cuanto al fosfato también hace parte de las cadenas de ADN y ARN, las cuales son macromoléculas esenciales para cualquier ser vivo, además también es esencial para la producción de fosfolípidos. Un aspecto común que se puede ver en el crecimiento de microalgas con deficiencias en estos componentes es el cambio de su metabolismo. Así, es posible observar un aumento en la síntesis y almacenamiento de lípidos neutros, lo cual es una estrategia usada para la optimización en la producción de biocombustibles.

Así, entre las microalgas con mayor capacidad para consumir este tipo de componentes se encuentran *Scenedesmus*, *Chlorella* y *Spirulina* [47], [48]. Por otro lado, el crecimiento de microalgas usando como alimento componentes orgánicos también ha sido estudiado. De esta forma se han tenido resultados positivos en el desarrollo de cultivos en azúcares, acetatos y compuestos fenólicos. También sobre productos secundarios como azúcares ácidos, alcoholes, furanos, y los productos provenientes de su degradación tales como ácidos grasos, terpenoides, polifenoles y alcaloides. Así, es necesario tener en cuenta que no todo los tipos de microalgas son capaces de utilizar estos componentes para su crecimiento. Por ejemplo, los compuestos fenólicos son conocidos por ejercer una actividad inhibidora de microorganismos, así se ha visto que cepas de *Chlorella saccharophila* y *Scenedesmus quadricauda* mostraron una total resistencia al catecol, no obstante la *Chlorella zofingiensis*, la *Coelastrum microporum* y la *Mesotaenium caldararium* inhiben su crecimiento totalmente en la presencia de este compuesto [49].

4. **Periodos de iluminación, e intensidad de esta:** La luz es la fuente energética que este tipo de microorganismos usan para llevar a cabo la fase de crecimiento fotoautotrófico en donde se convierten el sustrato disponible en compuestos orgánicos (biomasa). De esta manera los efectos de la intensidad lumínica con la que se lleva a cabo el crecimiento de las microalgas impacta el proceso de fotosíntesis, cambiando así su tasa de crecimiento. En este sentido, la tasa de crecimiento para una determinada cepa de microalga tendrá un punto de intensidad óptimo que permita una máxima tasa de crecimiento, así un aumento o disminución de esta intensidad ocasionará un descenso en dicho crecimiento. No obstante, un cambio duradero de esta intensidad también tendrá como efecto el fenómeno de fotoadaptación/fotoaclimatación en la cual las propiedades de las células cambiarán de acuerdo a la intensidad lumínica disponible, lo cual puede ocasionar un aumento de su eficiencia. Esta adaptación se lleva a cabo a través de múltiples mecanismos tales como cambios en los tipos y cantidades de pigmentos, tasa de crecimiento, en desaturación de cloroplastos, o en la disponibilidad de ácidos grasos esenciales. Además, la fotoaclimatación también se encuentra acompañada de cambios en el volumen de las células, el número y densidad de las membranas tilacoides [48]. Para el cultivo de microalgas en condiciones controladas, es necesario seleccionar una fuente artificial de luz. Entre los criterios a tomar en cuenta

para llevar a cabo la selección de esta fuente se deben incluir: (1) eficiencia eléctrica, (2) baja disipación de calor, (3) buena confiabilidad, (4) alta durabilidad, (5) periodo largo de vida útil, (6) debe ser relativamente compacta, (7) bajo costo, y (8) debe tener un espectro de emisión que se encuentre acorde al tipo de microalga que será cultivada. De manera general cerca de la mitad del espectro lumínico (400-700nm) es normalmente usado para el crecimiento de microalgas. Sin embargo se ha reconocido que la luz azul (420-450 nm) y la luz roja (600-700nm) son las más eficientes que el resto de longitudes de onda en el espectro de luz. Así, se ha encontrado que las fuentes lumínicas con un rango pequeño de emisión y que además se sobreponga sobre el espectro de emisión de la cepa de microalgas será fotosintéticamente más eficiente, además de disipar menos energía en forma de calor. Dicha tarea puede ser teóricamente lograda usando LEDs. Por otro lado la intensidad de la fuente de luz, la cual es una medida del número de fotones disponibles para la fotosíntesis, tiene un efecto que se encuentra altamente relacionado con la temperatura a la que se cultivan las microalgas. Por ello, de manera general se tiene que la intensidad de saturación de la cepa aumenta con la temperatura [50].

5. **Factores bióticos** tales como la presencia de bacterias y zooplancton depredador, además de los otros microorganismos que compiten con las microalgas por la obtención de nutrientes esenciales. En la naturaleza, la mayoría de las microalgas se encuentran acompañadas con otros microorganismos aeróbicos o anaeróbicos. De esta manera, se tiene por ejemplo que las bacterias son capaces de influenciar o inhibir el desarrollo de las colonias de microalgas. Así, uno de las posibles interacciones se presenta cuando el oxígeno molecular, proveniente de la fotosíntesis de las microalgas, es usado por las bacterias para degradar materia orgánica. Teniendo además muchas evidencias de comunidades de este tipo en la naturaleza. El punto importante ahora consiste en conocer los detalles que afecta esta interacción, y así poder desarrollar técnicas que permitan seleccionar los grupos deseados de microorganismos que permitan llevar a cabo una determinada tarea [10].
6. **Patrones de agitación de las microalgas:** el movimiento local tiene consecuencias muy importantes en el desarrollo de los cultivos de microalgas. Si este movimiento es demasiado brusco los esfuerzos viscosos pueden dañar mecánicamente las células,

deteniendo el proceso de crecimiento. Por otro lado si este movimiento es demasiado pequeño, la transferencia de masa de los nutrientes vitales y desechos puede ser impedida. Así, los parámetros de flujo importantes para la supervivencia de las microalgas son la tasa de deformación y los esfuerzos de corte [51]. Por otro lado la agitación también es esencial para maximizar la cantidad de oxígeno disuelto en el cultivo. Un porcentaje relativamente bajo de oxígeno puede producir que la cantidad de biomasa se reduzca significativamente [52].

3.5. Medición del crecimiento de los cultivos de microalgas

Existen muchos motivos por los cuales es necesario medir las tasas de crecimiento en los cultivos de microalgas. En estudios evolucionarios, por ejemplo, la tasa de crecimiento de un cultivo que se reproduce de manera asexual puede ser vista como una medida de la aptitud inclusiva (“*Inclusive Fitness*”³, en inglés) de dicho cultivo. También en estudios fisiológicos, donde existe un grado de interés para determinar cuáles constituyentes bioquímicos varían como función de la tasa de crecimiento. Cualquier estimación de las tasas de crecimiento requiere mediciones en series de tiempo que permitan estimar la tasa de cambio en la biomasa. Estas mediciones pueden ser realizadas de forma directa a través del conteo de células, o de forma indirecta a través de un parámetro que muestre un comportamiento lineal respecto al número de células. Típicamente en los métodos indirectos se miden parámetros como la fluorescencia, la cantidad de biomasa (como una fracción en base seca del material orgánico particulado), o a través de la densidad óptica. Existen otros parámetros que pueden ser usados en estos métodos indirectos, sin embargo se debe demostrar que tienen una relación lineal con el número de células en el cultivo. Entre dichos parámetros se tienen la concentración de: clorofila, proteínas, carbohidratos, y lípidos. Además para muchos de estos parámetros, es necesario tener un periodo de aclimatación entre una condición de crecimiento y otra, debido a variaciones significativas en su relación con el número de células. Generalmente este periodo puede durar alrededor de 20 generaciones. Así, de manera general parámetros como la fluorescencia, el carbono

³ En esta teoría se sugiere que existe una tendencia a transmitir los genes que tienen en común aquellos organismos de la colonia que muestran una conducta altruista. De esta manera, un acto altruista que apoya la supervivencia de un pariente u otro individuo, teóricamente incrementa la aptitud genética de ambos organismos. Se cree que la propagación de genes comunes es un mecanismo de evolución denominado eusocialidad [77].

orgánico particulado, el nitrógeno orgánico particulado, la concentración de proteínas o de carbohidratos no pueden ser usados hasta que se alcance un estado estable fisiológico.

Otra técnica disponible consiste en emplear la espectrofotometría, para este caso dicha técnica consiste en correlacionar la densidad de microalgas con la absorbancia de luz a longitudes de onda específicas. De esta manera, en el estudio presentado por Rodrigues y colaboradores [53] se muestra que la densidad de células por unidad de volumen siguen la ecuación de potencia mostrada a continuación. Donde Abs_{λ} representa el valor de la absorbancia medida a la longitud de onda λ donde se tiene un pico de absorbancia, ρ es la cantidad de células por unidad de volumen, y a, b son las constantes que se obtienen luego de realizar el ajuste para el tipo de microalga estudiada, $Abs_{\lambda} = a \cdot \rho^b$. De esta manera para el estudio de Rodrigues, usando la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* la ecuación anterior queda definida de la siguiente manera $Abs_{\lambda=684nm} = 7.2578 \times 10^{-8} \cdot \rho^{1.0219}$. Como limitante se observa para este estudio, que los estudios realizados se enfocan en especies aisladas, en este estudio se trabaja con pooles de microalgas.

Por otro lado, el método directo de conteo del número de células es una buena opción si se cuenta con los dispositivos comúnmente usados. En este método el enfoque práctico consiste en contar todas las células presentes en un volumen conocido del cultivo una vez este ha sido inmovilizado en un plano, lo cual facilita observar y preservar las células bajo estudio en el momento que resulte más conveniente. Así, para realizar este conteo es necesario un microscopio con una calidad razonable, que contenga un condensador que permita ajustar distancia y permitir que se dé la iluminación tipo Köhler [54], [55].

Dependiendo del tamaño de la microalga, el número de células puede ser determinado usando un hemocitómetro Neubauer o una cámara Sedgwick-Rafter. El hemocitómetro es apropiado para células que se encuentran en el rango de tamaño en el que se encuentran las células sanguíneas (Menos de 100 μm de diámetro) y que tengan una densidad celular menor a 10^5 células por ml. Células más grandes o con una mayor densidad se pueden trabajar mejor con una cámara Sedgwick-Rafter. En caso de usar un hemocitómetro es necesario contar al menos 300 células por muestra para lograr un error menor al 10%, siendo además recomendado triplicar las muestras para reducir los errores de muestreo [56].

3.6. Métodos para la Caracterización de aguas alquitranadas provenientes del proceso de gasificación y muestras tratadas por biorremediación

En el proceso de gasificación se obtienen compuestos indeseados que son removidos de diferentes maneras como se mencionó anteriormente (Página 22), cuando se utiliza el método de lavado como alternativa de remoción de esas sustancias indeseadas en la corriente del gas producido se generan residuos, no deseables, altamente contaminantes, una solución de lavado que contiene alquitranes, ácidos de nitrógeno y de azufre (los tipos y cantidades depende de la materia prima para la gasificación y las condiciones de lavado). Dado que la variedad de compuestos es tan amplia, entonces se decidió manejarlos como un grupo único de hidrocarburos llamado Tars. Por otro lado siguen habiendo esfuerzos orientados hacia la identificación de estos componentes y la manera en que interaccionan entre sí. Como consecuencia también se han desarrollado clasificaciones de estos componentes dependiendo de su comportamiento (Devi et al., 2005,) [21]. Para tener un punto de referencia, en la se muestra un gráfico donde se indica los compuestos que pueden ser detectados por la cromatografía de gases, y los que pueden ser determinados mediante el uso de métodos gravimétricos Figura 11.

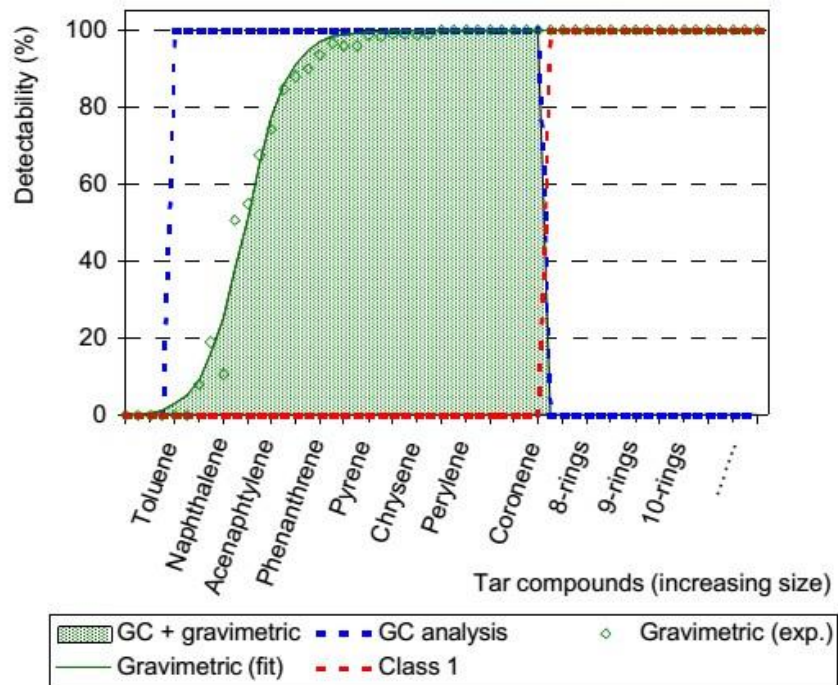


Figura 11. Compuestos detectados por la cromatografía de gases y por los análisis gravimétricos.[57].

Partiendo del hecho que los compuestos alquitranados producidos en la gasificación son principalmente PAH, entonces, para hacer un análisis completo de los efluentes se deben definir dos rutas para determinar estos componentes. Por un lado, se debe establecer el procedimiento para determinar los PAH con menos de seis anillos aromáticos. Como se ha mencionado anteriormente estos pueden ser determinados por medio de una cromatografía de gases. Por otro lado, los componentes con una mayor cantidad de anillos aromáticos, ya que no pueden ser detectados por una cromatografía de gases, entonces, los análisis gravimétricos son los más apropiados. En el caso del efluente que se estudió se espera que los PAH más pesados no se encuentren en esta fase, por lo tanto se escogió la cromatografía de gases para realizar los análisis.

Aunque puede sonar sencillo, nombrar el tipo de técnica que debe ser usada, llevar a cabo el análisis puede ser complejo. Entre los mayores inconvenientes asociados con el análisis en muestras reales se tienen: pérdidas debidas al almacenamiento, la necesidad de pre-concentrar y limpiar las muestras. En este sentido el procedimiento analítico puede ser resumido en tres etapas principales, las cuales se muestran en la Tabla 10. Vale mencionar no todos los ítems presentados en cada etapa se deben implementar [2].

Tabla 10. Resumen de los métodos analíticos para la recuperación, limpieza y determinación de PAH en agua (Manoli & Samara, 1999).

Etapa 1: Recuperación	Etapa 2: Limpieza	Etapa 3: Determinación
Extracción líquido-líquido	Extracción con fase sólida	Cromatografía de gases con detector de ionización de llama o también detector por espectrometría de masas.
Extracción con fase sólida	Cromatografía clásica por adsorción en columna	Cromatografía líquida de alta presión con detector ultravioleta, detector fluorométrico, detector de espectrometría de masas, o detector con fotiodo.
Micro-extracción con fase sólida	Cromatografía líquida de alta presión	Cromatografía con fluido supercrítico con detector ultravioleta, o detector con espectrometría de masas.
Immunosorbentes	Immunosorbentes	

Para muestras de compuestos orgánicos es recomendable la utilización de la cromatografía de gases acoplado a masas, con el fin de determinar la composición del efluente resultado del lavado de la corriente gaseosa producto de la gasificación. Para realizar la extracción de los analitos de la matriz acuosa se tienen en cuenta métodos gravimétricos, consisten en evaporar el solvente en el que se tiene la muestra para luego proceder a pesar la cantidad de residuos que se obtuvieron. Los problemas para este tipo de métodos yacen en primer lugar en el tipo de solvente, generalmente anisol, usado antes de proceder con la evaporación. En segundo lugar, la presión a la que se lleva a cabo el procedimiento ya que realizarlo a presión ambiental y en vacío puede llevar a resultados diferentes, generalmente se prefiere usar vacío [58]. Finalmente la técnica también dependerá de los costos y la disponibilidad del equipo, un punto muy importante para tomar la decisión final.

Se debe pensar en primera medida llevar a cabo una extracción de los componentes del efluente acuoso, debido a que no se puede llevar a cabo la inyección de muestras acuosas para cromatografías de gases, existen diferentes alternativas para llevar a cabo la extracción y los resultados de la cromatografía serán dependientes de la efectividad de dicha extracción. Habitualmente, se utiliza la extracción por solventes, sin embargo, se hacen necesarios volúmenes muy grandes para llevar a cabo dicha operación y el impacto ambiental y en la salud es muy alto.

Una alternativa más sostenible es la extracción por la técnica SPME (microextracción en fase sólida). El método SPME ha demostrado ser sensible para el análisis cualitativo y cuantitativo de alquitranes, de los métodos de extracción libres de solventes, es el más utilizado para el análisis en matrices como aire, agua y suelo [59]. Es adecuado para aplicaciones en las que se necesitan límites extremadamente bajos [30]. Básicamente consiste en la extracción de los analitos de la muestra hacia la fibra, seguido de la desorción de los mismos al instrumento analítico. Se hace necesario tener en cuenta diferentes variables fundamentales con el fin de obtener los mejores resultados en la extracción, entre estos se encuentran la naturaleza química de la fibra, temperatura de extracción, modo de operación, condiciones y características de la muestra a analizar, matriz en la cual se encuentra la muestra problema, entre otros, a continuación se mencionan algunos de estos y su influencia en la separación.

La escogencia del material del cual está hecha la microfibras es fundamental para garantizar una adecuada extracción, la afinidad entre los analitos debe ser alta con la fibra, otro criterio importante es la polaridad, para compuestos polares es recomendable utilizar una fase estacionaria, polar tal como el poliacrilato, debería ser usada. Para el caso de compuestos no-polares, una fase estacionaria no-polar tal como el polidimetilsiloxano (PDMS, en inglés) es la más recomendada. En cuanto al efecto de la temperatura, a medida que esta es más alta, la energía cinética de las moléculas resulta en una interacción más débil entre el analito y el polímero por lo que la difusión a través del recubrimiento es más rápida; puede ser usado para ajustar la sensibilidad del SPME sobre el método de análisis de los Tar. En este sentido, existe una temperatura óptima para cada componente, donde la sensibilidad es máxima y se evita la condensación, en el caso de este estudio, como son mezclas es complicado determinar una temperatura optima, [30].

Otro parámetro importante que afecta la adsorción de los compuestos Tar es la hidrofobicidad que presenten, de manera general se tiene que naftaleno<fenantreno<pireno. Esta afinidad también se encuentra relacionada con la polaridad, la cual a su vez puede ser relacionada mayoritariamente con el peso molecular de los componentes, pero que también depende de la estructura química de estos.

Se presentan dos tipos de operación de las fibras, sea por inmersión de la fibra en la muestra, donde el contacto es con la fase líquida de la muestra problema, la otra manera de operación es espacio de cabeza, en este caso el contacto es con la fase gaseosa de la muestra, dependiendo el tipo de sustancias a analizar la forma de operación cambia.

Posterior a la extracción se debe utilizar cromatografía de gases, es una técnica analítica usada para determinar los componentes que se encuentran en una mezcla. Básicamente la cromatografía es un método de separación que ha sido mejor utilizado como técnica analítica para determinación de componentes de una mezcla que se lleva a cabo por diferencias de afinidad con la fase estacionaria, estas diferencias resultan en una velocidad diferente de recorrido de la columna y aparición en el detector el cual envía una señal para registrar cada componente.

Es absolutamente indispensable tener en cuenta otros factores que se mencionan a continuación [60]–[62], con el fin de realizar un análisis adecuado y establecer las condiciones de análisis de la muestra problema:

- Volatilidad del componente: Los componentes con volatilidad más baja (Puntos de ebullición más bajos) tienden a viajar más rápidamente a través de la columna que los componentes menos volátiles. Esta es una de las razones principales por las que se usan solventes con bajos puntos de ebullición (Ej.: metanol, dietil éter, diclorometano) como solventes en la muestra.
- Polaridad de los componentes: Los compuestos polares tienden a moverse más lentamente, un aspecto más influyente si la columna es polar.
- Temperatura de la columna: elevar la temperatura de la columna tiende a aumentar las velocidades de todos componentes de la mezcla. No obstante una temperatura demasiado alta puede ocasionar una pobre separación de los componentes, debido a que estos tienden a permanecer en la fase gaseosa y por lo tanto no se produce la suficiente interacción con la fase estacionaria. En este sentido, se ha observado que los mejores resultados se obtienen cuando se promueven gradientes de temperatura.
- Polaridad de la columna: en general se tiene que los componentes se mueven más lentamente en las columnas polares, pero su efecto es más notorio en los componentes polares de la mezcla analizada.
- Tasa de flujo de gas: un aumento del flujo de gas de arrastre produce un incremento de la velocidad de movimiento a través de la columna
- Longitud de la columna: Entre más larga sea la columna más tiempo tomara a los compuestos para salir del instrumento, sin embargo una mejor separación puede ser lograda.

3.7. Factores que intervienen en la biorremediación de aguas de desecho usando microalgas

La fitorremediación en su sentido más amplio puede ser definida como el uso de macroalgas y microalgas para la remoción o biotransformación de contaminantes, incluyendo nutrientes y xenobióticos de las aguas de desecho y la remoción de dióxido de carbono de aire de desecho. Emplear microalgas para fomentar la degradación de contaminantes presentes en el agua de desecho tiene varias aristas que deben ser estudiadas para fomentar un óptimo crecimiento de los cultivos en dicha condiciones. El esquema publicado por Priyadarshani et al [40], muestra una visión general de los componentes que se deben tener en cuenta para lograr la biorremediación de un efluente (Ver Figura 12).

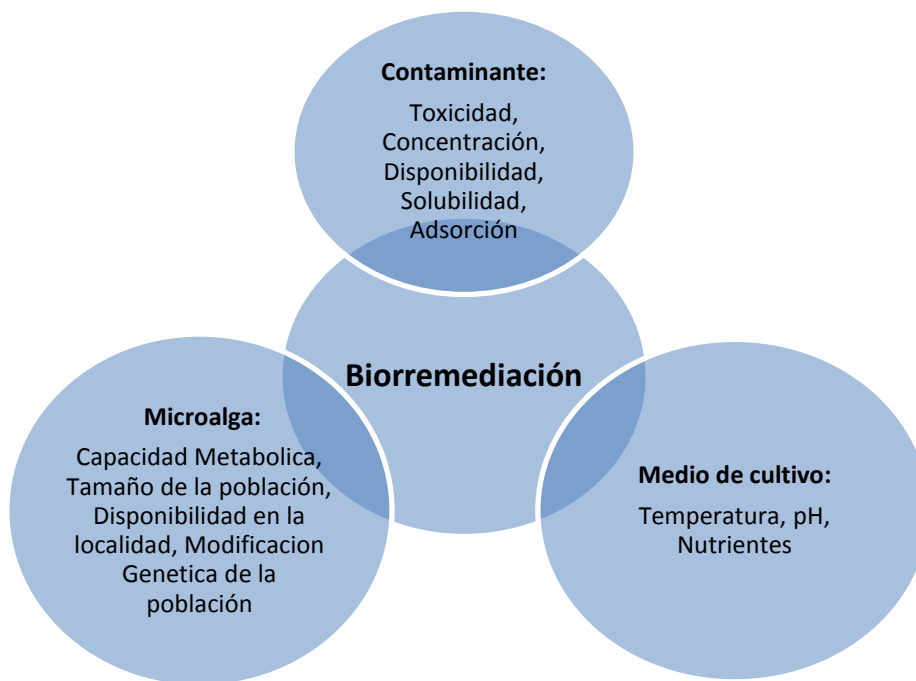


Figura 12. Principales factores que afectan el proceso de biorremediación [40].

En este sentido, a continuación se muestran algunas de las características más importantes que diferentes estudios han tenido en cuenta para llevar a cabo un proceso de biorremediación de efluentes usando microalgas. Así en la investigación llevada a cabo por An-Ping Lei et al. [37], se enfocan en la remoción de fluoroanteno y pireno usando diferentes tipos de microalgas, en su estudio fijan concentraciones de efluente a ser tratado de 1 mg/l, bien sea del compuesto puro o la combinación de ambos. En cada experimento se fijó la cantidad de microalgas en un valor de 34.5 mg de materia orgánica seca por litro de mezcla, a una velocidad de agitación entre los 160-170 rpm, teniendo 3 réplicas por

condición experimental y midiendo el avance del experimento en tres puntos (1,4 y 7 días de incubación). A su vez se prepararon soluciones con mezclas fluoroanteno, pireno y medio de cultivo pero sin microalgas, esto con la finalidad de determinar la foto-degradación de estos compuestos aromáticos.

Luego de llevar a cabo el experimento, cada una de las muestras es centrifugada (5000 rpm a 4 °C por 10 min) para separar el medio de cultivo de las microalgas. Luego al medio de cultivo se le realizaron dos extracciones con etil-acetato y dicha muestra fue concentrada en un evaporador al vacío. Por otro lado a las microalgas también se le realiza una extracción con etil-acetato en un baño ultrasónico, luego el extracto fue secado sobre Na_2SO_4 anhidro. Luego realizar este procedimiento cada muestra fue analizada mediante cromatografía de gases, donde la cantidad de los compuestos aromáticos fue obtenida a partir de curvas de calibración realizadas previamente para dicho equipo. Un estudio muy similar es presentado por Chan et al. [63], sin embargo este se enfoca en un tipo particular de microalga y añade otro componente aromático al estudio (Fenantreno). En el estudio de Gao et al. [64], se estudia la biorremediación del nonilfenol a través de la *Chlorella*, en este estudio también se usa la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas para determinar la cantidad de remoción del compuesto, además se usa la concentración clorofila presente en cada muestra para determinar el crecimiento de la población. Esta concentración la determinaron usando espectrofotometría para así medir absorbancia de la muestra a dos longitudes de onda (665 y 652 nm). Un estudio con características similares en cuanto a procedimiento también es presentado por Lijuan Luo y colaboradores [65], también por Hong y colaboradores [35]. Existen también otros procedimientos que se diferencian principalmente en la técnica usada para medir tanto el número de células en cada condición experimental tanto como la concentración de los compuestos estudiados. Tal es el caso del estudio presentado por Gattullo y colaboradores [66], donde fue usada la cromatografía líquida de alto rendimiento para determinar la cantidad del compuesto que permanece en solución luego del tratamiento y el conteo de células es realizado a través de un equipo que opera de forma automática, pero del cual no se expresa su principio de funcionamiento.

3.8. Efecto de condiciones estresantes en el cultivo de microalgas

Una de las habilidades que tienen las microalgas es la capacidad de alterar algunas de sus características, como por ejemplo la composición de su biomasa, debido a las condiciones

de estrés a las que sometan. Así, bajo condiciones de estrés, se ha determinado que algunos tipos de microalgas son capaces de acumular metabolitos secundarios tales como pigmentos, vitaminas, entre otros. Este comportamiento en las microalgas se debe principalmente a cambios en los patrones y estrategias metabólicos como mecanismo de reacción a condiciones desfavorables/favorables en su entorno de crecimiento. Cuando las condiciones son extremas, las microalgas sintetizan varios metabolitos secundarios, los cuales tienen como objetivo mantener sus tasas de crecimiento, o al menos incrementar sus posibilidades de supervivencia bajo condiciones desfavorables. Estos metabolitos no se usan para llevar a cabo las funciones principales de la microalga (como la división y el metabolismo), y generalmente incluyen antioxidantes, hormonas, antibióticos [67]. Existen varios estudios de esta naturaleza, como el presentado por los pioneros Sager y Granick [68], donde estudia el comportamiento de la *Chlamydomonas reinhardtii* en condiciones de ausencia de nitrógeno, determinando así un aumento en la cantidad de almidón acumulado por las células [68], [69].

Un aspecto importante que se deriva del cultivo de microalgas en un ambiente estresante, como lo es en presencia de contaminantes orgánicos, es su adaptación a dicho medio. Este tipo de comportamiento hace posible que las microalgas capaces de sobrevivir en dicho ambiente, tengan una mejor capacidad de biodegradar estos componentes si se compara con la capacidad de la cepa original [70], [71]. Así, en el estudio desarrollado por Carrera y colaboradores, se muestra el comportamiento de *Scenedesmus* en soluciones con diferentes concentraciones de petróleo, desde 1% hasta 30% en volumen. Entre los resultados más resaltantes se obtuvo que las cepas originales disminuyeran drásticamente su concentración durante las primeras semanas del experimento. Sin embargo, luego de dicho periodo, se observó la presencia de variantes resistentes a los componentes del petróleo que fueron capaces de reproducirse y recuperar la densidad celular de la colonia [72]. Por ello, utilizar cepas adaptadas a sobrevivir en un determinado medio es una medida que aumenta la probabilidad de supervivencia de microalgas en un proceso de biorremediación.

4. Metodología

4.1. Ubicación

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microalgas de la Universidad del Norte. Las muestras de agua que se utilizaron como fuentes de microalgas fueron recogidas en dos tiempos diferentes (23 de mayo y 27 de noviembre del año 2014) para cuatro cuerpos de agua del departamento del Atlántico, En la Tabla 11 se muestran las coordenadas de dichos muestreos.

El agua contaminada es producto del lavado de los gases obtenidos de la gasificación de biomasa. Las pruebas de supervivencia de cultivos de microalgas en presencia de agua alquitranada (contaminada) y seguimiento del crecimiento de los cultivos por conteo, fueron realizadas en el laboratorio de microalgas; otros análisis complementarios para el crecimiento de los cultivos se realizaron en el Laboratorio de Biología de la Universidad del Norte. En cuanto a los análisis para evaluar la remoción del contaminante, se realizaron en el Laboratorio de Química de la Universidad del Norte.

Tabla 11. Ubicación de muestreos de cuerpos de agua con microalgas

Número de muestra	Lugar	Hora	Latitud N	Longitud W
5A	Laguna de Luruaco	9:00 am	10°36.586	75°09.380
7A			10°79.523	74°73.844
10A	Sabanagrande	10:30 am	10°79.669	74°73.626
1B		8:30am	11°02.663	74°49.868
2B	Ciénaga de Mallorquín	8:35am	11°02.645	74°49.866
3B		8:45am	11°02.644	74°49.848
4B		10:48am	10°36.972	75°96.410
5B	Laguna de Luruaco	11:14am	10°36.995	75°98.770
6B		11:29am	10°36.968	75°96.930
7B		1:12pm	11°08.620	74°53.467
8B	Lago del Cisne	1:35pm	11°08.660	74°53.435
9B		1:56am	11°11.250	74°53.807

4.2. Materiales y equipos

4.2.1. Materiales

Para la obtención del agua alquitranada se llevó a cabo la gasificación de diferentes biomásas características de la región caribe, facilitadas por la universidad de Cordoba: zea mays (maíz), Coco nutifera (coco), Sesamun indicumn (ajonjolí), Oryza sativa (arroz).

Para realizar los medios de cultivos probados y trabajados se utilizaron las formulaciones descritas en el manual de cultivos de microalgas [73], usando reactivos grado analítico.

Se construyó un cepario compuesto por un cuarto cuyas dimensiones son 3.5 metros de largo por 2 metros de ancho, encerrado por paredes y estanterías de vidrio, cada fila de estantería está dotada de 3 lámparas de halógenas blancas de 20 W (intensidad lumínica entre 2500 y 3500 lux).



Figura 13. Cepario construido

Para los diferentes tipos de cultivos y formas de almacenamiento se utilizaron, cajas Petri de vidrio de 90 mm de diámetro (cultivo sólido), para el cultivo líquido se utilizaron Erlenmeyer de 500 ml esterilizados y tapados con algodón con capacidad del triple al volumen del cultivo deseado, para las muestras congeladas hasta una temperatura de -80 °C se utilizaron eppendorf de 1,5 ml de capacidad.

Para los conteos se utilizaron cámaras de Nuebauer, utilizando en cada conteo un volumen de 10 µL.

Para los análisis realizados por espectrofotometría se utilizaron microcubetas de 100 µL plásticas para *uv-vis* marca sigma. Usando un espectrofotómetro UV-VIS evolution Thermo scientific.

Para las microextracciones de las muestras para posterior análisis con cromatografía de gases se utilizaron dos tipos de fibra PDMS y PDMS-V, viales con rosca 4 mL color ambar, tapas rosca con abertura superior, septas de s blanca recubiertas con teflón, todo marca supelco; hotplate and stirrer-115V.

En la elaboración de las curvas de calibración se utilizaron balones aforados de 100 y 10 mL, y xileno, fenol, naftaleno y metanol-reactivos grado analítico para realizar los patrones. Helio como gas de arrastre para la cromatografía, xileno, naftaleno y fenol grado analítico para curvas de calibración

4.2.2. Equipos

- Cromatógrafo gases TRACE 1310 thermo scientific
- Espectrometro de masas ISQ LT thermo scientific
- Columna para determinar hidrocarburos Rxi- 1ms RESTEK-GC
- Gasificador Ankur Scientific WBG – 20
- Espectrofotómetro UV-VIS evolution Thermo scientific
- Microscopios
- Shaker

4.3. Métodos

Este estudio se divide en tres componentes diferentes: recolección, mantenimiento y cultivo de Microalgas; Caracterización de aguas alquitranadas provenientes del proceso de gasificación; y Tratamiento de Agua alquitranada con microalgas. Para cada etapa de la investigación se enunciarán los procedimientos que se utilizaron para cumplir los objetivos específicos relacionados con cada una de ellas:

4.3.1. Recolección, mantenimiento y Cultivo de Microalgas:

Para este componente se derivan varias actividades: Recolección, cultivo y almacenamiento, identificación, mantenimiento del cepario y aislamiento cepas puras.

- *Recolección:* Se realizaron dos muestreos, primero a dos cuerpos de agua dulce del departamento del Atlántico: ciénaga de Luruaco y en el río Magdalena, en un sitio próximo al municipio de Sabanagrande en el mes de mayo del año 2014; el segundo muestreo se realizó a otros tres cuerpos de agua dulce lago del cisne, ciénagas de Mallorquín y Luruaco. Se tomaron tres muestras de 500 ml cada una por cada cuerpo, estas fueron trasladadas al laboratorio, se rotularon y guardaron..
- *Cultivo y Almacenamiento:* es necesario establecer las condiciones básicas de los cultivos. Variables como la temperatura, iluminación (Una variable que tiene un efecto más importante por su intensidad y el tiempo exposición que por el tipo específico de microalga [74]) y forma de agitación se establecieron en valores constantes para todas las muestras cultivadas (Tabla 7), donde el estudio de diferentes niveles de las variables que actúan sobre el crecimiento poblacional de los cultivos no se evaluó, sólo se garantizó el aumento de la densidad poblacional en los cultivos con el tiempo, con la construcción del cepario; adicionalmente, las microalgas necesitan tener un medio de cultivo del cual tomarán los macro y micronutrientes. De acuerdo a la opinión de investigadores expertos del Departamento de Biología de la Universidad del Norte (MSc Alma Polo), se recomendaron tres tipos de medios de cultivo: BBM (Bold's Basal Medium), BG11 y nutritfoliar, de los cuales no se reportan resultados de crecimiento para los grupos de

especies que pueden vivir en los cuerpos de agua a estudiar. Por lo tanto se probaron dos medios de cultivo (BBM y BG11) para los diferentes tipos de cultivo y almacenamiento.

Se probaron dos niveles de concentración para el inóculo, un nivel bajo donde se utiliza la muestra tomada directamente de la recolección y el otro nivel alto donde se concentra la muestra por centrifugación durante 7 minutos a 8500 RPM. Cabe anotar que para los cultivos a escala de laboratorio o más grandes es necesario que el **inóculo** tenga una concentración suficientemente alta al menos de sesenta mil células mililitro.

Se inocularon las muestras de tres maneras diferentes, en medio sólido con Agar-Medio de cultivo (BBM y BG11) en cajas petri, en medio líquido (medio de cultivo BBM Y BG11) en erlenmeyer y en glicerol para congelamiento en eppendorf, para este procedimiento en específico solo se utilizó el inóculo concentrado centrifugado de la alícuota de 1ml, se retira el sobrenadante, adiciona 0,5 ml de glicerol, se agita y se introduce en congelación a -40°C.

A continuación se especifican las condiciones de las variables que se mantuvieron constantes en toda la experimentación, esto se llevó a cabo con la construcción del cepario Tabla 12.

Tabla 12. Condiciones del cultivo de microalgas

Variable	Valor
Temperatura	22 °C
pH	no se modificó el de la muestras originales, Valores muy elevados o bajos (menor a 5) reducen el crecimiento poblacional por el rompimiento de muchos procesos celulares
intensidad luminosa	En el cepario se presenta en promedio 2500-3500 lux
Fotoperiodos	24/7. Las microalgas son fotoautótrofas, la fotosíntesis se favorece bajo la presencia de luminosidad
Suministro de aire	no se suministra aire, solo hay agitación manual y se garantiza área transversal adecuada para mejorar contacto
dióxido de	Solo el del aire que entra en contacto, se espera suplir este

Codificación para las muestras de la segunda recolección: Todas las muestras pretratadas para los diferentes almacenamientos y cultivos fueron rotuladas con el número de muestra proveniente (1-9), fecha (año (4), mes (inicial), día (#), tipo de siembra (S-L), medio (1: BG11, 2: BBM). Ejemplo: 14N27S1-muestra 1, tomada 2014, noviembre, 27, en medio sólido BG11.

Para la escogencia del medio de cultivo más adecuado a utilizar para las muestras recolectadas se llevó a cabo el cultivo de una de las muestras en los tres tipos de medio, en un Erlenmeyer de 1 litro se preparó un cultivo de 400 mL con un inóculo de 3 millones de células por mL, y se realizaron conteos diarios por triplicado en cámara de Neubauer todos los días por un mes. El medio escogido fue el que proporcionó una mayor densidad celular durante el tiempo de cultivo.

- *Identificación: una y dos semanas después de la inoculación en medio sólido y líquido, respectivamente, de las muestras recolectadas, se procedió a realizar la identificación taxonómica de las especies de microalgas presentes en dichas muestras. Para esto se tomaron fotos en el microscopio y se ubicaron atlas electrónicos para realizar la comparación taxonómica y así determinar el género; adicionalmente, se utilizaron manuales de reconocimiento taxonómico. Se recomienda, para posteriores estudios, realizar una identificación más precisa a través del secuenciamiento del ADN, con el fin de poder determinar no solo el género, sino también, la especie. Se realizaron seguimientos a través del tiempo de los tipos de microalgas presentes en cada muestra, ya que la interacción de grupos de microorganismos y las condiciones específicas en el cepario, restringen el crecimiento de algunas especies.*
- *Mantenimiento de cultivos en el cepario: las condiciones de temperatura e iluminación se mantuvieron constantes en el cepario; la aireación de los cultivos se realizó mediante agitación manual dos veces al día y la adición de medio de cultivo y remoción de sedimento en las muestras se llevó a cabo al menos una vez por semana, con el fin de tener cultivos vivos, sanos (verificables por su coloración verde*

billante y al observar en el microscopio células con buena coloración, tamaño y movilidad) y libres de sedimentos; cuando se hacía crítico este criterio se procedió a filtrar las muestras con filtro tamaño 100 μM .

- *Aislamiento cepas puras*: se probaron tres metodologías diferentes para obtener cepas unialgales de los cuerpos de agua recolectados:
 1. Capilaridad usando pipeta Pasteur según Pringsheim, 1946; Hoshaw y Rosowski, 1973; Stein, 1973; Surek y Melkonian, 2004; Andersen, 2005.
 2. Siembra-rayados en agar según Hoshaw y Rosowski, 1973; Anderson, 2005.
 3. Dilución clonal limitante en placas de 96 pozos según Freshney, 2010 y Davis 2011.

4.3.2. Caracterización de aguas alquitranadas provenientes del proceso de gasificación

Se tiene la disponibilidad de realizar la gasificación de diferentes tipos de biomasa procedentes de la región, entre estas se encuentra: coco, ajonjolí, maíz, arroz, entre otras. Se realizó en la planta de gasificación de biomasa en lecho fijo acoplada a un sistema de generación de potencia diseñado y construido por la empresa Ankur Scientific, de Modelo BGW 20 de 11KW. De este proceso de gasificación se producen alquitranes que no son deseados en posteriores usos del gas de síntesis, por lo tanto, son retirados por medio del lavado con agua de la corriente gaseosa de salida del gasificador; el efluente resultante se dirige a una piscina de recolección, dicha agua presenta tres fases, la menos densa presenta un aspecto oleoso y no supera al 10% en proporción de volumen, la fase intermedia que es la acuosa, la cual representa más del 60 % en relación de volumen y que es la escogida para el estudio y una fase densa que constituye el resto de la mezcla, donde se espera que se concentren los alquitranes más pesados y menos solubles en agua.

Por la naturaleza de la mezcla de hidrocarburos que pueden estar presentes en el agua se hace necesario realizar un análisis analítico riguroso. Para lo cual se propuso en primera medida llevar a cabo una extracción de los componentes del efluente acuoso, debido a que no se puede llevar a cabo la inyección de muestras acuosas para cromatografías de gases.

Como se propone adicionalmente a la caracterización de los efluentes de la gasificación el seguimiento de la biorremediación, realizar extracción con solventes es insostenible por los volúmenes de muestra necesarios para dicha operación (aproximadamente un litro) y para los experimentos que se trabajaron por la naturaleza de las microalgas y la capacidad de los cultivos generados no superan volúmenes de 20 ml en esta etapa del estudio. Además de ser una técnica amigable con el medio ambiente, por la no utilización de solventes orgánicos, los cuales son altamente tóxicos; de manera adicional se contaba en los laboratorios de química con la disponibilidad de dichas fibras, por lo tanto se realizó la extracción por SPME.

Además de la importancia de escoger la fibra más adecuada, es necesario determinar la forma de operación de la extracción. Esta puede ser por inmersión de la fibra o por espacio de cabeza. En este trabajo se probaron las dos fibras escogidas (PDMS Y PDMS-DVB) y las dos formas de operación mencionadas, para la misma muestra y para algunas de las soluciones patrones, obteniéndose buenos resultados con PDMS por espacio de cabeza y la PDMS-DVB por inmersión. Estas técnicas fueron las que se utilizaron a lo largo del trabajo. Adicionalmente al tipo de fibra es importante tener en cuenta la temperatura de extracción, por lo tanto se escogió una temperatura intermedia a las reportadas por la literatura [30], se llevó a cabo a 85 °C.

Para la extracción, primero se toma 2 ml de la muestra a analizar, se coloca en un vial para SPME, se adicionan 30 mg de cloruro de sodio (NaCl), se tapa la muestra y se agita bien, luego se coloca a precalentar durante 10 min en la plancha como se muestra en la Figura 14; luego se inserta la fibra utilizando el *holder* para fibras, dependiendo del modo de operación se introduce más en la muestra, para el modo de operación de espacio de cabeza, la fibra no toca la muestra, solo se deja en contacto con los vapores generados, por inmersión como su nombre lo indica se introduce la fibra en la muestra, el método de operación depende de la naturaleza de la muestra y la afinidad de la fibra, se mantiene la fibra en la muestra durante 50 minutos, posteriormente se retira la fibra del vial y se introduce en el cromatógrafo de gases para llevar a cabo la desorción de la muestra, como lo muestra la Figura 15, el detector utilizado es un espectrómetro de masas el cual da la posibilidad de determinar el tipo de compuesto obtenido a partir de comparación de índices de refracción calculados, con los teóricos, que están en la base de datos del software con el

que cuenta el equipo, estos valores son rectificados con bases de datos del NIST (National Institute of Standards and Technology), el reconocimiento de todos los compuestos presentes en las muestras alquitranadas está en elaboración. El método cromatográfico que se empleó es el recomendado por el Ph.D. Amner Muñoz, quien lo ha depurado a través de un gran número de pruebas que ha realizado a lo largo de su carrera como investigador. Este método es el adecuado para hidrocarburos y se utiliza como gas de arrastre helio, el método tiene una duración de 50 minutos después de la desorción de los analitos.



Figura 14. Montaje para extracción de analitos por SPME



Figura 15. Sistema de análisis (lado derecho cromatografo de gases, lado izquierdo espectrometro de masas)

4.3.3. Tratamiento del Agua alquitranada con microalgas.

Se realizaron diferentes pruebas de supervivencia de las microalgas de las muestras recolectadas, para lo cual, se trabajaron con la mezcla completa de microalgas de cada uno de los cuerpos de agua, sin aislar las especies, con el fin de evaluar el potencial de adaptación de los microorganismos a las condiciones del contaminante. Se realizaron varios experimentos con la finalidad de orientar el estudio a determinar la capacidad degradativa de las microalgas y las condiciones adecuadas para este fin, sin embargo, se dejaron constantes algunos parámetros como: Intensidad luminosa, foto periodo, medio de cultivo, temperatura, agitación, entre otras. Se escogieron dos variables medibles para el avance en el objetivo: monitoreo de la variación de la densidad poblacional de los ensayos y la reducción de contaminante en la muestra. A continuación se describe cada muestra de supervivencia.

4.3.3.1. Prueba de supervivencia I:

Del primer muestreo se evaluaron las 3 muestras recolectadas. Se tomó como base un volumen de 10 ml de cultivo líquido, cuya composición fue 1,5 ml de agua alquitranada de Maíz y 8,5 ml de cultivo de las 3 muestras mencionadas anteriormente, con la composición mostrada en la Tabla 14, y se mantuvieron durante 20 días a la temperatura del cepario, alrededor de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$. La iluminación se sustentó con lámparas de 20 W durante todo el experimento, se pueden presentar fluctuaciones en la iluminación por el alcance solar dentro del cepario. Los factores presentes en el experimento se describen en la Tabla 14. El criterio de avance durante la experimentación fueron los conteos de células por especies en cámara de Neubauer.

Tabla 13. Factores Prueba de supervivencia I

Controlables	NO Controlables
<ul style="list-style-type: none"> - Temperatura ambiente, 23 °C. - Nivel de iluminación: entre 2500 y 3500 lux - Nutrientes suministrados (medio de cultivo) - Lugar de proveniencia de las microalgas. - 1 nivel de Concentración de contaminante en el medio de cultivo: 2,5 AAlq / 7,5 medio - Temperatura del medio de cultivo. 	<ul style="list-style-type: none"> - Nivel de iluminación. - Composición de microalgas y presencia de otros microorganismos en el cultivo. - Composición química del contaminante. - Cantidad de microalgas en el cultivo

Tabla 14. Característica de los cultivos bases prueba supervivencia I

Montaje	Muestra	Densidad celular (células/ml)	Composición microalgal inicial	Cuerpo de agua
1	5A	3.312.500	<i>Scenedesmus sp</i> (43 %) <i>Chlorella sp</i> (53 %) <i>Oscillatoria sp</i> (4%)	Ciénaga de Luruaco
2	7A	2.812.500	<i>Navicula sp</i> (22%) <i>Scenedesmus sp</i> (6%) <i>Chlorella sp</i> (72 %)	Sabanagrande
3	10A	1.875.000	<i>Navicula sp</i> (31%) <i>Scenedesmus sp</i> (7%) <i>Chlorella sp</i> (60 %) <i>Selenastrum sp</i> (2 %)	

A partir del desarrollo del método se hizo necesario explorar de manera más amplia hacia los otros cuerpos de agua y su diversidad de especies y la posibilidad de incrementar la cantidad de contaminante, por esto se planteó la prueba de supervivencia II.

4.3.3.2. Prueba de supervivencia II:

Se evaluaron 12 muestras, las 3 muestras de la primera recolección y 6 muestras de la segunda recolección (las que presentaban mayores conteos). Se tomó como base un volumen de 15 ml de cultivo líquido, se evaluaron cuatro niveles de contaminante, para este aspecto se prepararon tres soluciones del medio de cultivo con las diferentes cantidades de contaminante, y el para el nivel cero de contaminante se utilizó el medio de cultivo del mantenimiento habitual de las muestras del cepario; con esto se garantizan condiciones fijas de micronutrientes y macronutrientes que toman las microalgas del medio de cultivo. Se partió de un número fijo de células para garantizar que los cultivos fueran uniformes en unidades de remoción. La información referente a las muestras y su composición se muestra en la Tabla 16, se mantuvo durante 17 días en condiciones de temperatura del ambiente y del cepario constante alrededor de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, la iluminación se sustentó con lámparas a una intensidad de 2100 lux se encerraron las muestras con cartulinas negras para evitar filtración de luz externa durante todo el experimento. Los factores presentes en el experimento se describen en la Tabla 15. El criterio de avance durante la experimentación fueron los conteos de células por especies en cámara de Neubauer. Para el caso de la concentración de alquitranes se tomaron dos cromatogramas previo y posterior al tratamiento, para realizar una comparación cualitativa.

Tabla 15. Factores Prueba de supervivencia II

Controlables	NO Controlables
<ul style="list-style-type: none"> - Temperatura ambiente 23°C - Nivel de iluminación: 2700 lux. - 4 nivel de Concentración de contaminante en el medio de cultivo (0%, 10%, 15%, 20%). - Temperatura del medio de cultivo: 22°C - Cantidad de microalgas en el cultivo: 70.000 - Agitación: shaker a 170 RPM - Nutrientes suministrados (medio de cultivo BBM) - Lugar de proveniencia de las microalgas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Composición de microalgas y presencia de otros microorganismos en el cultivo. - Composición química del contaminante. - Relación volumétrica microalga/medio alquitranado

Tabla 16. Característica de los cultivos bases prueba supervivencia II

Muestra	Cuerpo de agua	Id	Géneros
1B	Ciénaga de Mallorquín	001B-0%Alq	<i>Chlorella</i> <i>Scenedesmus</i> <i>Chroococcus sp</i> <i>No Id. sp2</i>
		001B-10%Alq	
		001B-15%Alq	
		001B-20%Alq	
4B		004B-0%Alq	<i>Chlorella</i> <i>Scenedesmus</i> <i>Ankistrodesmus</i> <i>No Id. sp2</i>
		004B-10%Alq	
		004B-15%Alq	
		004B-20%Alq	
5B	Ciénaga de Luruaco	005B-0%Alq	<i>Chlorella</i> <i>Scenedesmus</i> <i>Chroococcus sp</i> <i>No Id. sp2</i>
		005B-10%Alq	
		005B-15%Alq	
		005B-20%Alq	
6B		006B-0%Alq	<i>Chlorella</i> <i>Scenedesmus</i> <i>Chroococcus sp</i> <i>No Id. sp2</i>
		006B-10%Alq	
		006B-15%Alq	
		006B-20%Alq	
7B	Lago del Cisne	007B-0%Alq	<i>Chlorella</i> <i>Navicula</i> <i>Scenedesmus</i> <i>Chroococcus sp/No Id. sp2</i>
		007B-10%Alq	
		007B-15%Alq	
		007B-20%Alq	
9B		009B-0%Alq	<i>Chlorella</i> <i>Navicula</i> <i>Scenedesmus</i> <i>Chroococcus sp/No Id. sp2</i>
		009B-10%Alq	
		009B-15%Alq	
		009B-20%Alq	
5A	Ciénaga de Luruaco	005A-0%Alq	<i>Chlorella</i> <i>Navicula</i> <i>Chroococcus sp</i> <i>No Id. sp2</i>
		005A-10%Alq	
		005A-15%Alq	
		005A-20%Alq	
7A	Sabanagrande	007A-0%Alq	<i>Chlorella</i> <i>Chroococcus sp</i> <i>No Id. sp2</i>
		007A-10%Alq	
		007A-15%Alq	
		007A-20%Alq	
10A		010A-0%Alq	<i>Chlorella</i> <i>Navicula</i> <i>Scenedesmus</i> <i>Chroococcus sp/No Id. sp2</i>
		010A-10%Alq	
		010A-15%Alq	
		010A-20%Alq	

4.3.3.3. Prueba de supervivencia III:

Se escogieron los cuerpo de agua con el mejor comportamiento en cuanto a crecimiento celular ante la acción del contaminante, esperando que dicha tendencia pueda ser indicio de mejor adaptación al contaminante, adicionalmente se modificó la cantidad de medio de cultivo (concentración de nutrientes), se realizó una dilución 4:1, a partir de esta solución se realizó el medio de cultivo con cuatro niveles de concentraciones de agua alquitranada como se muestra en la Tabla 20; esta condición de estrés se genera con el fin de obligarlas a que se alimenten en mayor medida de los compuestos alquitranados. Se tomó como base un volumen de 8 ml de cultivo líquido. Con el fin de lograr una adaptabilidad de las microalgas, se mantuvieron durante varios días, el conteo celular se llevó a cabo durante la primera semana, posteriormente se realizó observación al crecimiento una vez por semana, hasta que la densidad celular fue muy alta para la muestra con mayor concentración de contaminante ($1,7 \times 10^7$ células/mL) y la que no tenía contaminante estaba en su nivel más bajo de concentración celular, así se garantizó que las fuentes de nutrientes del medio BBM ya se hubieran agotado y solo se siguiera el crecimiento a partir de lo que se tomara del medio alquitranado. Las condiciones de la experimentación se detallan en la Tabla 17 y 14. La temperatura del cepario se mantuvo alrededor de $23 \pm 1^\circ\text{C}$. La iluminación se sustentó con lámparas de 20 W durante todo el experimento.

Tabla 17. Factores Prueba de supervivencia III

Controlables	NO Controlables
- Temperatura ambiente 23°C	- Otros microorganismos en el cultivo.
- Nivel de iluminación: entre 2500 y 3500 lux	- Composición química del contaminante.
- Lugar de proveniencia de las microalgas.	- Nutrientes suministrados (medio de cultivo) es variable para todas las muestras
- 4 nivel de Concentración de contaminante en el medio de cultivo.: 0%, 15%, 25%, 35%	
- Temperatura del medio de cultivo.	
- Composición de microalgas y carga celular inicial	

Adicional al conteo se realizaron curvas de espectrofotometría, para determinación de si la hipótesis que las microalgas están remediando o degradando la mezcla de alquitranes sea sustentada con la disminución de los contaminantes y/o la producción de otras sustancias adicionales a las que tienen los medios de cultivo preparados. Como se mencionó anteriormente, es indispensable establecer las variables que den información adecuada para determinar el avance de un proceso. En numerales anteriores, se referencia la utilización de métodos ópticos indirectos para determinar la cantidad de microalgas

presentes en función del tiempo, pero es importante tener en cuenta que al introducir dentro del estudio uno o varios contaminantes y los productos del metabolismo de las microalgas, la mezcla resulta tan compleja que se anticipan la presencia de interferencias en la determinación de concentraciones por métodos espectrofotométricos. Generalmente, estos métodos se utilizan en los procesos de biorremediación para recolectar evidencias semi-cuantitativas sobre la extensión del crecimiento de la población de microorganismos y por otro lado, determinar si la concentración de los compuestos a eliminar disminuye significativamente.

Tabla 18. Condiciones cultivos prueba supervivencia III

Muestra	Relación Medio de cultivo diluido/Agua alquitranada (mL)	Condiciones experimentales para el inóculo
431J0	7,146/0	<ul style="list-style-type: none"> - Composición microalgal: <i>Scenedesmus sp</i> (43 %), <i>Chlorella sp</i> (53 %) - Densidad celular inicial: $1,5 \times 10^6$ - Volumen adicionado: 0,8454 mL
431J1	5,946/1,2	
431J2	5,146/2	
431J3	4,346/2,8	
831J0	7,208/0	<ul style="list-style-type: none"> - Composición microalgal: <i>Chlorella sp</i> (50%), <i>Chorococcus</i> (30%) <i>Scenedesmus sp</i> (20 %) - Densidad celular inicial: $1,5 \times 10^6$ Volumen adicionado: 0,7921 mL
831J1	6,008/1,2	
831J2	5,208/2	
831J3	4,408/2,8	

Se prepararon diferentes soluciones que fueron pasadas por el espectrofotómetro en todo el espectro de UV-VIS (190 nm hasta 900 nm):

- Diluciones de agua alquitranada a diferentes concentraciones
- Las muestras tratadas con microalgas Cultivos centrifugados y sin centrifugar
- Cultivos con el mismo número de células de las muestras tratadas, pero sin nada de contaminante.

Se determinaron los valores máximos de absorbancia para longitudes de onda características dependiendo del tipo de sustancia o microorganismo.

Las microalgas obtenidas de este experimento para el nivel más alto de contaminante se separaron a través de centrifugación, el sobrenadante fue utilizado en las pruebas de espectrofotometría y cromatografía de gases (utilizando la misma metodología usada para el análisis de las aguas alquitranadas, descrita anteriormente), las microalgas fueron utilizadas como inóculo de un cultivo de 100 ml, que se utilizó en el experimento final.

4.3.3.4. Prueba de supervivencia IV:

Con el fin de determinar el máximo nivel de resistencia al contaminante por parte de las microalgas provenientes del cuerpo de agua que arrojó el mejor comportamiento en crecimiento celular de la prueba de supervivencia II, se realizó la prueba de supervivencia IV.

Se tomó la muestra 4 que proviene del cuerpo de agua laguna de Luruaco, adicionalmente se modificó la cantidad de medio de cultivo (concentración de nutrientes), se realizó una dilución 4:1, a partir de esta solución se realizó el medio de cultivo con cuatro niveles de concentraciones de agua alquitranada como se muestra en la Tabla 20. Condiciones cultivos prueba supervivencia I Tabla 20; esta condición de estrés se genera con el fin de obligarlas a que se alimenten en mayor medida de los compuestos alquitranados. Se tomó como base un volumen de 8 ml de cultivo líquido. Se realizó seguimiento con conteo celular durante 23 días, Las condiciones de la experimentación se detallan en la Tabla 19. La temperatura del cepario se mantuvo alrededor de $23 \pm 1^\circ\text{C}$. La iluminación se sustentó con lámparas de 20 W durante todo el experimento.

Tabla 19. Factores Prueba de supervivencia IV

Controlables	NO Controlables
- Temperatura ambiente.	- Nivel de iluminación.
- Nivel de iluminación: entre 2500 y 3500 lux	- de otros microorganismos en el cultivo.
- Lugar de proveniencia de las microalgas.	- Composición química del contaminante.
- 4 nivel de Concentración de contaminante en el medio de cultivo.: 45%, 65%, 75%, 87%	- Nutrientes suministrados (medio de cultivo) es variable para todas las muestras
- Temperatura del medio de cultivo.	
- Composición de microalgas y carga celular inicial	

Tabla 20. Condiciones cultivos prueba supervivencia I IV

Muestra	Relación Medio de cultivo diluido/Agua alquitranada (mL)	Condiciones experimentales para el inculo
418S4	3,373/3,6	- Composición microalgal: <i>Scenedesmus sp</i> (75 %), <i>Chlorella sp</i> (25%) - Densidad celular inicial: $11,7 \times 10^6$ - Volumen adicionado: 1,03 mL
418S5	2,173/4,8	
418S6	0,973/6,0	
418S7	0,013/6,96	

4.3.3.5. Diseño Factorial para microalgas adaptadas y sistema modelo de contaminantes:

La adecuada selección del diseño experimental es fundamental en el proceso de toma y análisis de los resultados. Una característica del fenómeno bajo estudio es la alta variabilidad en las observaciones, por lo cual el uso de réplicas no es suficiente para asegurar que se está realizando una comparación adecuada entre el efecto de los factores de interés y la variabilidad natural del fenómeno que involucra microorganismos. Esta idea se ilustra en la Figura 16(a), en donde la línea negra representa un posible comportamiento del proceso de estudio y cada esfera es una observación. Se nota que la variabilidad oculta el cambio de media que se obtiene si se pasa de un nivel a otro.

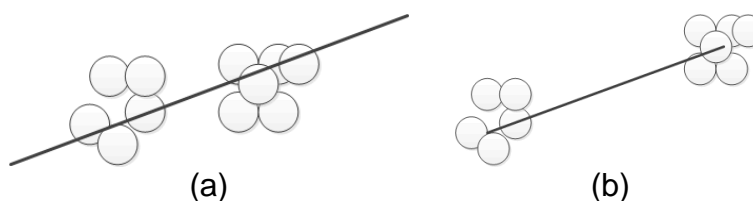


Figura 16. Variabilidad del sistema de estudio

Más que realizar excesivas replicas, la mejor opción es escoger un adecuado espaciamiento entre los niveles de los factores de interés, tal y como se muestra en la Figura 17 (b). Por otro lado, es altamente improbable que la respuesta del fenómeno sea descrito apropiadamente por una regresión lineal. Por lo tanto es de esperarse que exista algún tipo de curvatura dentro de la región de experimentación. Por tal motivo se decide añadir punto central al diseño experimental, como se muestra en la Figura 17. De manera

análoga a la figura anterior la línea negra representa un posible comportamiento del proceso de estudio y las esferas indican las observaciones de la variable de respuesta. La inclusión de puntos centrales permite un mejor ajuste a esta respuesta que únicamente teniendo en cuenta las observaciones de los extremos.

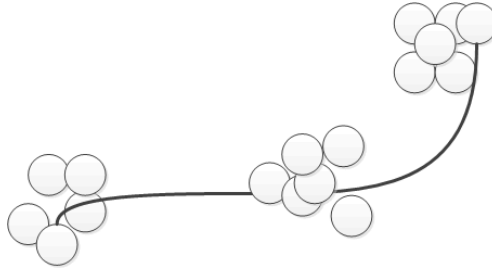


Figura 17. Elección de réplicas y puntos centrales

Por los motivos anteriores el diseño escogido es un DOE de dos niveles para dos variables cuantitativas, que son la concentración de contaminante y la concentración de medio de cultivo y cinco niveles para el tiempo como variable cualitativa con una réplica y 1 punto central, lo cual da un total de 50 corridas experimentales, además se realizan blancos sin microalgas de los diferentes niveles de contaminante y medio de cultivo con el fin de analizar el comportamiento de las muestras sin la acción de las microalgas y viceversa. Se muestra una de las réplicas en la Tabla 21 sin tener en cuenta el orden en el que se ejecutaron, debido a que todas las muestras se encuentran al mismo tiempo en la ejecución del experimento.

Tabla 21. Diseño de experimento a ejecutar

Relación Medio/Agua	Concentración ppm	Codificación
1	2	4B11-2
4	2	4B12-4
1	5	4B21-1
4	5	4B22-3
2.5	3.5	4BCP-9
1	2	0B11-
1	5	0B21-
4	2	0B12-
4	5	0B22-
2.5	3.5	0BCP-

A diferencia de las anteriores pruebas de supervivencia se trabajó con una mezcla de sustancias puras que hacen la parte del contaminante, esta solución se preparó con xileno, fenol y naftaleno representantes de las sustancias presentes en las aguas alquitranadas de maíz; se propuso tomar estos representantes de cada familia de compuestos presentes en los alquitranes del agua de gasificación del maíz, para determinar de qué manera metabolizan los compuestos las microalgas o si solo retienen en su estructura el contaminante por acumulación. Se utilizaron las microalgas En la Tabla 22 se especifican los factores tenidos en cuenta para el experimento.

Se propone extracción por SPME con cromatografía de gases y detector de masas, para el seguimiento de estas reacciones, se deben tomar muestras para analizar en el tiempo, con el fin de establecer la cinética de reacción para los reactivos y el producto obtenido del proceso metabólico de las microalgas.

Se debe realizar el análisis al comienzo del experimento para verificar que las concentraciones de contaminante son las referenciadas para los cultivos, esto es verificable a partir de la curva de calibración con los tres patrones a diferentes concentraciones incluyendo el rango de trabajo. El procedimiento para extracción y análisis es el mencionado en el inciso de análisis de agua alquitranada.

Tabla 22. Factores Diseño de experimento factorial

Controlables	NO Controlables
<ul style="list-style-type: none"> - Temperatura ambiente. - Nivel de iluminación: 1500 lux - Lugar de proveniencia de las microalgas. - Niveles de Concentración de contaminante en el medio de cultivo.: 45%, 65%, 75%, 87% - Temperatura del medio de cultivo. - Composición de microalgas y carga celular inicial 	<ul style="list-style-type: none"> - Otros microorganismos en el cultivo. - Composición química del contaminante. - Nutrientes suministrados (medio de cultivo) es variable para todas las muestras

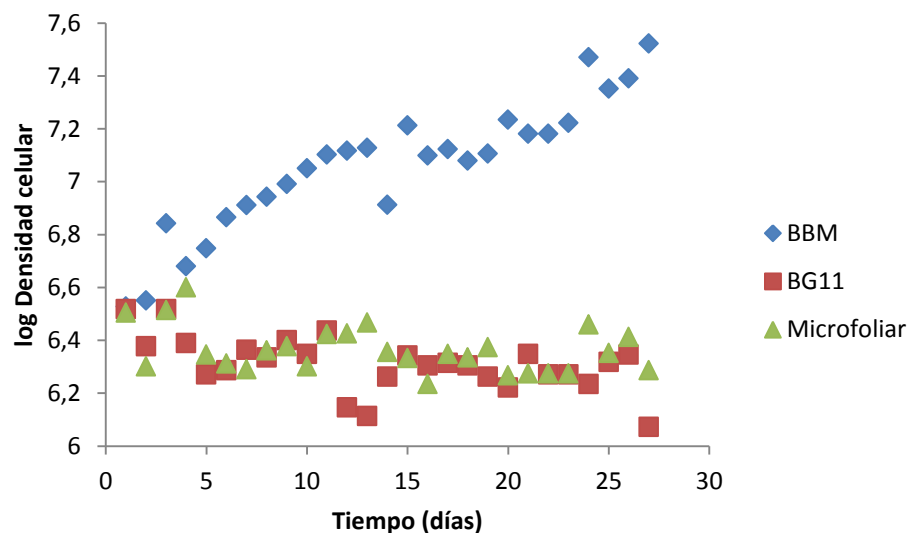
5. Resultados

5.1. Cultivos de Microalgas

De las formas de cultivos ensayadas Figura 18 se encontró que para medio sólido con BBM o BG11, el utilizar inóculo de las muestras sin concentrar no ofrece resultados adecuados, ya que no se presentan crecimiento de colonias, solo hongos; por lo tanto, se recomienda la concentración de las muestras recolectadas para la apreciación de los tipos de microalgas de manera adecuada; un cultivo sólido sano es un instrumento importante para empezar a caracterizar los tipos de microalgas presentes en los cuerpos de agua, debido a que se pueden observar el crecimiento por colonias facilitando identificación por géneros y su posible separación.

Para los cultivos en medio líquido se obtuvo que el mejor medio de cultivo es el BBM, como lo muestra la gráfica 1. Después de un mes de seguimiento, el que presenta la mejor tendencia de crecimiento es la muestra que se presenta a continuación.

Gráfica 1. Curvas de crecimiento en cultivo sumergido para la muestra 1 utilizando diferentes formulaciones de medios



Tomando en cuenta estos resultados, todos los cultivos líquidos, se siguieron utilizando la formulación del medio de cultivo BBM.



Figura 18. Tipos de almacenamientos y cultivos

Se probó resembrar en medio líquido las muestras congeladas, pero no se obtuvo ningún resultado positivo respecto al crecimiento de microalgas; a continuación se describe el procedimiento realizado: se tomaron las muestras del congelador y se aclimataron durante dos horas cuidando que no hubiese ningún tipo de contacto con el ambiente que permitiera la contaminación, en la campana de flujo laminar del laboratorio de biología de la Universidad del Norte, se abrió el eppendorf y con un palillo esteril de madera, se tomó parte de la muestra, la cual se introdujo después en erlenmeyers de 100 ml con medio de cultivo BBM, se tapó y ajito dicho cultivo y se colocó en el cepario, se realizó seguimiento durante dos semanas, sin encontrar cambio con respecto a crecimiento de microalgas en el cultivo.

Las muestras en medio sólido preservadas en refrigeración si presentaron crecimiento celular al momento de resembrar. Se probó la inoculación con las muestras originales que estaban refrigeradas, las cuales, una vez atemperadas a condiciones ambientales, se concentraron por centrifugación y se inocularon en medio líquido y BBM como medio de cultivo, presentando también crecimiento celular. De esto se concluye que el cultivo en medio sólido que se refrigera después de crecer y las muestras recolectadas refrigeradas y concentradas son métodos efectivos de almacenamiento y preservación de las microalgas utilizadas en este trabajo.

Se realizó el seguimiento de los cambios aparentes en los cultivos en sólido y líquido de las muestras una semana después de la siembra sólida se observó crecimiento, como lo muestra la Figura 19. Estas muestras se observaron en el microscopio y fueron soporte importante para la identificación de géneros para cada muestra de agua; en cuanto a las muestras líquidas, se establecieron las condiciones adecuadas para preservación en el cepario, condiciones de temperatura de 23°C, agitación manual, al menos 2 veces en el día, iluminación artificial con intensidad lumínica en promedio de 3000 lux, suministro de nutrientes al menos una vez por semana con medio de cultivo BBM en relación 1:4 con agua, retirando parte del cultivo y agregando medio, esto con el fin de mantener un volumen de cultivo constante; la relación de volumen de medio de cultivo fresco y caldo desocupado debe ser al menos 1:2, esto con el fin de permitir la aireación del mismo, con lo cual se mejora el crecimiento de las microalgas; adicionalmente, de ser necesario, se deben filtrar las muestras que presentes mucho precipitado ya que esto presenta un efecto negativo en el crecimiento celular.



Figura 19. Seguimiento a crecimiento de cultivos sólidos y líquidos después de una semana



Figura 20. Seguimiento de cultivos un mes después

5.1.1 Identificación

A partir de los registros fotográficos en la muestra recolectada en las aguas del río Magdalena, cerca de Sabanagrande-Atlántico, como lo muestra la Figura 21, miradas a través del microscopio y posterior comparación con atlas electrónicos y revisión en manual [75] se pudieron identificar las siguientes microalgas: *Scenedesmus obliquus*, *Scenedesmus sp.*, *Chlorella sp.*, *Selenastrum sp.*, *Cosmarium sp.*, *Pinnularia nobilis* y *Navícula sp.*. En tanto que en las aguas de la ciénaga de Luruaco, se identificaron únicamente *Oscillatoria sp* y *Chlorella sp* en las zonas ribereñas. Vale mencionar que al centro de la corriente las aguas no mostraban presencia de algas vivas, sólo restos de material vegetal. En cuanto al segundo muestreo, se realizó seis meses después en los lugares descritos en la Tabla 23.



Brazo del rio Magdalena- Sabanagrande



Laguna de Luruaco

Figura 21. Cuerpos de agua, Primer muestreo

Se muestran algunas de las fotografías representativas obtenidas de los dos muestreos en la Tabla 25 y Tabla 24, a partir de estos registros.

Tabla 23. Cuerpos de agua. Segundo muestreo

**2 – (24 de
Noviembre de
2014)**



Laguna de Luruaco

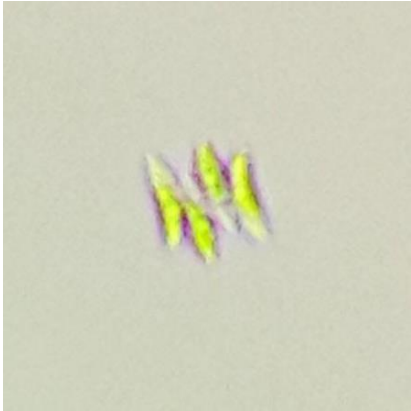


Lago del Cisne

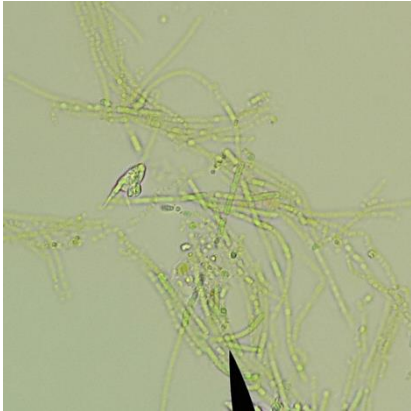


Ciénaga de Malloquín

Tabla 24. Registro fotográfico de muestras estudiadas para Identificación visual por géneros de microalgas



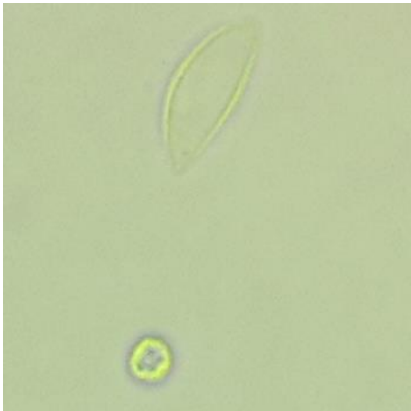
Scenedesmus Sp



Anabaena Sp



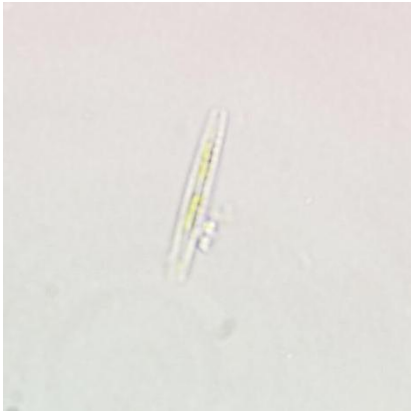
Cyanothece sp



Diploneis sp



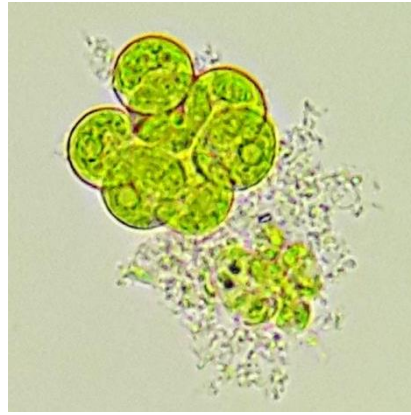
Ankistrodesmus sp



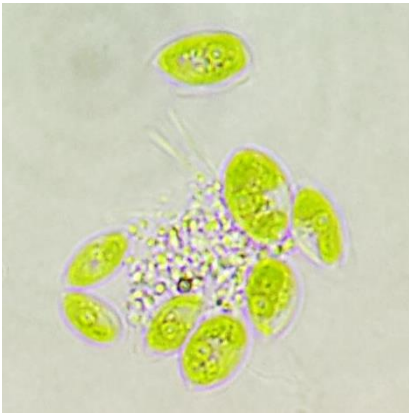
Navicula sp



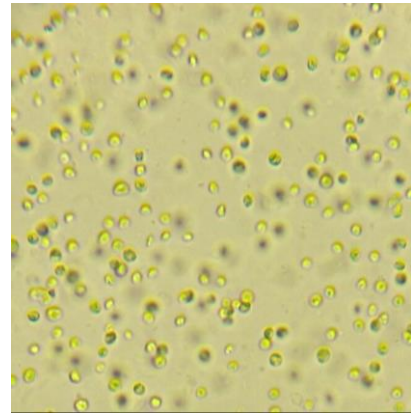
Anabaena Bory



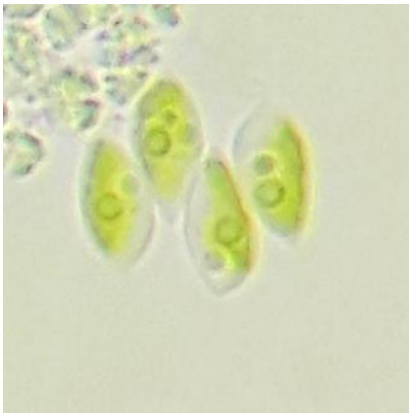
Chlorococcus sp



Euglena sp



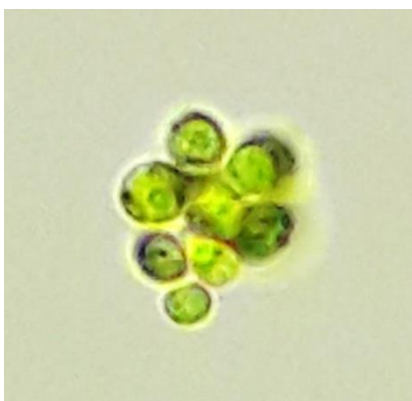
Chlorella sp



Scenedesmus sp 2



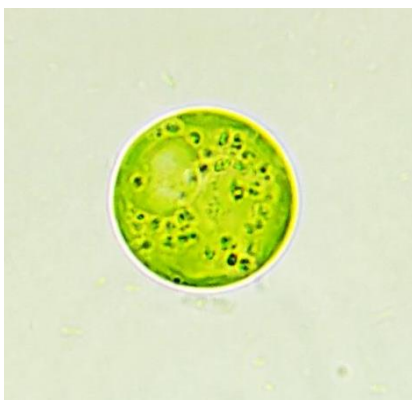
Monoraphidium sp



Especie 2. No identificada


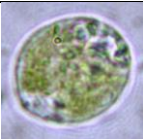
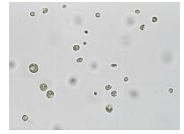
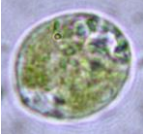









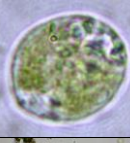



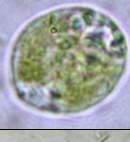





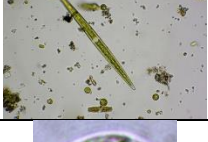
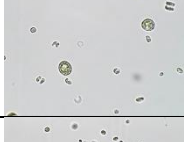
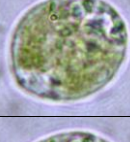
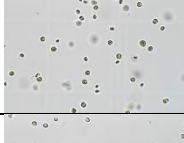
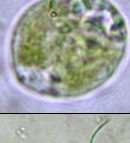




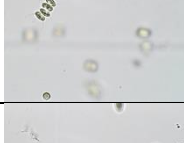



Ankistrodesmus sp


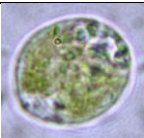





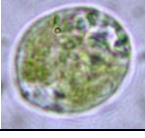


Eudorina sp

Tabla 25. Identificación visual de especies de microalgas presentes en las muestras

Muestra	Especies encontradas	Foto de la microalga	Referencia de comparación
1B	<i>Chlorella</i> sp.		
2B	<i>Chlorella</i> sp.		
	<i>Senedsmus denticulatus</i>		
	<i>Closterium acerosum</i> .		

3B	<i>Senedesmus</i> sp.		
	<i>Chlorella</i> sp.		
4B	<i>Closterium acerosum</i>		
	<i>Chlorella</i> sp.		
	<i>Senedesmus quadricauda</i>		
5B	<i>Senedesmus quadricauda</i>		
	<i>Closterium acerosum</i>		
	<i>Chlorella</i> sp.		
6B	<i>Chlorella</i> sp.		
	<i>Senedesmus quadricauda</i>		
7B	<i>Senedesmus quadricauda</i>		
8B	<i>Senedesmus quadricauda</i>		
	<i>Senedesmus acuminatus</i>		

	<i>Chlorella</i> sp.		
9B	<i>Senedesmus</i> sp.		
	<i>Senedesmus acuminatus</i>		
	<i>Chlorella</i> sp.		

El registro de especies de microalgas, para el periodo de tiempo de esta investigación ha cambiado, tal como se muestra en la Tabla 26. Se cree que diferentes factores han influenciado para desencadenar esta selección natural [76].

Tabla 26. Géneros por muestras observadas después de 11 meses del muestreo

Muestra	Genero encontradas	Muestra	Genero encontradas
1	<i>Chlorella</i> , <i>Senedesmus</i>	7	<i>scenedesmus</i>
			<i>Navicula</i> , <i>Chlorella</i>
2	<i>Chlorella</i>	8	<i>Chlorella</i> , <i>Chorococcus</i> sp,
3	<i>Senedesmus</i>		<i>Senedesmus</i>
	<i>Chlorella</i>	9	<i>Senedesmus</i>
4	<i>Chorococcus</i> sp, <i>Chlorella</i> , <i>scenedesmus</i>		<i>Chlorella</i>
	5		<i>Chorococcus</i> sp, <i>Chlorella</i>
6		<i>Chlorella</i> , <i>Chorococcus</i> sp, <i>scenedesmus</i>	<i>Navicula</i>

5.1.2 AISLAMIENTO

Después de probar los diferentes métodos de aislamiento y de la selección natural de las condiciones de cultivo del cepario, se presume que se logró aislar *Chlorella* sp. *Scedesmus* sp, *Navicula* sp y *Chroococcus* sp, de diferentes muestras de las recolectadas. El método usado para llevar a cabo este aislamiento es estadístico, por lo que puede existir una

probabilidad muy pequeña de que se encuentre algún otro tipo de especie, aparte de la que se pueda observar, se recomienda realizar seguimiento a través del tiempo que confirme el aislamiento total de la especie. Posteriormente las especies aisladas se escalaron para cultivo en medio líquido BBM (Bold's Basal Medium) como se muestra en la Figura 22. Crecimiento en medio líquido de especies aisladas. 35 días.



Figura 22. Crecimiento en medio líquido de especies aisladas. 35 días

5.2. Caracterización de aguas alquitranadas provenientes del proceso de gasificación

Se determinó que para muestras alquitranadas que presentan perfiles variados de las familias de compuestos, como sucede cuando se cambia la biomasa que se va a gasificar, o las condiciones de operación en el gasificador, hay compuestos polares y no polares en diferentes proporciones, con diferencias en puntos de ebullición y volatilidad, los resultados obtenidos pueden modificarse para la misma muestra pero con fibra y forma de operación diferente. A continuación se muestran los cromatogramas para las diferentes aguas alquitranadas obtenidos por extracción con fibra PDMS y extracción de espacio de cabeza, se está trabajando en el reconocimiento total de los picos para todas las aguas, obtención de los cromatogramas para extracción con fibra PDMS-VDB, para posterior cuantificación. Las Figura 23, Figura 24, Figura 25 y Figura 26, muestran los cromatogramas obtenidos hasta el momento, EL RECONOCIMIENTO de los tipos de compuestos se está realizando y se hace necesario confrontar resultados obtenidos en los ensayos con bases de de datos, proceso que requiere de esfuerzos importantes que se están llevando a cabo en conjunto con el departamento de Química del a Universidad del Norte.

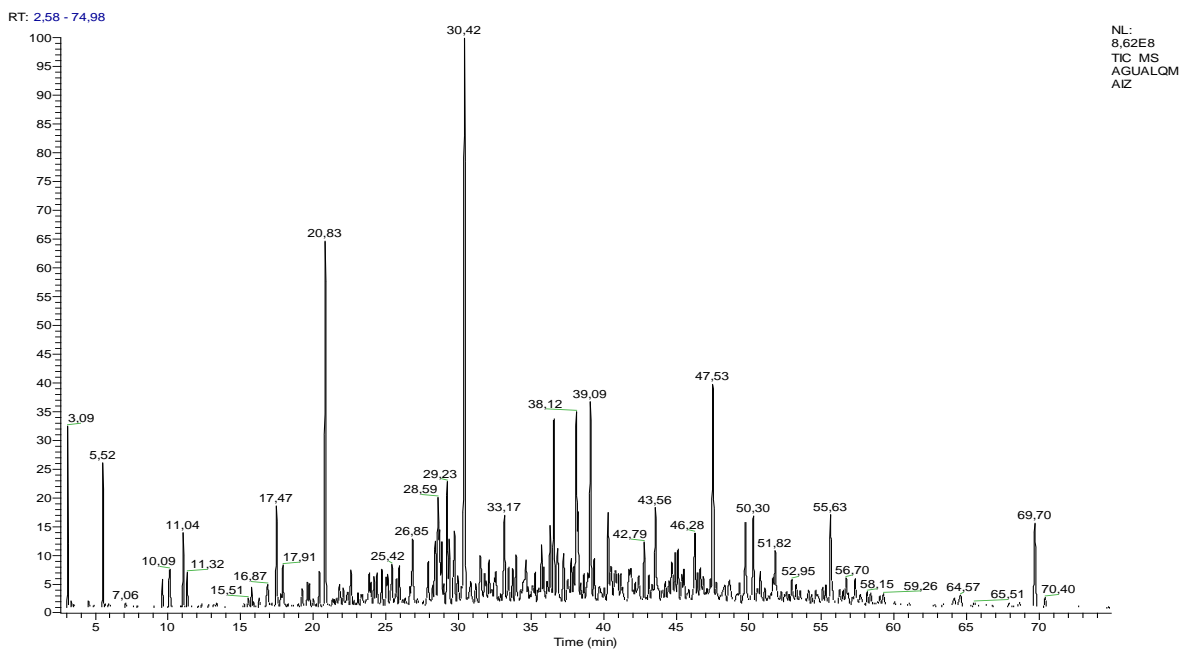


Figura 23. Cromatograma agua alquitranada de gasificación de maíz

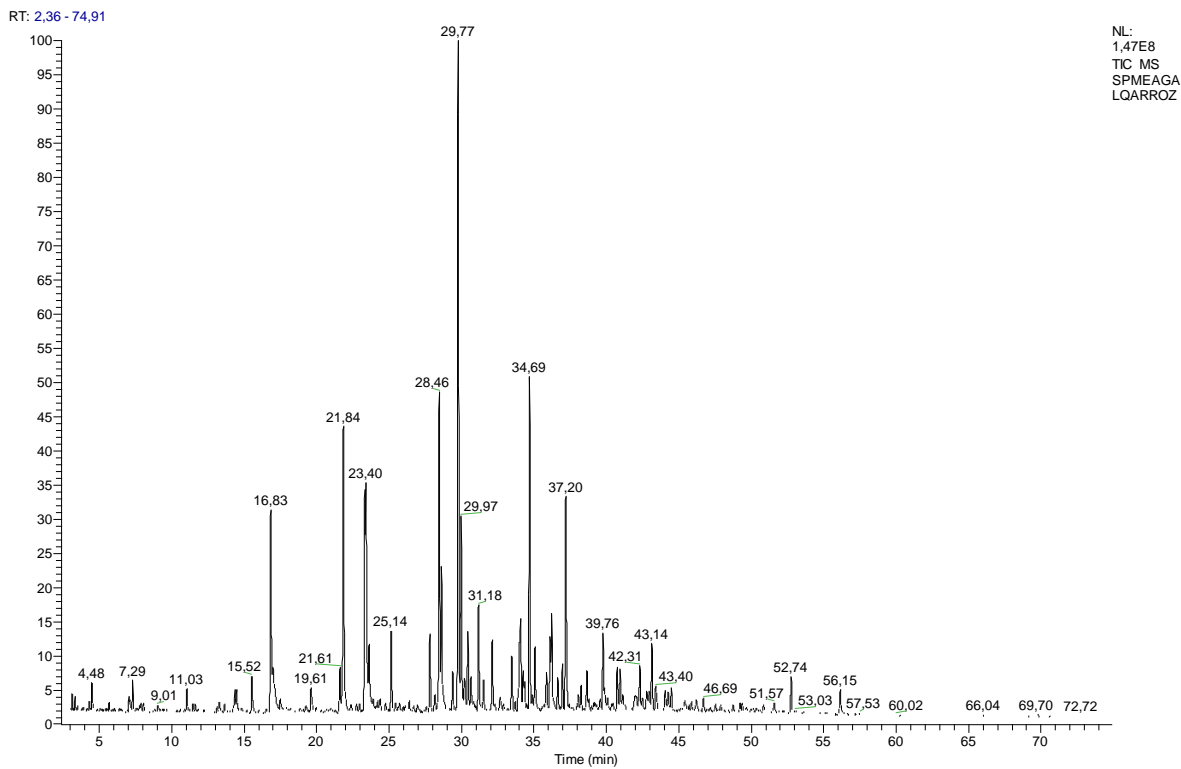
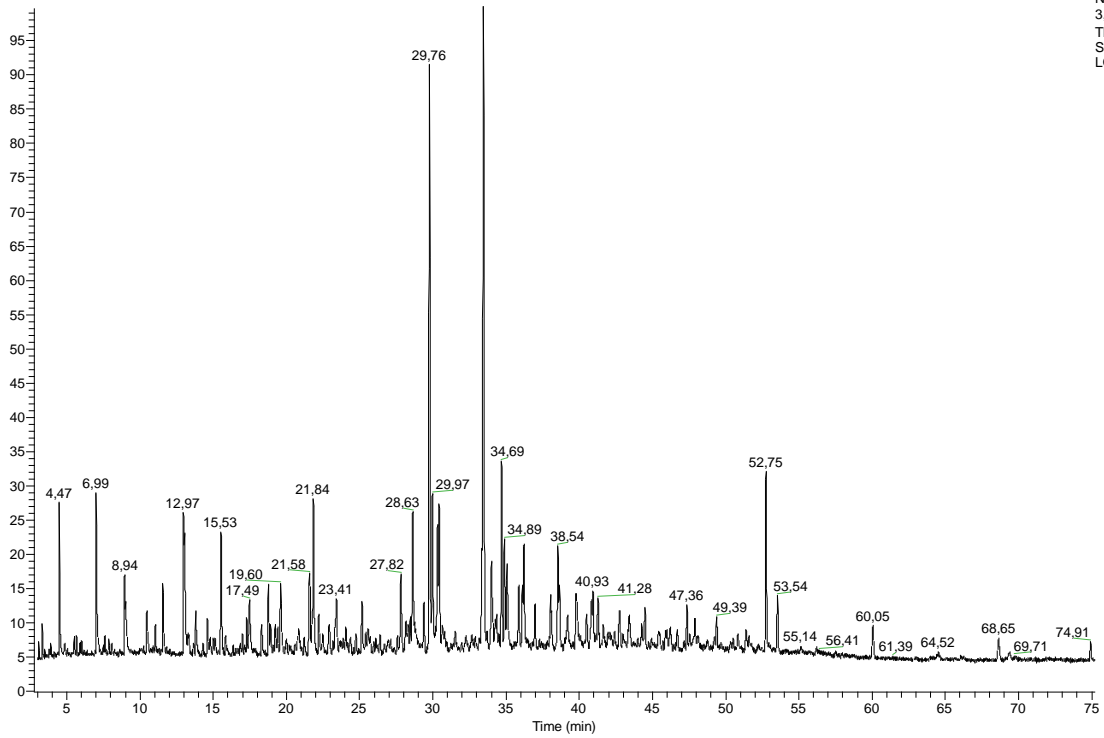


Figura 24. Cromatograma agua alquitranada de gasificación de arroz

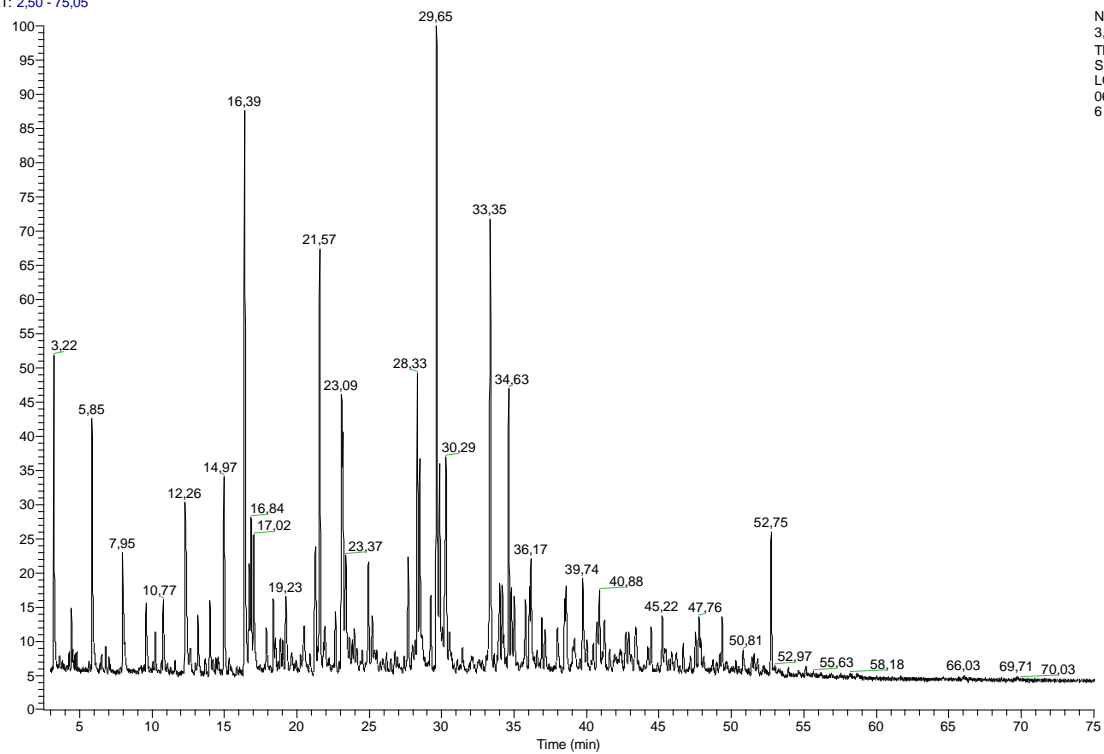
RT: 2.75 - 75.23



NL:
3,50E7
TIC MS
SPMEAGA
LOAJONJ

Figura 25. Cromatograma agua alquitranada de gasificación de ajonjolí

RT: 2.50 - 75.05



NL:
3,44E7
TIC MS
SPMEAGA
LQCOC_15
061717220
6

Figura 26. Cromatograma agua alquitranada de gasificación de coco

5.3. Tratamiento de Agua alquitranada con microalgas.

5.3.1. Prueba de supervivencia I:

El montaje de la primera prueba de supervivencia se muestra en la Figura 27. Montaje pruebas de supervivencia, la foto de la izquierda muestra los cultivos al inicio del experimento, la coloración era entre parda y verde debido a los cultivos de microalgas de los que se partió, presentaba un olor penetrante debido al agua alquitranada; por otro lado la foto de la derecha muestra los cultivos después de los 20 días del tratamiento con las microalgas, estas muestras mostraron cambio en el color y olor, se dejó una muestra de agua alquitranada a la concentración de la experimentación y a las mismas condiciones de luz y agitación, esta muestra no mostro cambios apreciables ni en color ni en olor. Los comportamientos descritos por las muestras analizadas se muestran en la Figura 28, se graficaron los comportamientos porcentuales en el tiempo para las especies de microalgas por cultivo.

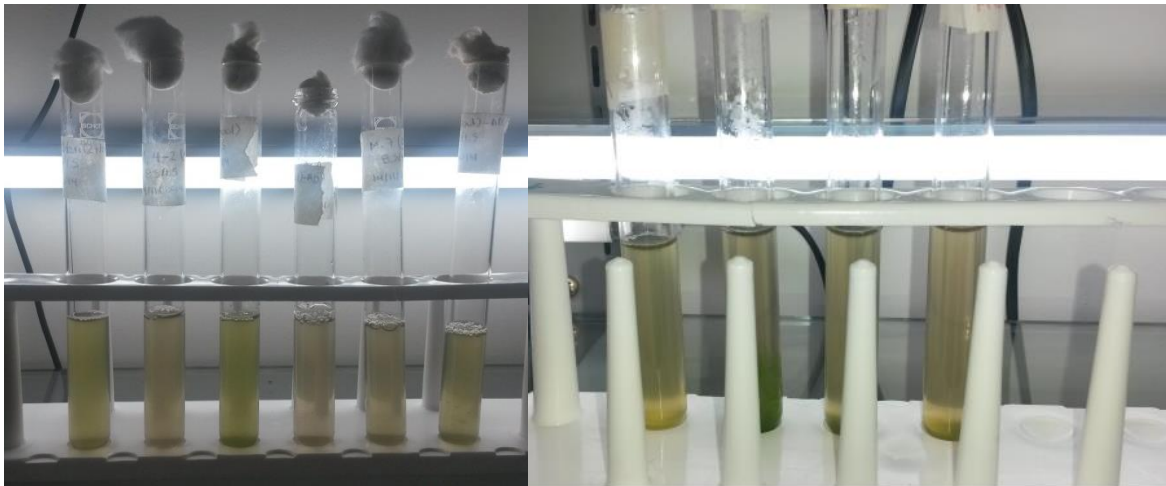
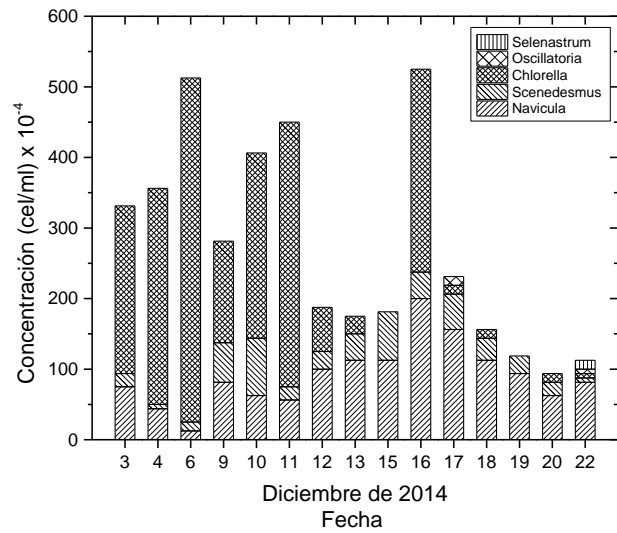
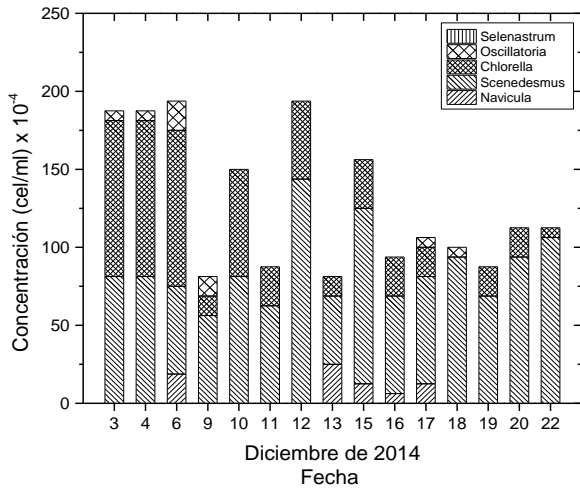
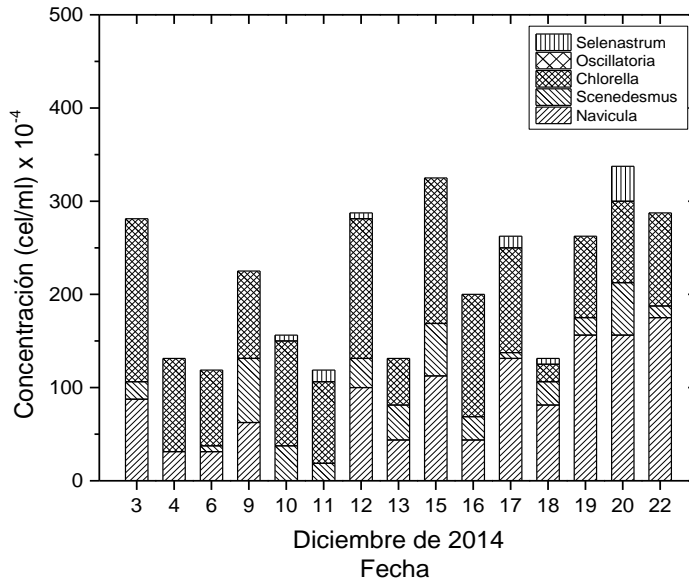


Figura 27. Montaje pruebas de supervivencia I



(a) 5A

(b) 7A



(c) 10A

Figura 28. Tendencias de crecimiento por especie y total para las muestras.

Análisis de tendencias: A continuación se realiza un análisis de los resultados obtenidos

Muestra 5A: la densidad poblacional inicial de las microalgas es de 1875000 cel/ml. Al finalizar el experimento, el conteo arrojó una densidad de 1125000 cel/ml, mostrando una reducción aproximada del 40%, sin embargo, para la especie *Scenedesmus*, aumentó su densidad inicial en 200000 células (población inicial 8012500 cel/ml).

Muestra 7A : La población decae de 3300000 cel/ml a 1125000 cel/ml, aproximadamente un 65 %, siendo la población de *Chorella* la más afectada, esta varía de 2300000 a 100000 cel/ml, por otra parte, la *Navicula* incrementa su población de 750000 a 850000 cel/ml.

Muestra 10 A: Esta muestra es la única que muestra un crecimiento poblacional en aproximadamente 100000 cel/ml, la población de *Navícula* se duplicó (875000 población inicial) y la de *Selenastrum* (62500 cel/ml de población inicial) se quintuplicó, por otra parte, la *Chorella* presenta el mayor decrecimiento ya que pasó de 180000 a 60000 cel/ml, mientras que la *Scenedesmus* paso de 1750000 a 750000 cel/ml.

Las poblaciones de microalgas que presentan un mejor comportamiento (aumento en la densidad poblacional) al ser expuestas a aguas contaminadas con alquitranes en las muestras analizadas fueron: 5A – *Scenedesmus sp*, 7A – *Navicula sp* y 10A – *Navicula sp* y *Selenastrum sp*.

Para el siguiente experimento se propone cambiar concentraciones de agua alquitranada en el cultivo y verificar las muestras del nuevo muestreo con el fin de determinar comportamiento de los nuevos de cuerpos de agua.

5.3.2. Prueba de supervivencia II

El montaje de la segunda prueba de supervivencia se muestra en la Figura 29; se muestran los cultivos al inicio del experimento, la coloración era parda y con un olor penetrante debido al agua alquitranada; en la Figura 30 se muestra el montaje después de los 17 días de tratamiento con las microalgas, estas muestras mostraron cambio en el color y olor. Los comportamientos descritos por las muestras analizadas se muestran desde la Figura 32 hasta la Figura 31, se graficaron los comportamientos en el tiempo para las especies por separado y el total de microalgas por cultivo.



Figura 29 Montaje Supervivencia II. Día 1.

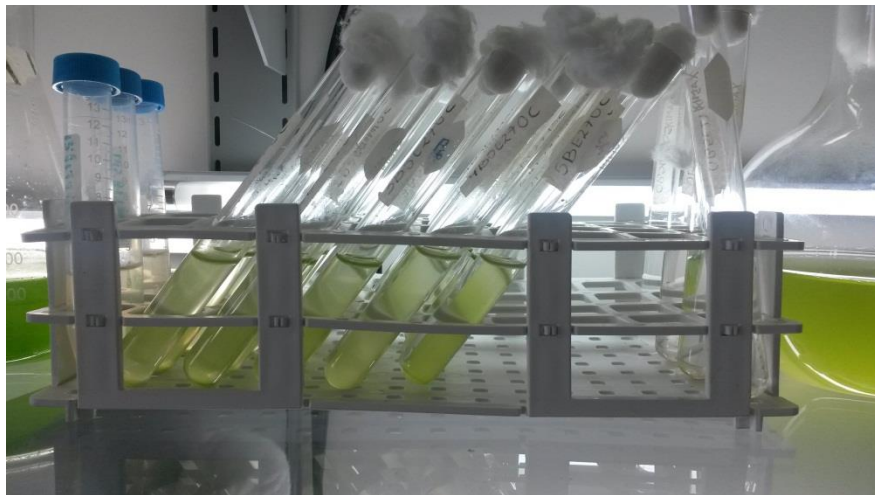


Figura 30. Montaje Supervivencia II. Día 17

5.4. Resultados y análisis

Estimación del crecimiento microalgal en medio alquitranado a diferentes concentraciones:

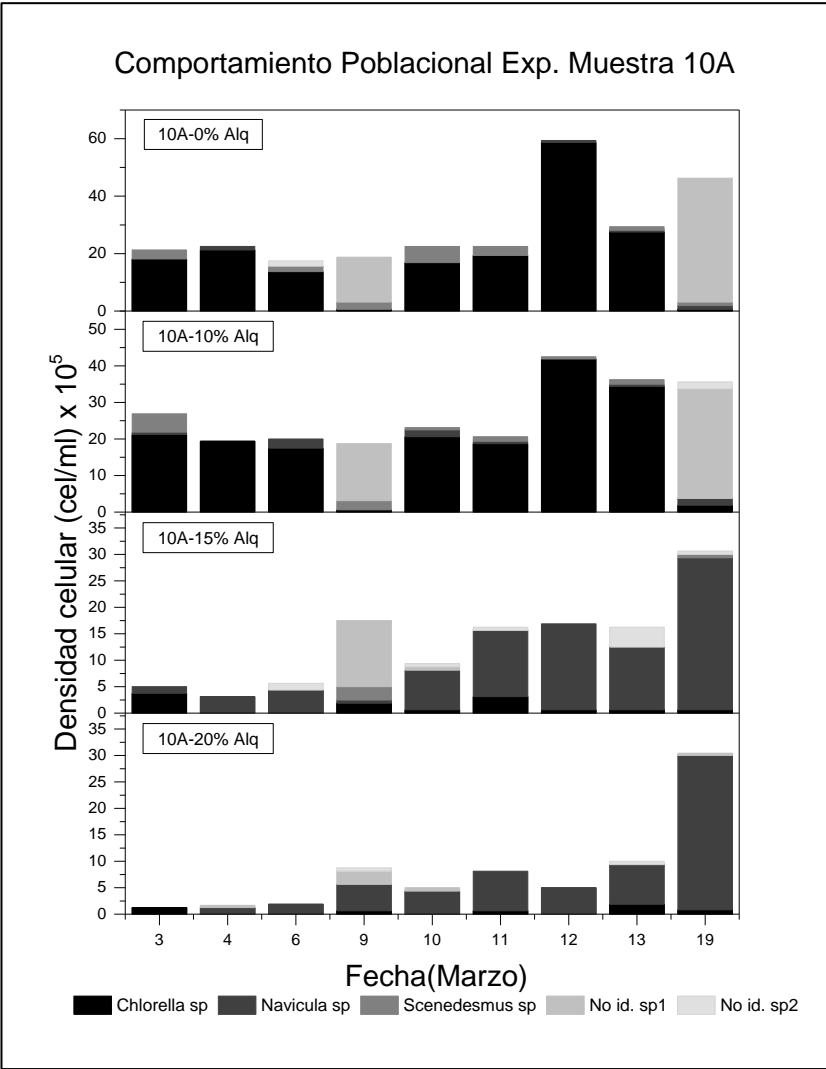


Figura 31. Distribución poblacional Muestra 10^a

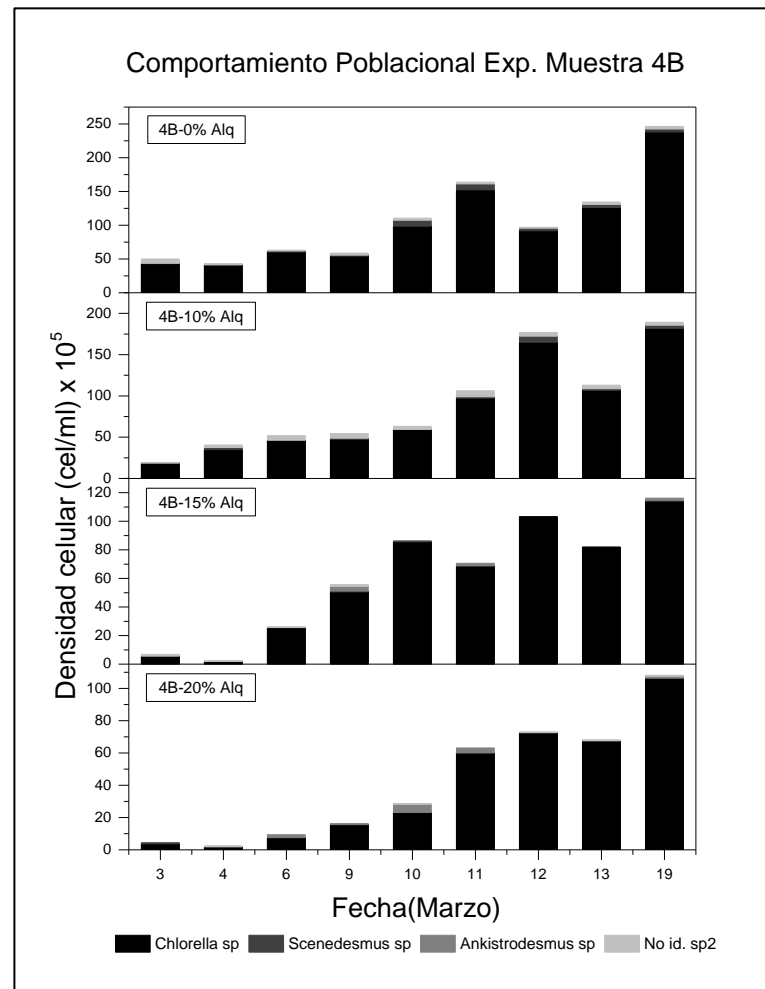
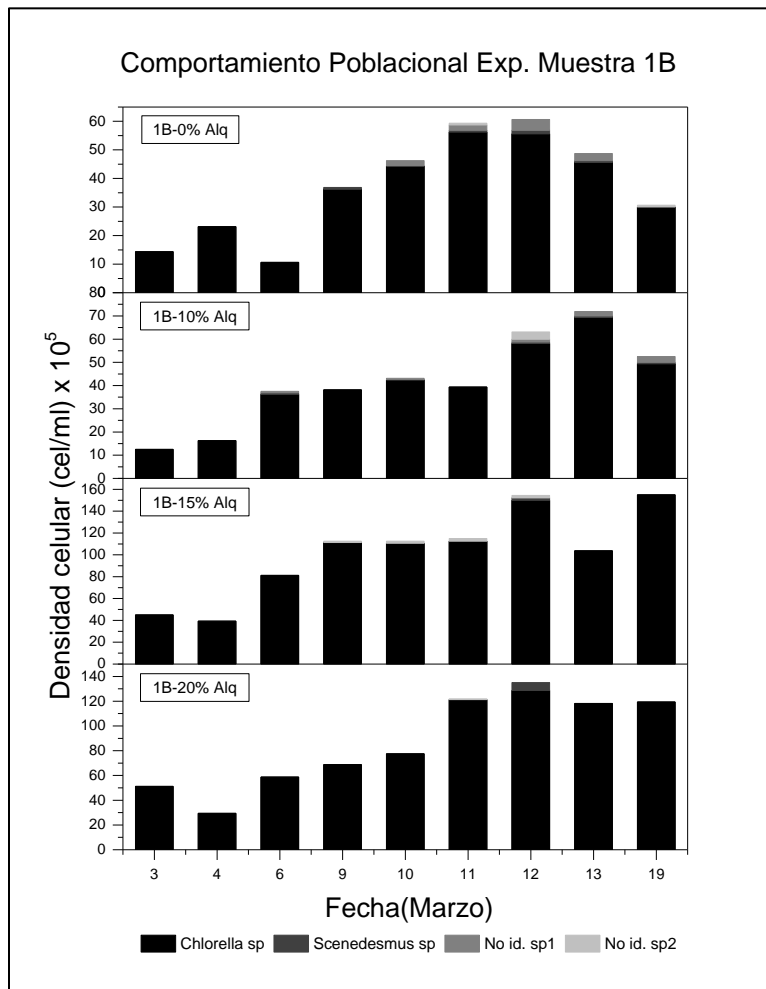


Figura 32. Distribución poblacional: Izquierda - Muestra 1B. Derecha - Muestra 4B

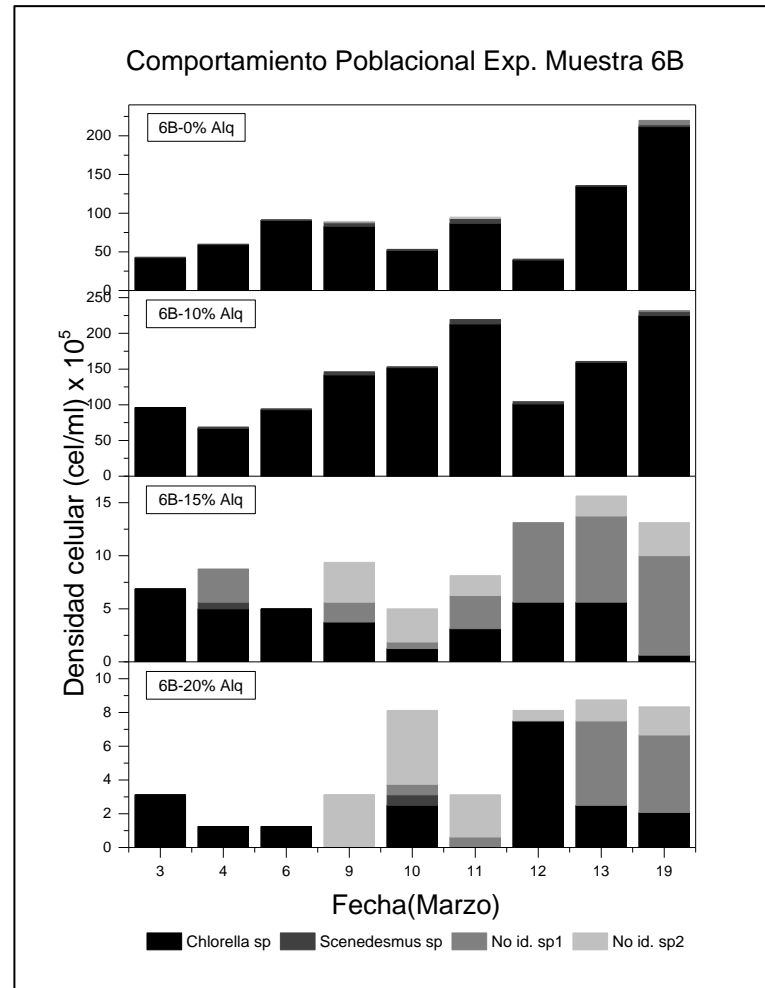
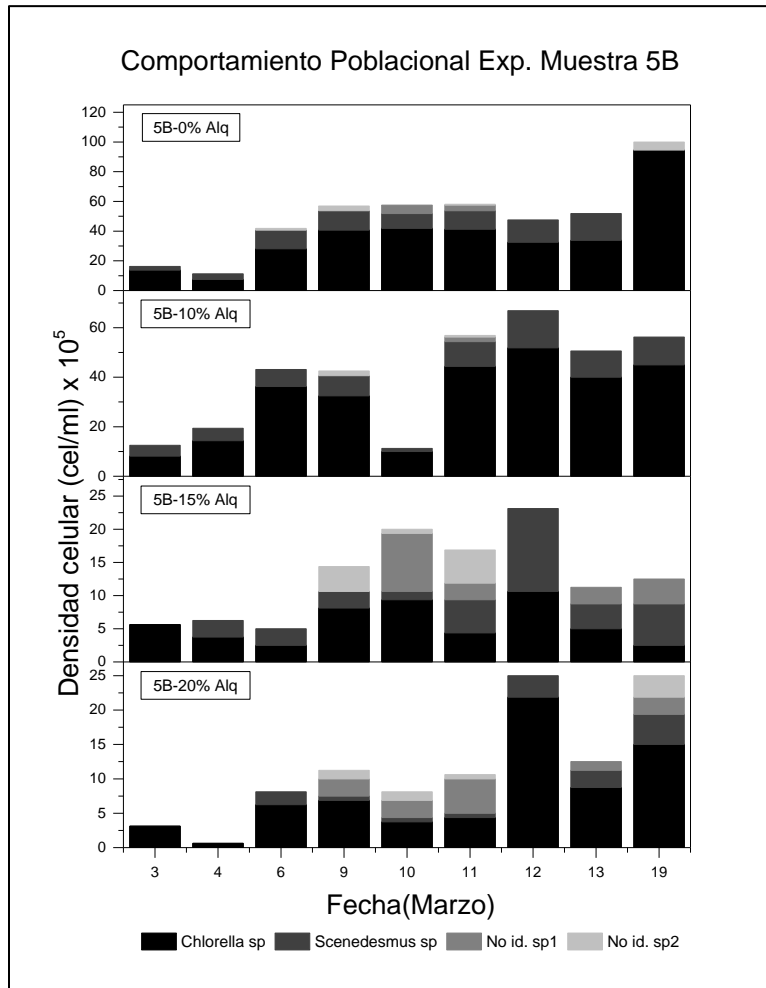


Figura 33. Distribución poblacional: Izquierda - Muestra 5B. Derecha - Muestra 6B

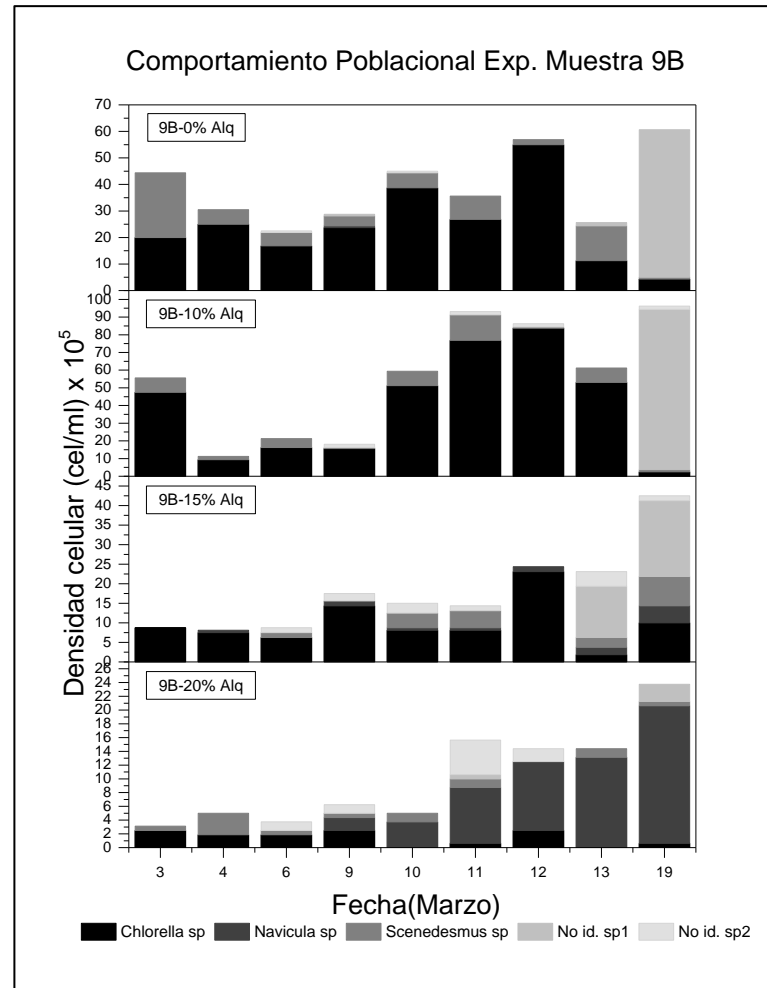
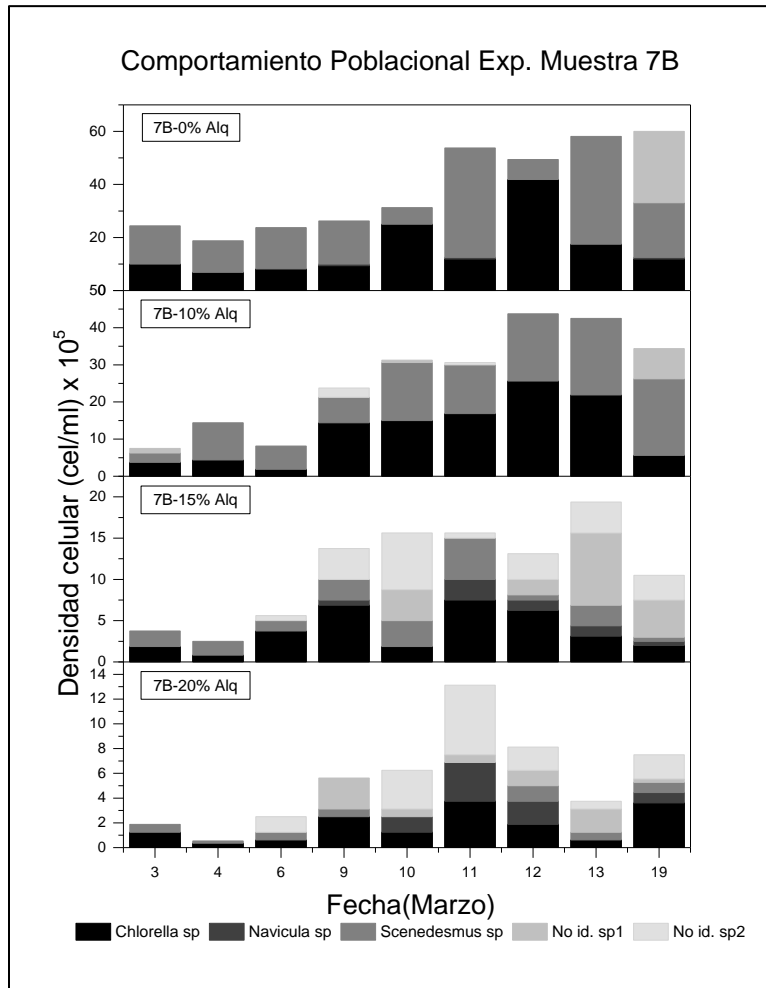


Figura 34. Distribución poblacional: Izquierda - Muestra 7B. Derecha - Muestra 9B

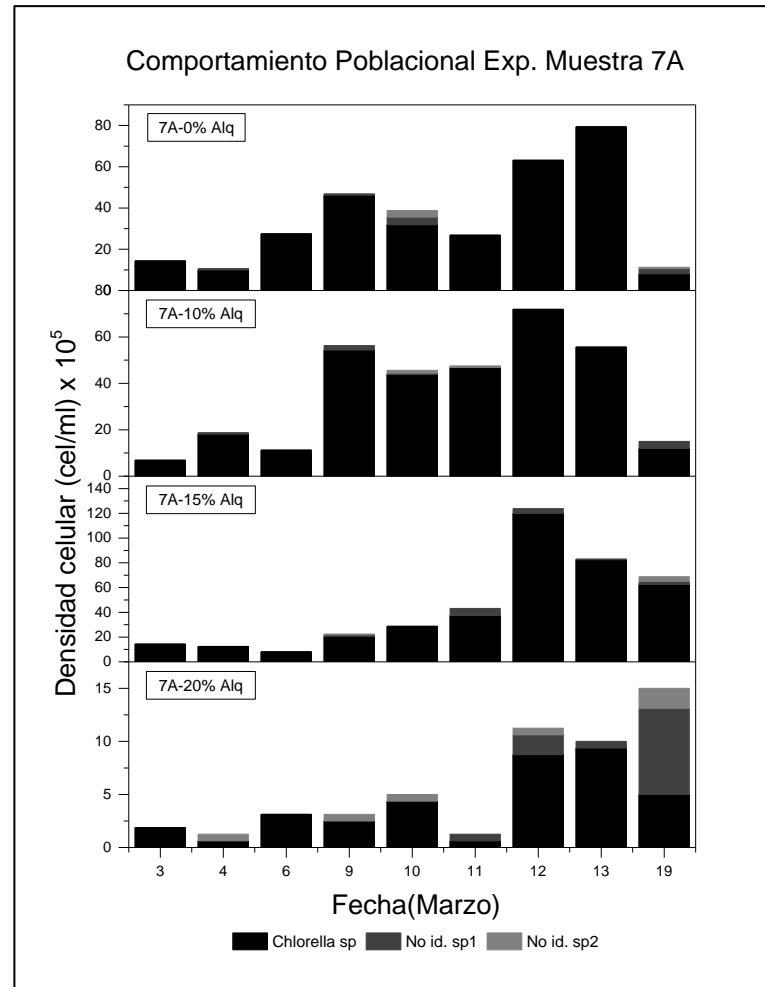
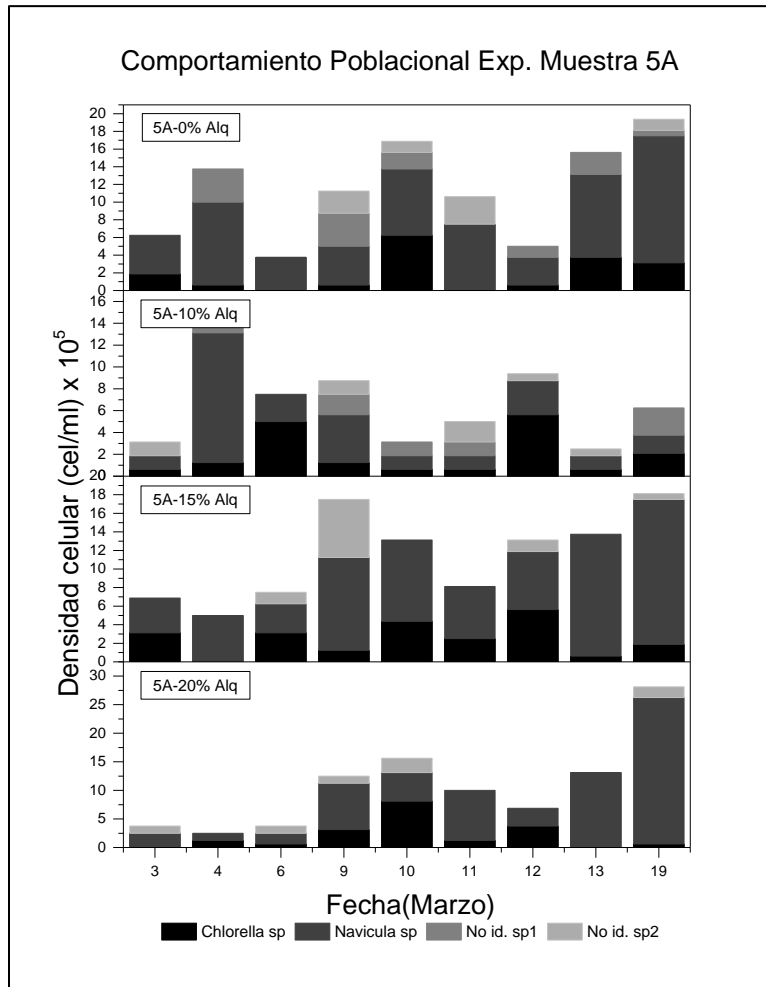


Figura 35. Distribución poblacional: Izquierda - Muestra 5A. Derecha - Muestra 7A

A partir de las gráficas obtenidas se puede realizar un análisis detallado de qué manera influye el contaminante en el crecimiento de las diferentes especies para cada cultivo, a continuación se realizan las observaciones para cada muestra.

Muestra 1B: Al someter la muestra a diferentes concentraciones de alquitranes se aprecia un incremento en la densidad poblacional del género **Chlorella** a lo largo de toda la experiencia, adicionalmente las muestras expuestas a concentraciones de agua alquitranada del 15% y 20% duplicaron en densidad de poblacional del género antes mencionado a la de 10% y en ausencia de agua alquitranada.

Muestra 4B: Se presenta incremento en la densidad poblacional de todas las muestras a lo largo de la experimentación siendo el género **Chlorella** el más favorecido, sin embargo, conforme se incrementa la concentración de agua alquitranada en las muestras se presenta una reducción en la densidad poblacional.

Muestra 5B: Las muestras que se encontraban en presencia de agua alquitranada presentaron un crecimiento menor en la totalidad de la población, así, densidad poblacional: 0%Alq>10%Alq>15%Alq>20%Alq. En concentraciones de 0%,10% y 20% de agua alquitranada el género que presentó mayor crecimiento fue **Chlorella**, la muestra cargada con una concentración del 15% presentó una reducción de la población de **Chlorella** e incremento de la población de **Scenedesmus**.

Muestra 6B: La muestra sometida a concentración de agua alquitranada del 10% presentó un crecimiento poblacional superior al de la muestra patrón (sin agua alquitranada), donde notoriamente prevalece la población de **Chlorella**, en las concentraciones del 15% y 20% se presenta un decaimiento de la población de **Chlorella** en simultáneo con un incremento de las poblaciones de **Scenedesmus**, **Chroococcus sp** y **No id. sp2**.

Muestra 7B: Todas las muestras analizadas presentaron un crecimiento hasta el décimo día (12 de marzo de 2015), posterior a esto se presentó reducción de poblaciones. La población de **Navicula** presentó un crecimiento mayoritario para la muestra con contenido de agua alquitranada del 10%. En las concentraciones del 15% y 20% las poblaciones que ostentaron un mayor crecimiento fueron las especies **Chroococcus sp** y **No id. sp2**. La

densidad poblacional decrece conforme se incrementa el contenido de agua alquitranada en las muestras.

Muestra 9B: La muestra que presentó el mayor crecimiento poblacional fue la sometida a concentración del 10% de agua alquitranada, seguida por las muestras en el orden: patrón sin agua alquitranada, 15 % Alquitran y 20 % Alquitran. Al finalizar el experimento la población de ***Chlorella*** estaba prácticamente extinguida en todas las muestras, la muestra que se expuso a una concentración del 20% de agua alquitranada presentó un crecimiento notable de las especies incluidas en el género ***Navícula***.

Muestra 5A: El ensayo que manejó concentración de agua alquitranada del 20 % presentó la mayor densidad de población, seguida por la de 15%. En todas las pruebas realizadas sobre esta muestra, la población de ***Navícula*** fue la que presentó un mayor crecimiento. Las densidades poblacionales fueron incrementando a lo largo del tiempo, excepto en la muestra que contenía una concentración de agua alquitranada del 10%.

Muestra 7A: Para un contenido del 15% de agua alquitranada la densidad poblacional registrada estuvo por encima (Aproximadamente el doble) de otros contenidos o del patrón. Todas las pruebas presentaron un incremento en la densidad poblacional a lo largo del tiempo. En todas las experiencias el género ***Chlorella*** fue quien presentó la mayor densidad poblacional.

Muestra 10A: Los ensayos realizados bajo una concentración del 0% y 10 % de agua alquitranada presentan como género mayoritario a ***Chlorella***; en las concentraciones del 15% y 20% quien representa el segmento mayoritario de población es la ***Navícula***. Incrementos en los valores de concentración de agua alquitranada generan una reducción en el crecimiento poblacional para las del primer muestreo, se evaluó el crecimiento de microalgas a una concentración definida de agua alquitranada medio de cultivo Para todos los cuerpos de agua del primer muestreo y los mejores del segundo muestreo a diferentes concentraciones de alquitran se realizó seguimiento de densidad celular por especie y se determinó el tiempo para entrar en la etapa de latencia de los cultivos.

Con el fin de determinar el efecto del cambio de concentración en el crecimiento global del cultivo sin importar la distribución de especies en el crecimiento del cultivo se generaron las

curvas de crecimiento total para cada nivel de concentración para todas las muestras (Figura 36 hasta Figura 40), a partir de estas se pueden concluir que la mayoría de muestras presentan mejores crecimientos celulares sin contaminante, aunque después de pasar del periodo de adaptación que para casi todas es similar la densidad celular se estabiliza en valores cercanos a 7. La concentración de contaminante donde presentan mejores comportamientos en cuanto a crecimiento es a 10% de alquitrán, por limitaciones en la disponibilidad de la técnica y el equipo de cromatografía solo se realizó el análisis después del tratamiento a la muestra que presentó los mejores crecimientos celulares, para el nivel de concentración de contaminante más alto 6B-20%, los resultados se muestran en la igura 41.

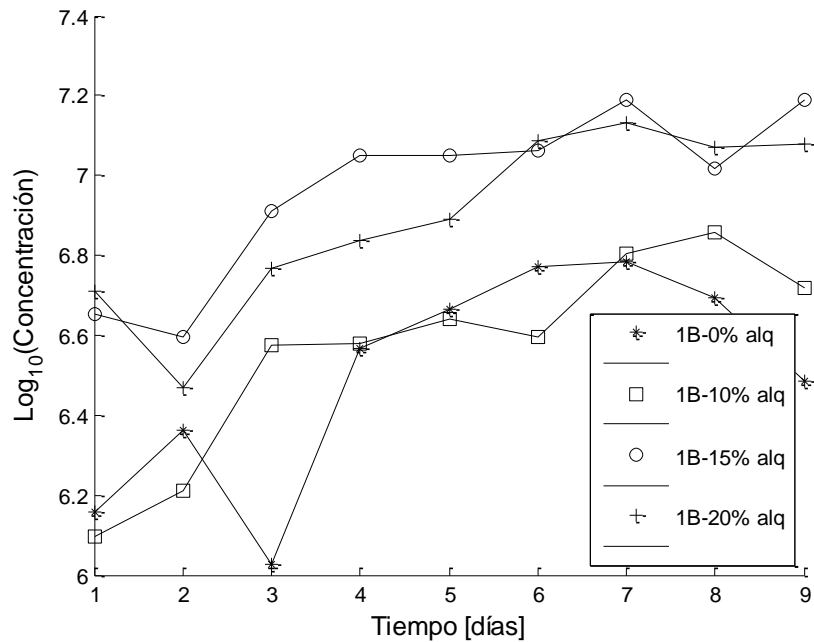


Figura 36. Curva de crecimiento muestra 1B

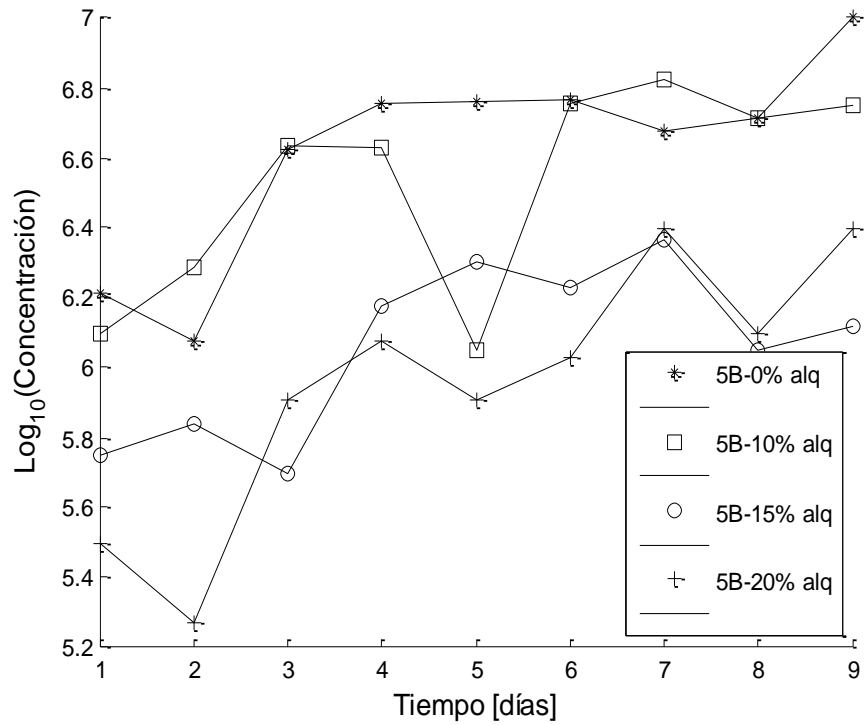
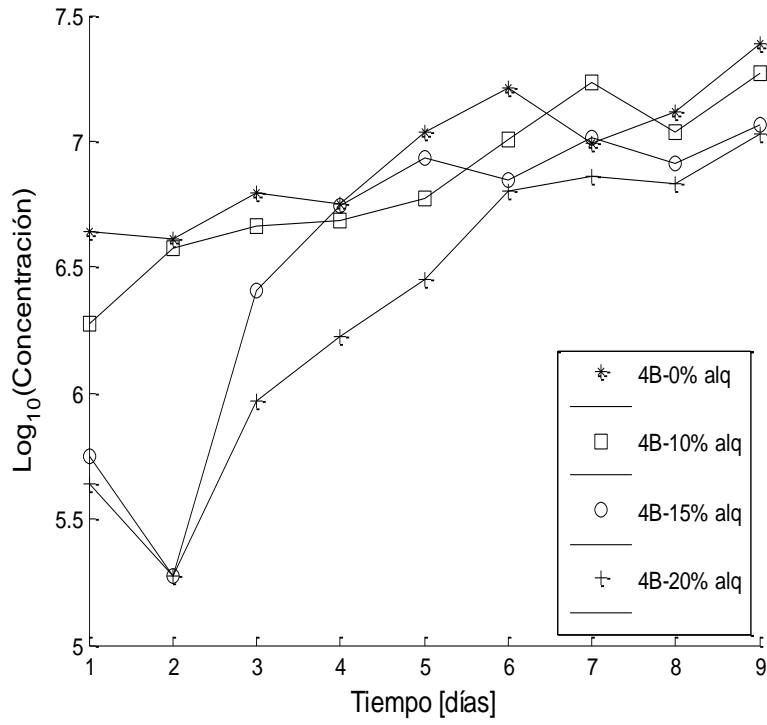


Figura 37. Curva de crecimiento: Izquierda muestra 4B - Derecha Muestra 5B.

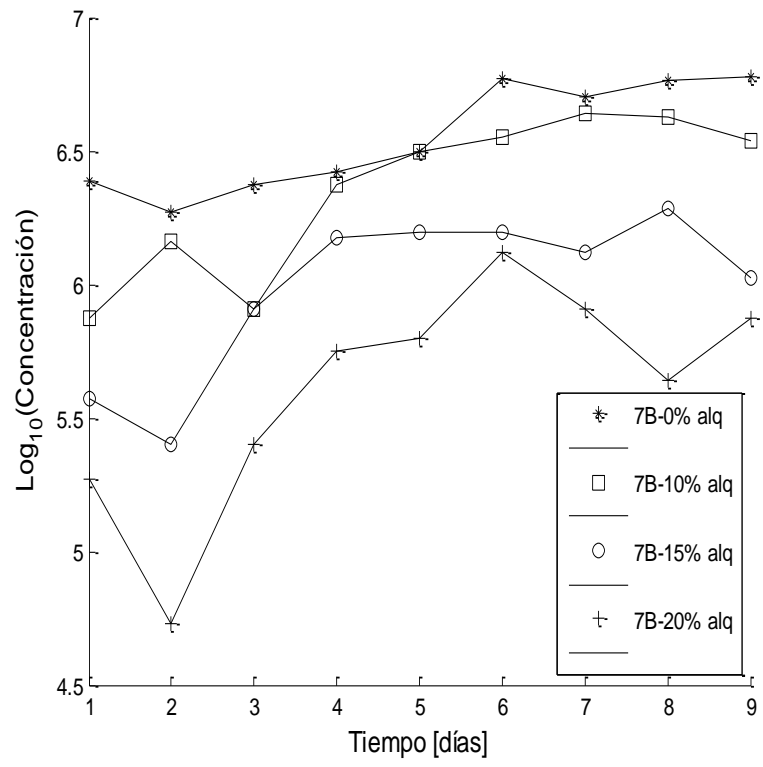
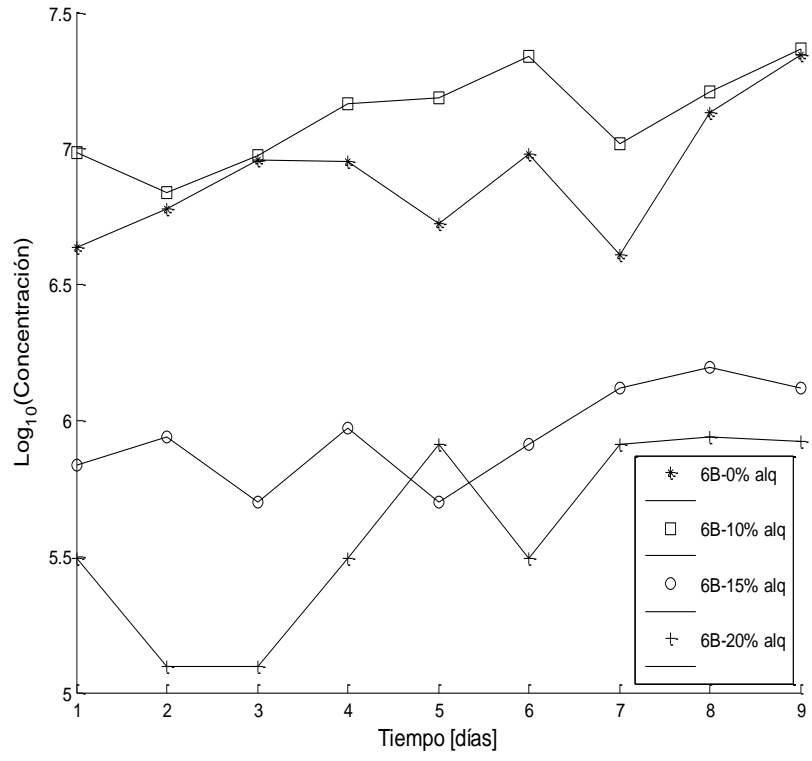


Figura 38. Curva de crecimiento: Izquierda muestra 6B - Derecha Muestra 7B.

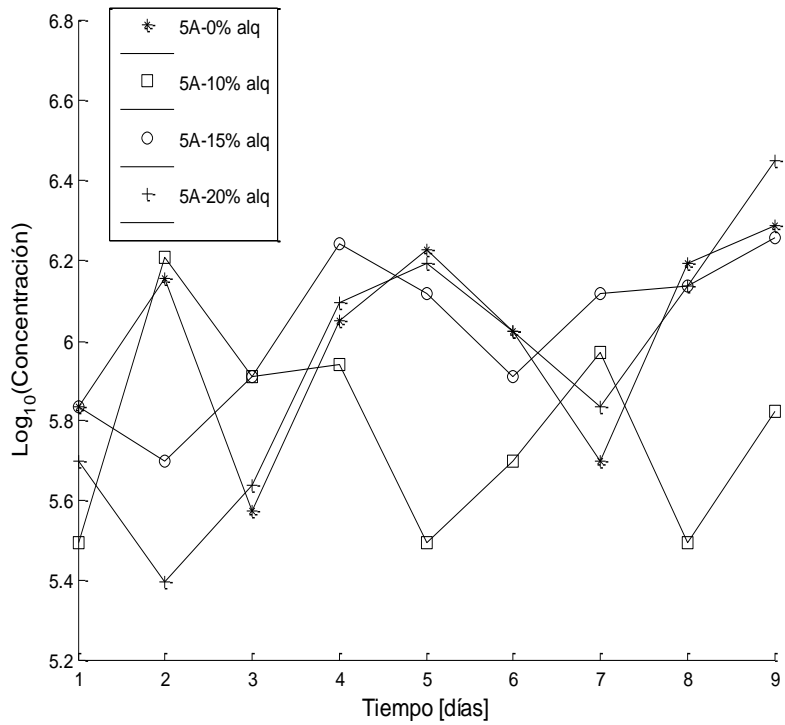
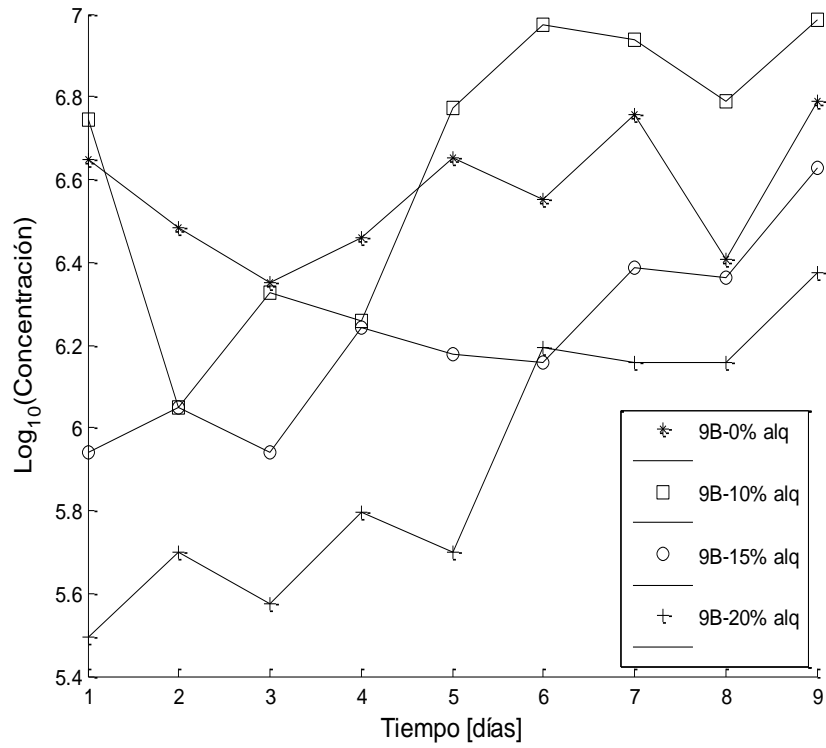


Figura 39. Curva de crecimiento: Izquierda muestra 9B - Derecha Muestra 5A.

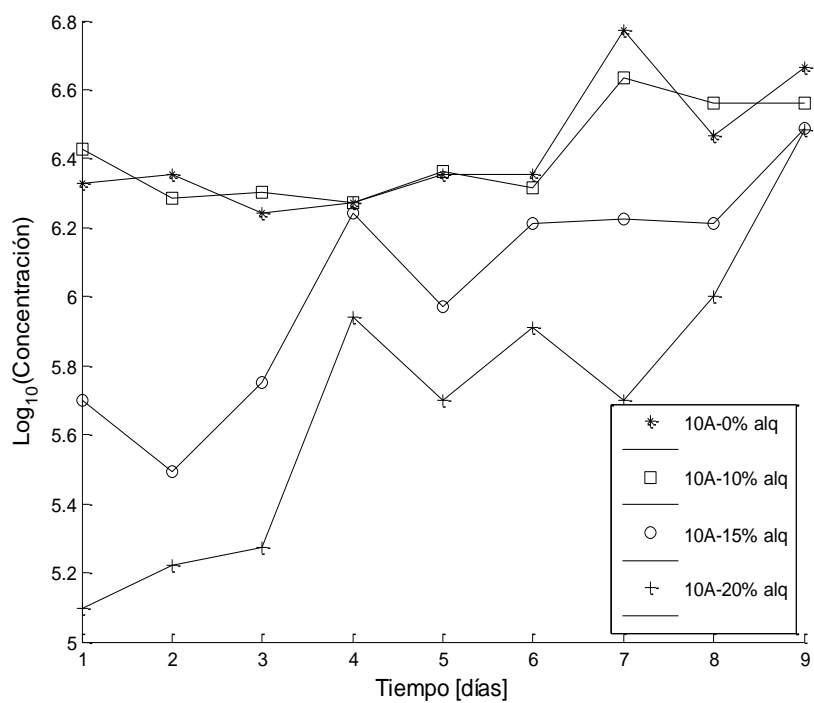
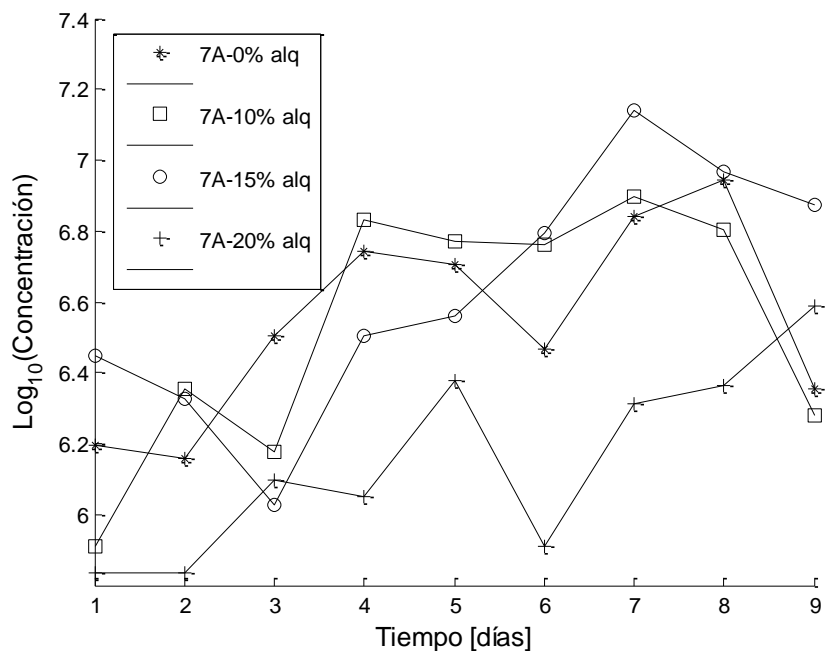


Figura 40. Curva de crecimiento: Izquierda muestra 7A - Derecha Muestra 10A .

De los análisis cromatográficos realizados, solo se puede observar de manera cualitativa una reducción, esto debido a que las condiciones iniciales de la muestra tratada no se analizó en el momento, los cromatogramas tomados son de muestras preparadas después

y se midieron utilizando las dos fibras, por otro lado a la muestra tratada solo fue evaluada por un método de extracción, con lo cual no se puede confirmar que aparezcan todas las sustancias presentes en la muestra original antes de la extracción, sin embargo hay disminución del contaminante por efecto de las microalgas.

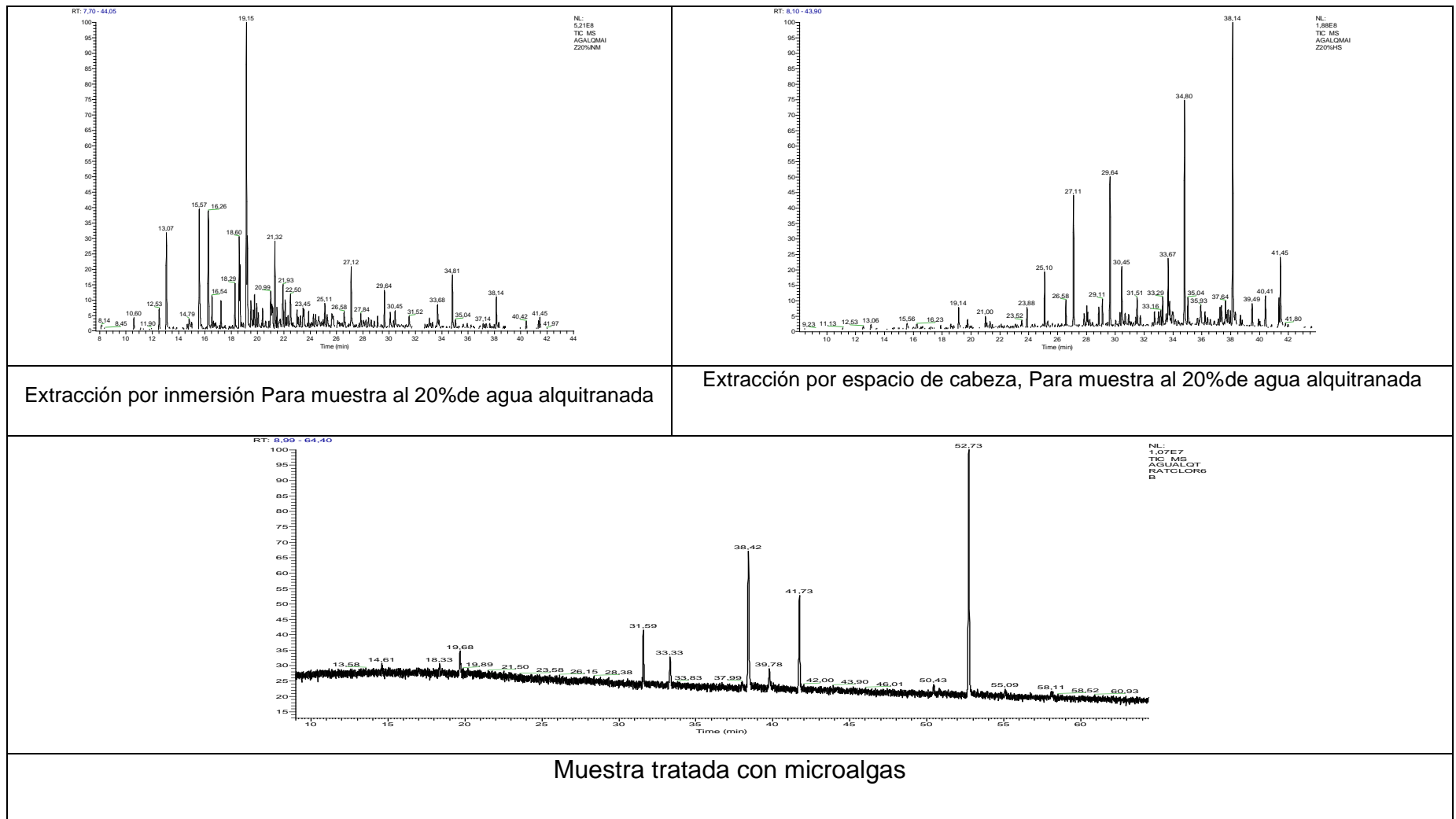


Figura 41. Comparación de Cromatogramas agua alquitranada- Maiz al 20% y muestra 6B de agua alquitranada al 20% después del tratamiento

5.4.1. Prueba de supervivencia III:

El montaje y seguimiento de la tercera prueba de supervivencia se muestra en la Figura 42; al comienzo del experimento, la coloración era parda y con un olor penetrante debido al agua alquitranada; se pueden observar los cambios de coloración de las muestras, adicionalmente las muestra que no tenía contaminante, la primera de izquierda a derecha y la quinta de la primera foto de la figura 41, después de los 17 días de tratamiento empezaron a tener coloración diferente a verde, tornándose parda, esta coloración es característica cuando los cultivos están en etapa de muerte, las células se decantan, se asume que fue por reducción en la cantidad de nutrientes. Por otro lado se puede observar que las muestras con contaminante mantienen su crecimiento durante un mes después sin necesidad de adiciones de medio de cultivo, aumentando su densidad celular, como lo evidencia su coloración verde intensa, en especial para la muestra con mayor concentración de contaminante (35%). En la Figura 32, se muestra el seguimiento de la primera semana para estas dos muestras y sus niveles de contaminante, se observa que después del tercer día el cultivo tiene un crecimiento acelerado, y la diferencia de crecimiento entre las muestras y sus niveles de contaminante se mantiene, sobre todo en la muestra 4B, los periodos de adaptación son similares para todos los niveles, por otro lado para la muestra 8B, los comportamientos de los cultivos después del periodo de adaptación son favorables para las muestras contaminadas. Al final de esta prueba de supervivencia se obtuvo microalgas adaptadas del cuerpo 4B en tamaño, proporción de especies (95% *Chorella*- 5% *Scenedesmus*) y aspecto cambiaron un poco en comparación con la muestra original sin la acción de alquitran, se puede observar en la Figura 44. Después de la centrifugación, el sobrenadante fue estudiado por espectrofotometría y cromatografía, análisis de los comportamientos descritos por las pruebas se refieren a continuación.

Figura 42. Montaje y seguimiento prueba de supervivencia III

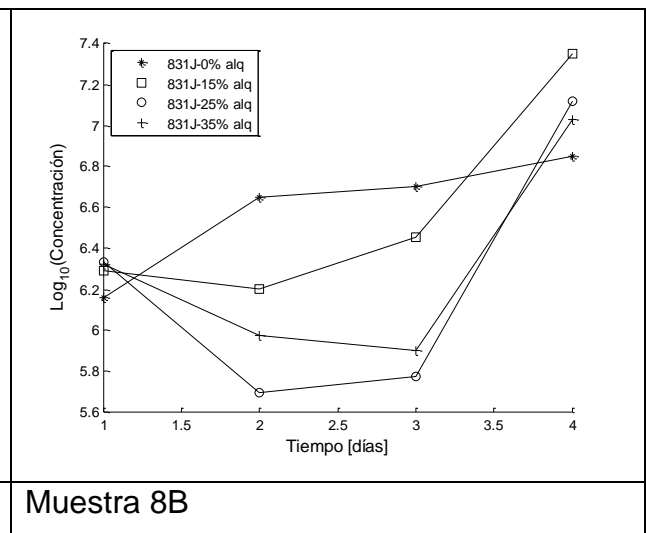
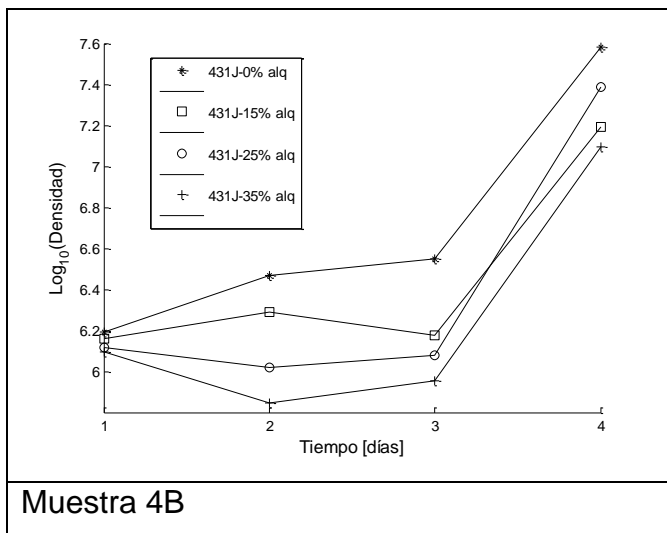
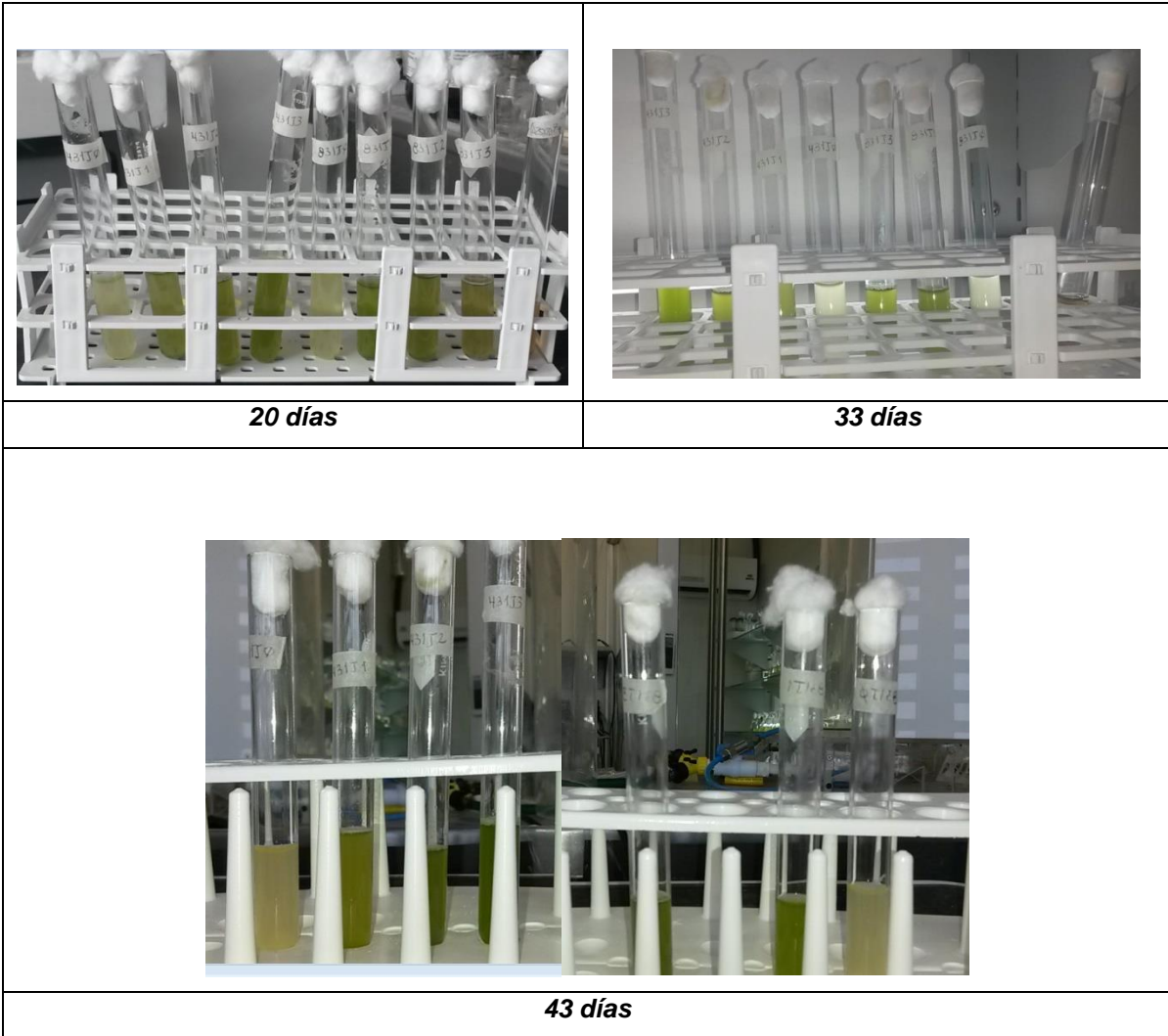


Figura 43. Curvas de crecimiento prueba de supervivencia III

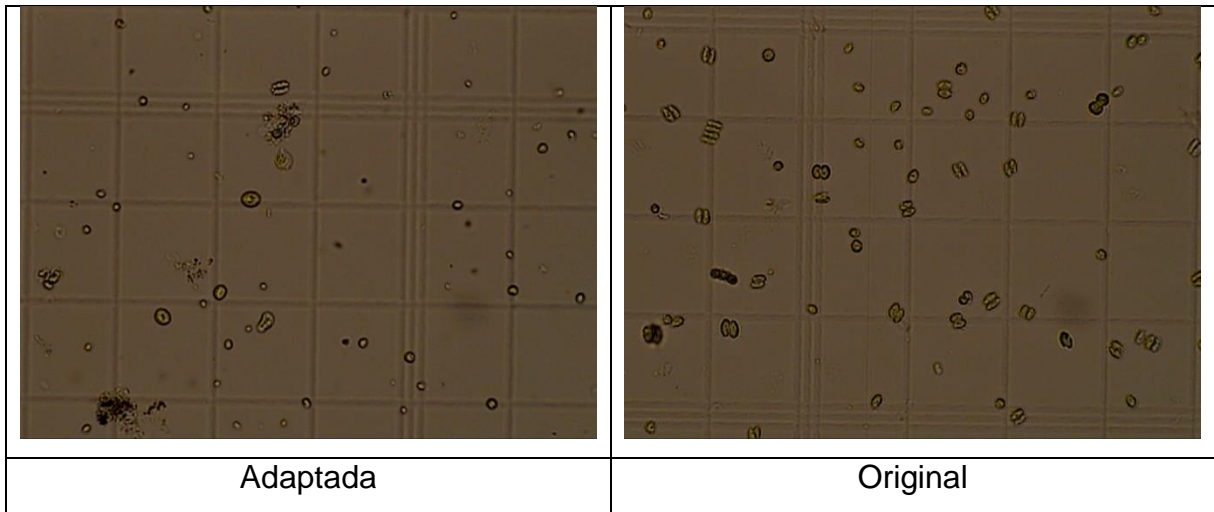


Figura 44. microalgas muestra 4B antes y después del proceso de adaptación

Las muestras pasadas por espectrofotometría siguen el comportamiento descrito en las Figura 45, Figura 46 y Figura 47, inicialmente se pasaron soluciones solas de alquitran a diferentes concentraciones así como de medio de cultivo microalga con una densidad celular similar a la de las muestras tratadas. También una solución preparada como solución inicial en el tiempo cero para tener referentes de los comportamientos base (Figura 45), el efecto de las microalgas en el corrimiento del pico de los alquitranes es perceptible, por el contrario el de los alquitranes para el pico de las microalgas no presenta tanta desviación, era de esperarse este comportamiento porque al realizarle el barrido a la solución de medio microalgas sin contaminante también aparece un pico en la longitud de onda de los alquitranes. En cuanto a las muestras, en la 8B al parecer, después del tratamiento producen sustancias intermedias por la acción de las microalgas (Figura 46), esto se puede observar en las tendencias de las muestras obtenidas, el inconveniente proviene de la cantidad de sustancias para cada grupo de componentes del cultivo, Agua alquitranada (más de 30 compuestos), medio de cultivo con microalgas (varía el número y la composición por especie) y el grupo de sustancias producidas (no se sabe ni la cantidad ni los grupos funcionales); se presentan al menos 3 longitudes de onda que describen máximos de absorbancia pero a interacción de las mezclas de los componentes de los cultivos deja mucha incertidumbre en la determinación cuantitativa de la remoción de contaminantes en cultivos de microalgas

por espectrofotometría. En cuanto a lo observado para la muestra cuatro (Figura 47Figura 47), no es clara la producción de sustancias intermedias y de las cantidades de contaminantes alquitranes no se puede determinar mucho cuantitativamente por la interferencia, pero es claro que al pasar la muestra por centrifugación el cambio es notorio en la tendencia donde se espera que ni las microalgas ni lo que estas tengan almacenado causa un efecto, se podría pensar que hacen remoción y acumulación, pero solo pruebas más específicas podrían confirmar esta tesis.

De los análisis cromatográficos realizados, solo se puede observar de manera cualitativa una reducción para el tratamiento con la muestra 4B Figura 49, y posible producción de compuestos intermedios para la muestra tratada con las microalgas del cuerpo 8B, como lo muestra la Figura 48. Solo se puede hacer observaciones cualitativas esto debido a que las condiciones iniciales de la muestra tratada no se analizaron en el momento, los cromatogramas tomados son de muestras preparadas después y se midieron utilizando las dos fibras, para dos concentraciones (20 y 50% de alquitran), que no es la misma de este experimento el cual fue 30% de alquitran. Por otro lado a la muestra tratada solo fue evaluada por un método de extracción, con lo cual no se puede confirmar que aparezcan todas las sustancias presentes en la muestra original antes de la extracción, sin embargo al parecer hay disminución del contaminante por efecto de las microalgas.

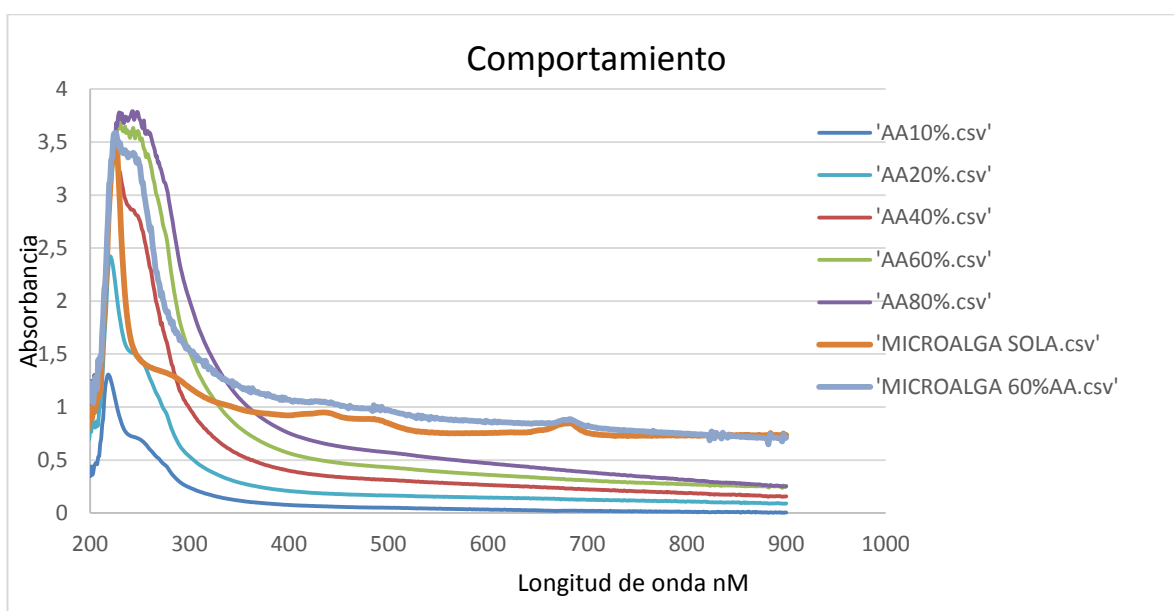


Figura 45. Comportamiento en el rango electromagnético para soluciones sin tratamiento de microalgas

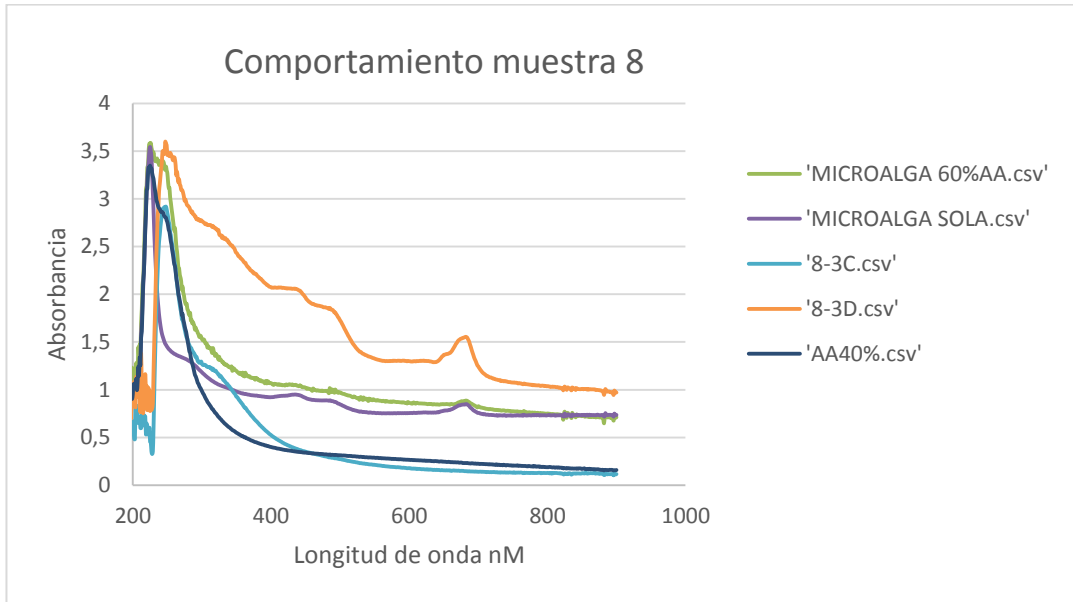


Figura 46. Comportamiento en el rango electromagnético para soluciones resultantes de tratamiento de microalgas Muestra 8

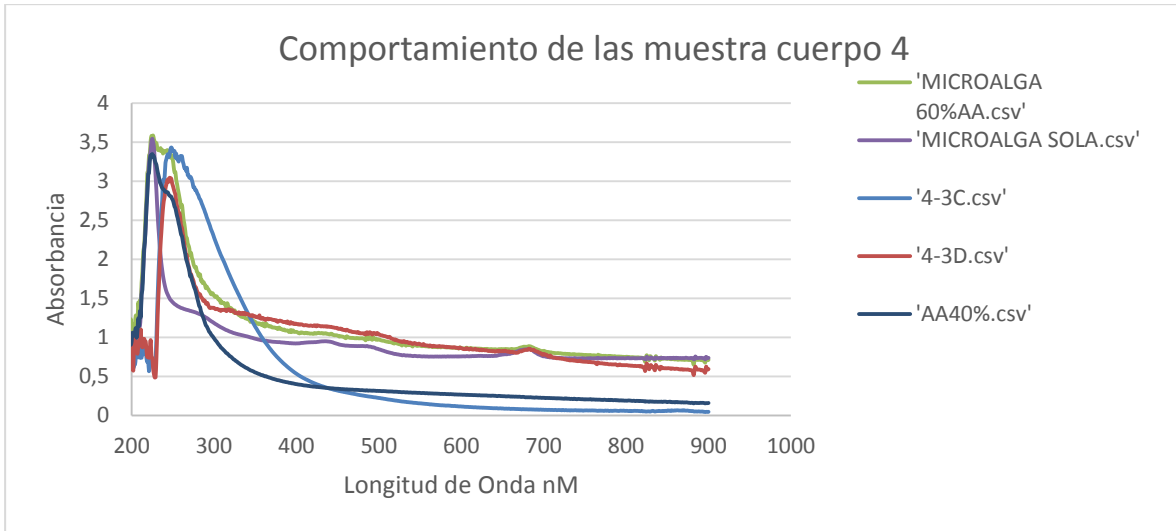


Figura 47. Comportamiento en el rango electromagnético para soluciones resultantes de tratamiento de microalgas Muestra 4

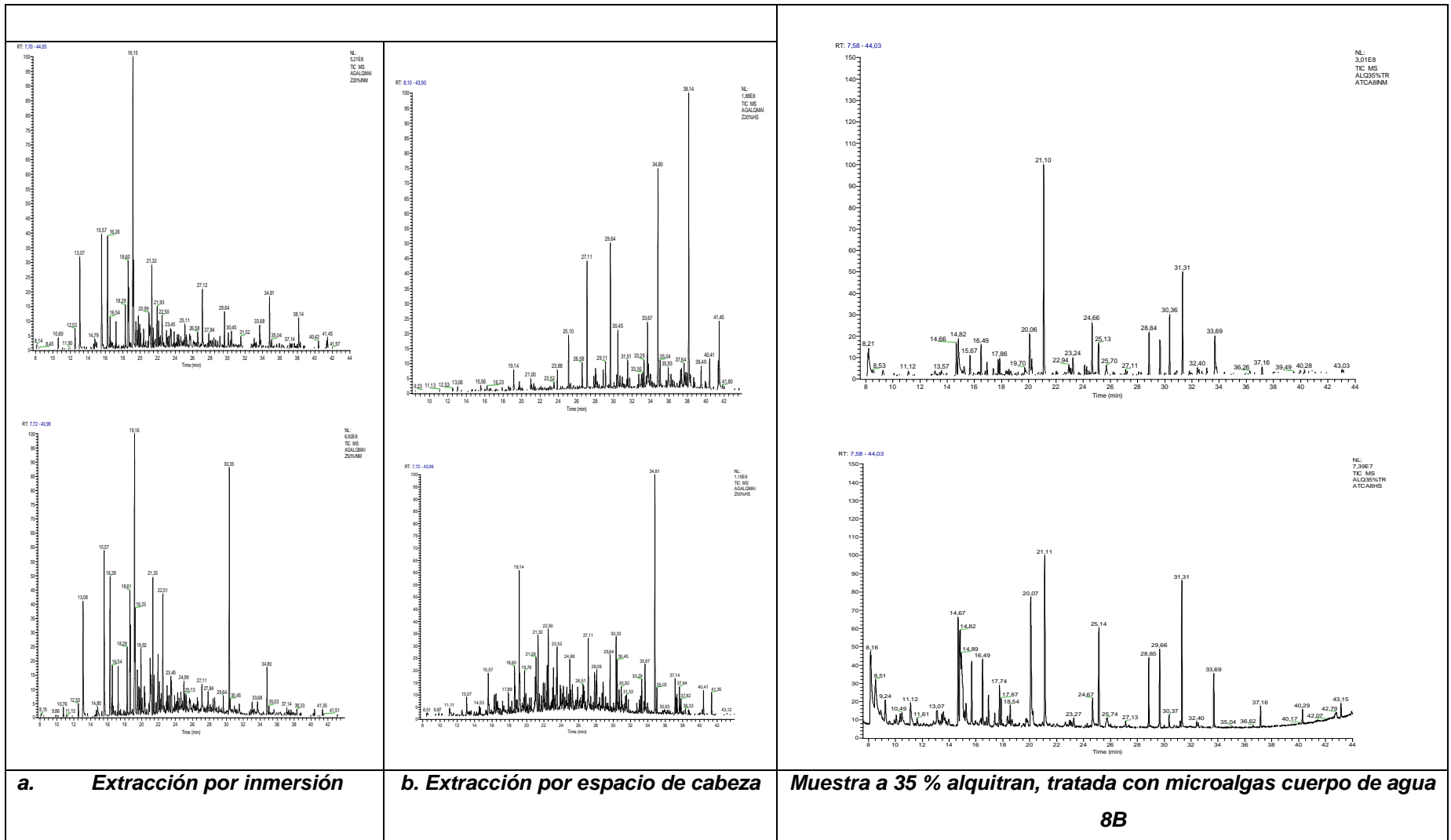


Figura 48 Comportamiento de cromatogramas para soluciones resultantes de tratamiento de microalgas Muestra 8

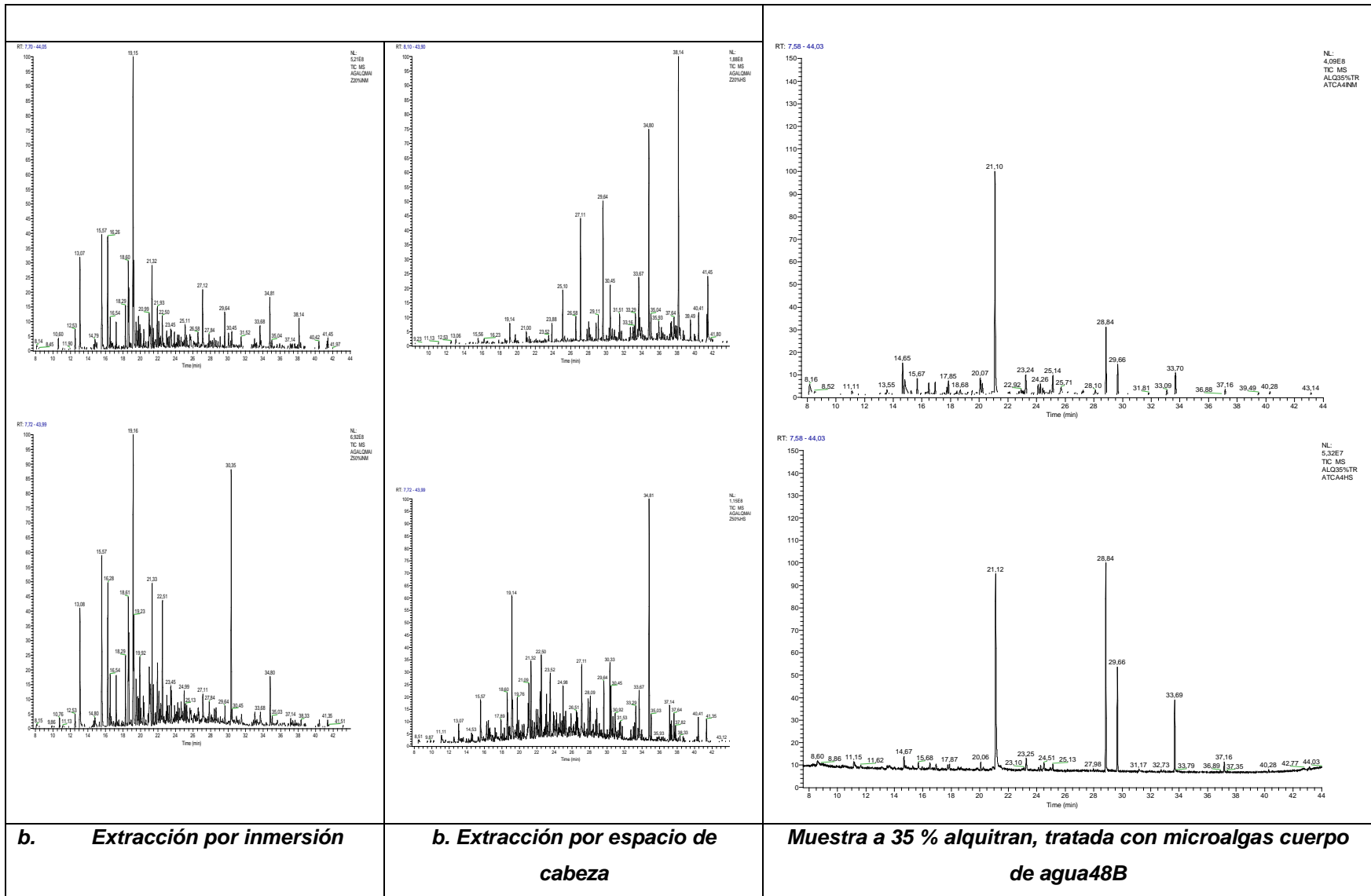


Figura 49. Comportamiento en el rango electromagnético para soluciones resultantes de tratamiento de microalgas Muestra 4

5.4.2. Prueba de supervivencia IV:

El montaje de la cuarta prueba de supervivencia se muestra en la Figura 50; se muestran los cultivos al inicio del experimento, la coloración era parda y con un olor penetrante debido al agua alquitranada, ya que eran las muestras más concentradas; se controló el cultivo durante un mes y las condiciones de color y olor no se modificaron sustancialmente en la Figura 30 se muestra la de crecimiento celular, la cual es bastante oscilatoria, con lo cual se puede concluir, que no pasaron de la etapa de adaptación, posiblemente la reducción en la cantidad de macronutrientes provenientes del medio de cultivo fue crítica y limitó su crecimiento, adicionalmente se muestra en la tabla 23 un registro fotográfico de todas las muestras a través del microscopio, del primer y último día de experimentación, aunque no creció mucho el cultivo, los cambios morfológicos en las células no es tan marcado.

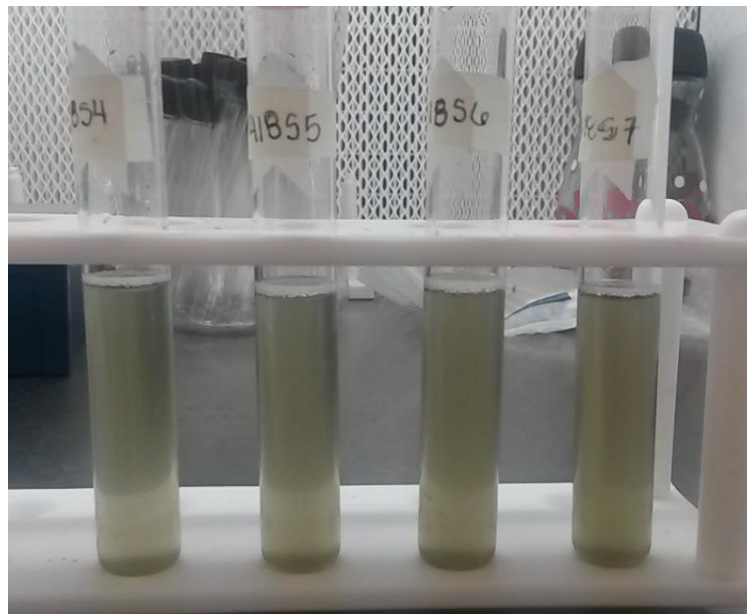
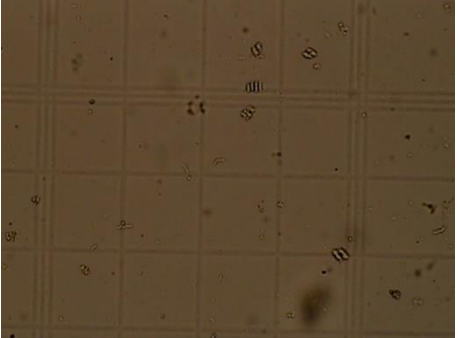

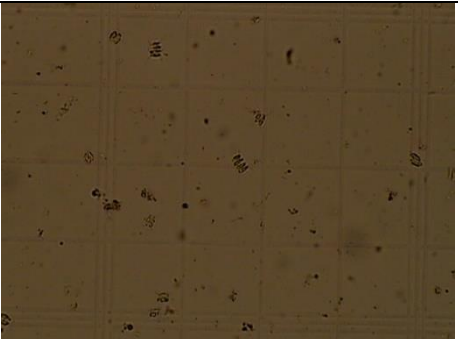

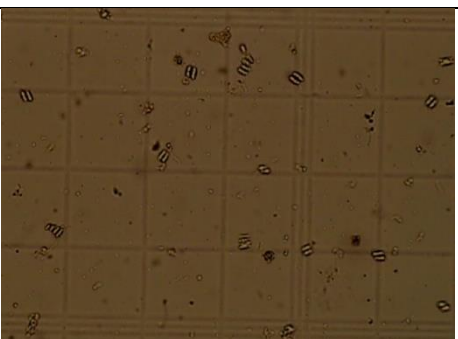
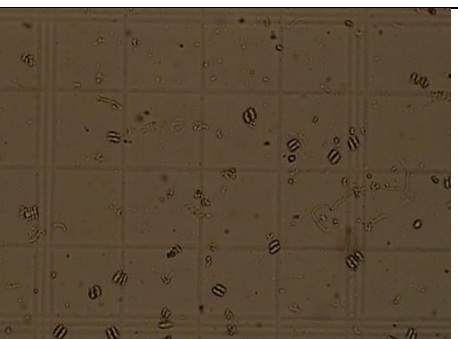
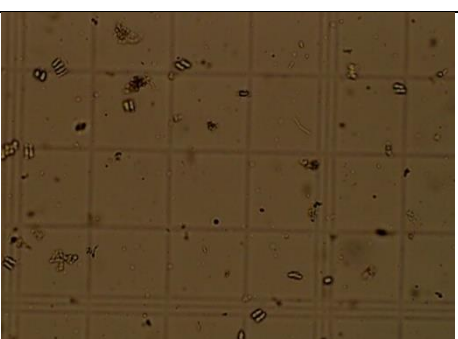
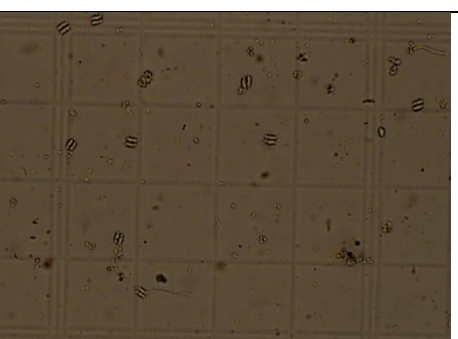


Figura 50. Montaje prueba de supervivencia 4 -

Tabla 27. Registro fotográfico en microscopio de cada muestra, primer día-último día

	
(a) Inicio 418S4	(b) Final
	
(a) Inicio 418S5	(a) Final
	
(a) Inicio 418S6	(a) Final
	
(a) Inicio 418S7	(a) Final

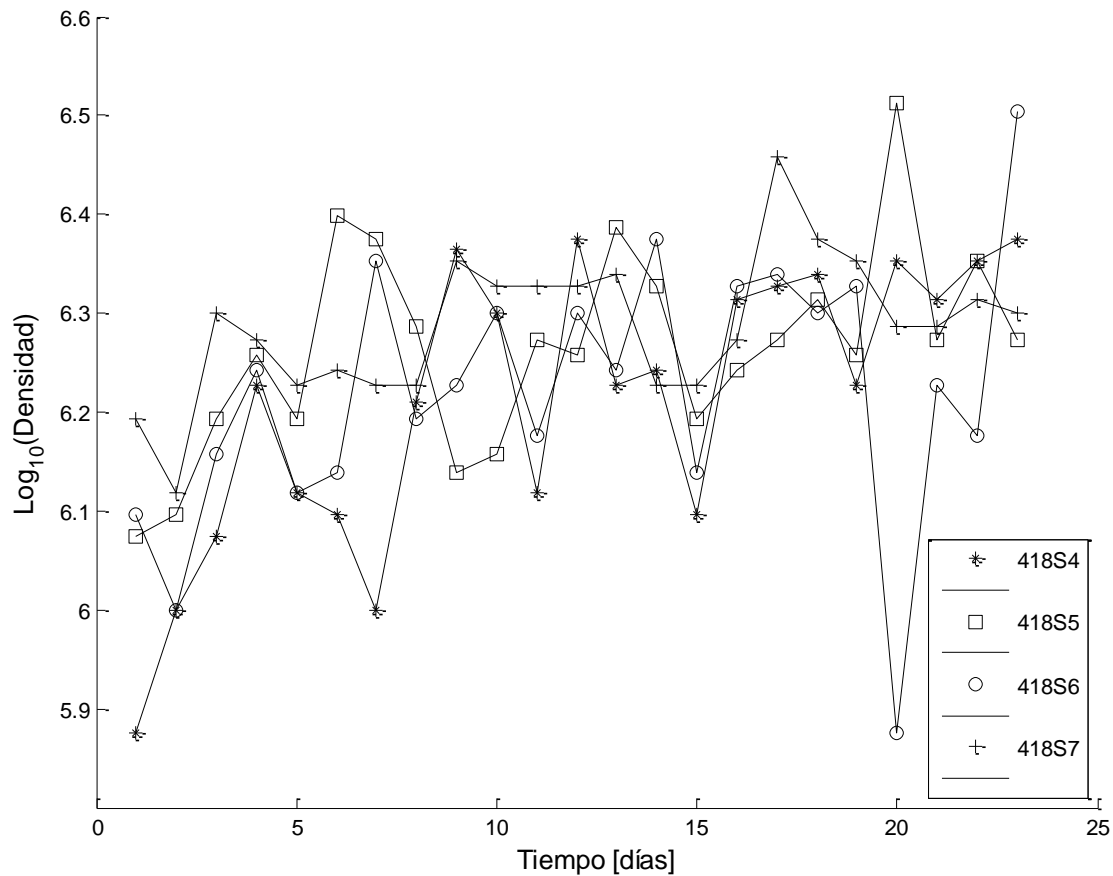


Figura 51. Curva de crecimiento prueba de supervivencia 4 -

5.4.3. Diseño experimental factorial :

A partir de los resultados obtenidos en las anteriores pruebas de supervivencia se plantearon las variables a estudiar en el experimento final, Se tomó la concentración promedio obtenida para los 3 representantes escogidos para realizar el modelo de componentes contaminantes, xileno, naftaleno y fenol de la muestra de agua alquitranada de maíz, ya que fue la muestra que se trabajó en todos los experimentos de supervivencia. En la Tabla 28. Montaje experimento, primer día y último día de experimentación, se muestra el montaje de la prueba para el día inicial y el día final, el experimento se siguió por 12 días, los cambios en la coloración y crecimiento de las muestras es notable, en la Tabla 29, se realiza un seguimiento de las muestras en el tiempo, donde se evidencia el cambio de manera secuencial, adicionalmente en la Tabla 30 se muestran los cambios de tamaño en algunas de las muestras desde el día que empezó al momento en el que terminó el

experimento. En cuanto a las curvas de crecimiento descritas Figura 52, se encuentra que los mayores crecimientos se dan en el nivel alto de contaminante bajo de medio de cultivo (4B21), además que el comportamiento de la réplica es muy similar al original confirmándose la experimentación.

Se realizó análisis de varianza ANOVA, para determinar significancia de las variables y el efecto de sus interacciones (Tabla 31), se encontró que tanto la concentración del contaminante como el tiempo son significativos en el crecimiento de las células, y aunque la concentración del medio no resulto significativo la interacción de este factor con el tiempo si resulta significativo, esto era algo que se podía presumir, debido a que después de pasar el periodo de adaptación, el agotamiento de nutrientes en el tiempo reduce el crecimiento, por lo tanto esta interacción esta soportada y confirmada.

Tabla 28. Montaje experimento, primer día y último día de experimentación

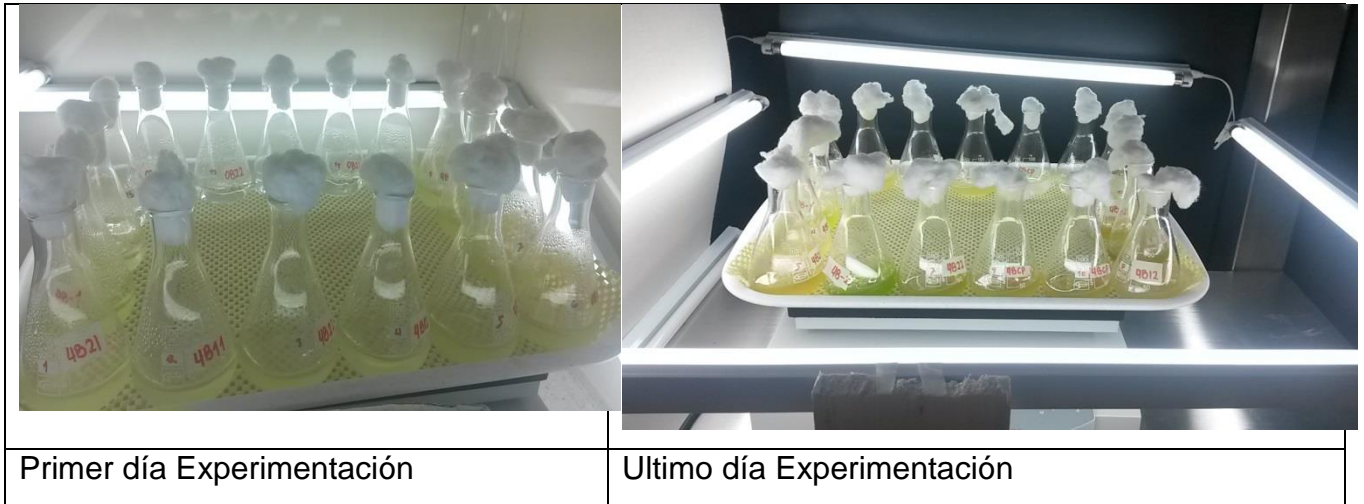
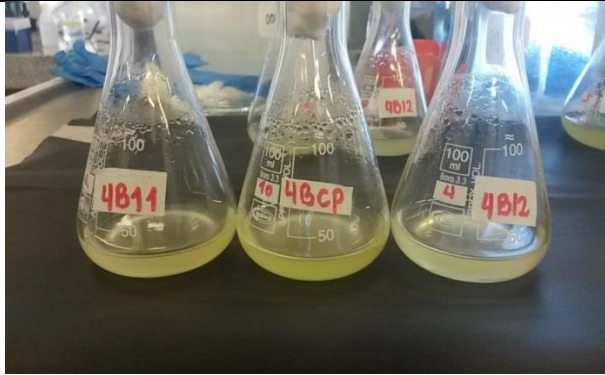
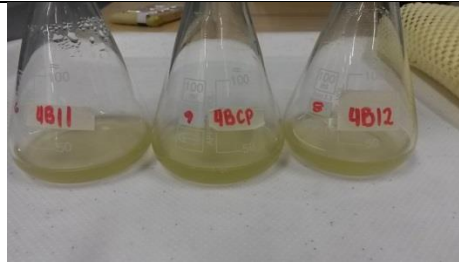
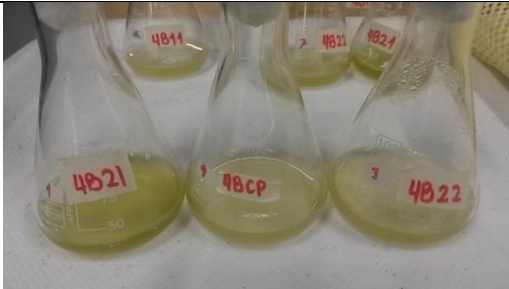


Tabla 29. Registro fotográfico cronológico de las muestra Experimento Final,

Dia 3 de la experimentación



Dia 9 de la experimentación



Dia 12 de la experimentación



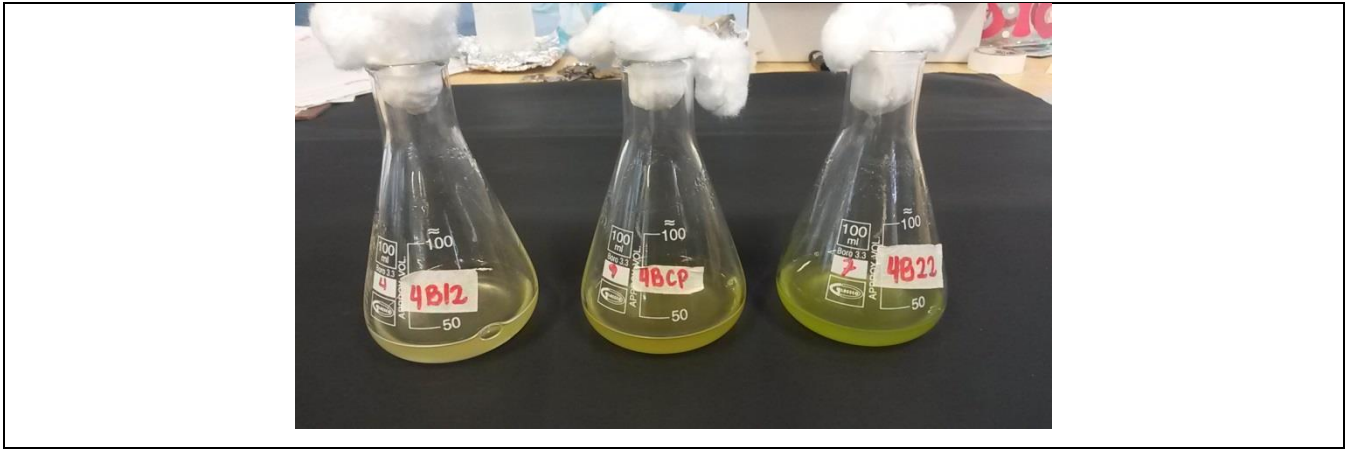
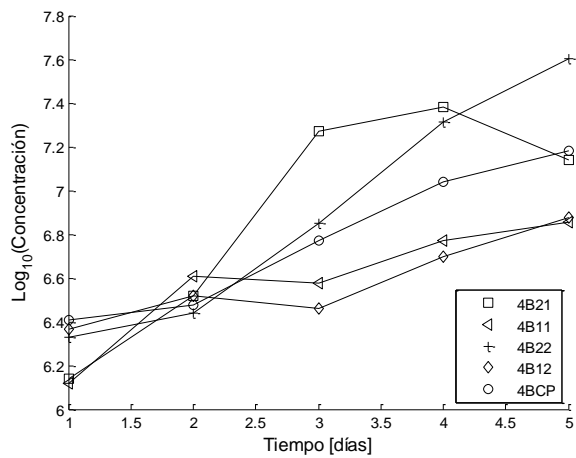
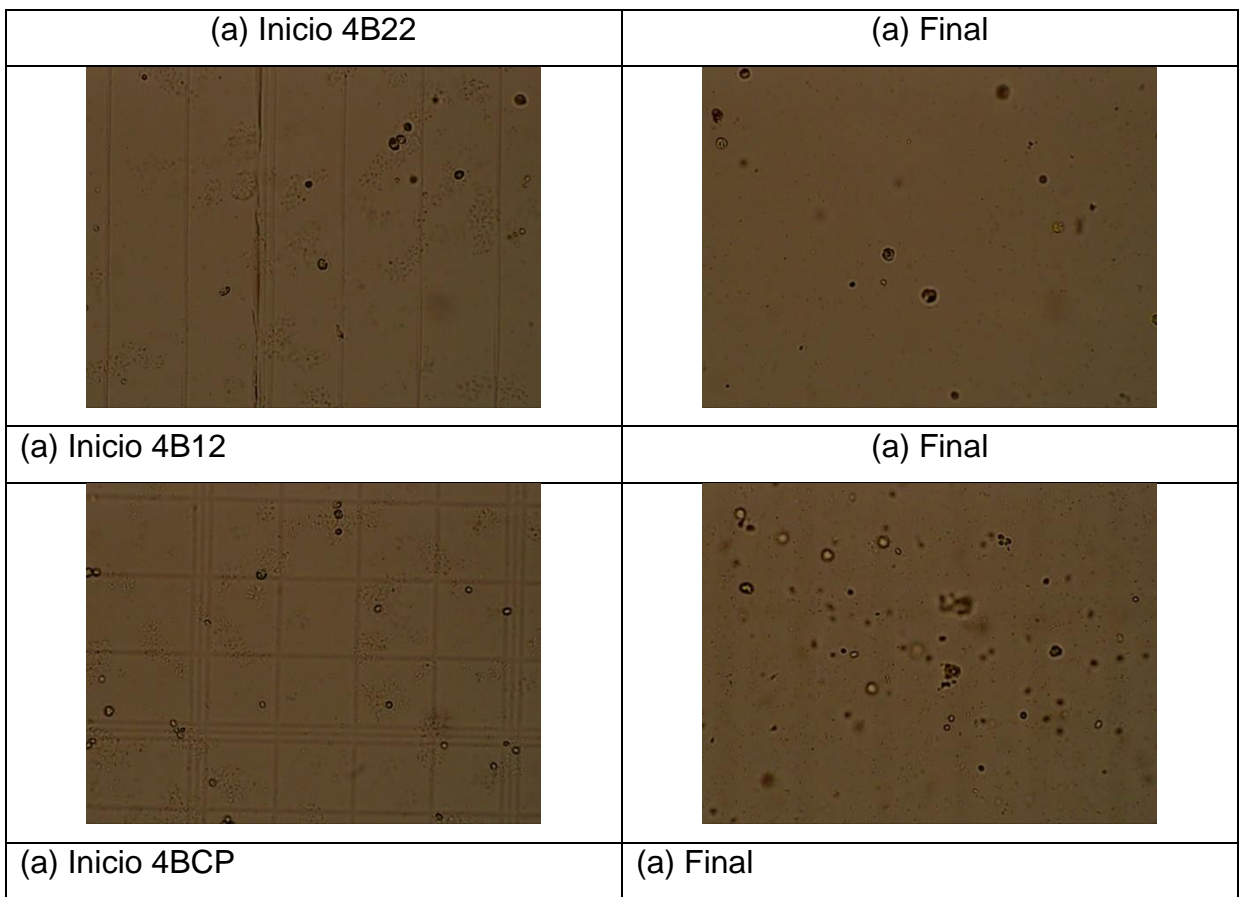
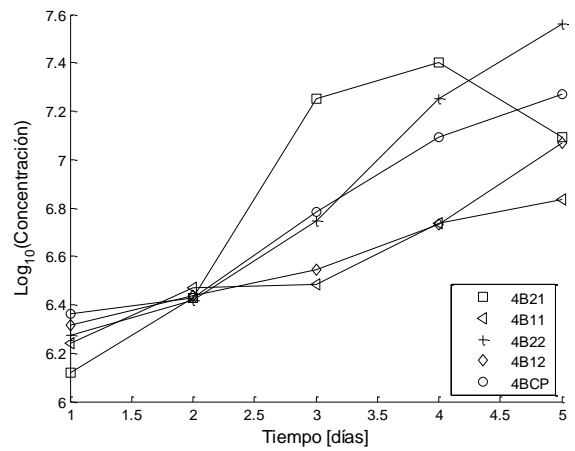


Tabla 30. Registro fotográfico en microscopio de cada muestra Experimento Final, primer y último día

(a) Inicio 4B21	(a) Final
(a) Inicio 4B11	(a) Final



(a) Experimento factorial



(b) Replica

Figura 52. Curvas de crecimiento celular modificando niveles de concentración de contaminante y de nutrientes

Tabla 31. Tabla de análisis ANOVA de Experimento Final, para determinar significancia de los factores

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
--------	----------------	----	-------------	---------	---------

A:Contaminante	7.0928E14	1	7.0928E14	36.89	0.0000
B:Medio	1.05063E13	1	1.05063E13	0.55	0.4639
C:Tiempo	1.62863E15	1	1.62863E15	84.71	0.0000
AB	3.78994E12	1	3.78994E12	0.20	0.6593
AC	5.37231E14	1	5.37231E14	27.94	0.0000
BC	1.13705E14	1	1.13705E14	5.91	0.0194
CC	3.07032E13	1	3.07032E13	1.60	0.2133
Total error	8.07458E14	42	1.92252E13		
Total (corr.)	3.8413E15	49			

6. CONCLUSIONES

- Las microalgas encontradas en los cuerpos de agua del departamento del Atlántico, tienen potencial de supervivencia y biorremediación de efluentes alquitranados provenientes de la gasificación de diferentes biomásas.
- Las microalgas provenientes de la laguna de Luruaco son las que presentaron el mejor comportamiento en relación al crecimiento celular en presencia de los contaminantes estudiados
- Las aguas alquitranadas provenientes de la gasificación de las biomásas estudiadas, presentan perfiles de alquitranes diferentes; dicha diferencia puede ser atribuida a las composiciones de dichas biomásas, ya que el gasificador y las condiciones de operación, como la temperatura del mismo, se mantuvieron constantes.
- De las técnicas exploradas para preservación y almacenamiento de las microalgas provenientes de diferentes cuerpos de agua del departamento, es efectiva la de siembra sólida de inóculo concentrado en medio de cultivo BBM; Adicionalmente, las muestras de agua que no recibieron ningún tratamiento de conservación de muestras, a excepción de la refrigeración a 4°C, mostraron buenos resultados cuando se inocularon en cultivos líquidos sumergidos, mostrando la conservación de la viabilidad de las células de de las especies encontradas originalmente en estos cuerpos de agua.
- En el estudio del crecimiento y cultivo de microalgas existen muchas variables que modifican de manera impredecible su desarrollo y desempeño al momento de realizar un análisis con alta reproducibilidad.
- A pesar de haber probado diferentes métodos para el aislamiento de las especies en cada cuerpo de agua y obtener muestras de microalgas aisladas o parcialmente aisladas, se presentaron procesos de selección natural que, al final del estudio, dieron como resultado el aislamiento de algunas especies como *Scenedesmus*, en algunas de las muestras originales.
- Se mantuvo el cepario durante 18 meses y para dicho mantenimiento y crecimiento de cultivos de microalgas se hizo necesario garantizar condiciones de temperatura de 23°C, agitación manual, al menos 2 veces en el día, iluminación artificial con intensidad lumínica en promedio de 3000 lux, suministro de nutrientes al menos una vez por semana con medio de cultivo BBM en relación 1:4 con agua, retirando parte

del cultivo y agregando medio, esto con el fin de mantener un volumen de cultivo constante; la relación de volumen de medio de cultivo fresco y caldo desocupado debe ser al menos 1:2, esto con el fin de permitir la aireación del mismo, con lo cual se mejora el crecimiento de las microalgas; adicionalmente, de ser necesario, se deben filtrar las muestras que presentes mucho precipitado ya que esto presenta un efecto negativo en el crecimiento celular.

- A diferencia de las muestras que se encuentran en el cepario, las que fueron agitadas en el shaker en las pruebas de supervivencia presentaron un crecimiento más rápido, debido a que se mejoran las condiciones de aireación con el movimiento constante, en la literatura recomiendan burbujeo de aire.
- La identificación taxonómica de las especies presentes en los cuerpos de agua, es susceptible a pruebas más precisas como el secuenciamiento de ADN, con lo que se garantiza una caracterización más completa.
- A partir de las pruebas de supervivencia se estableció una metodología adecuada para la adaptación de las microalgas con las que se trabajó en el experimento final; con esto se garantizó un mejor comportamiento en el crecimiento celular de dicha muestra, lo cual se confirma al observar que en la prueba de supervivencia II el crecimiento celular más alto, exceptuando la muestra que estaba en ausencia de contaminante, fue la de concentración de 15% de agua alquitranada, en comparación con las microalgas adaptadas en la prueba de supervivencia II (en muestra con 35% de agua alquitranada) utilizadas en las pruebas finales, donde la densidad celular más alta se presentó para las muestras con el nivel alto de contaminante que es de 5 ppm, que representa aproximadamente una concentración de 50% de dilución de agua alquitranada, adicional a esto el periodo de adaptación de las muestras se redujo a la mitad.
- De las pruebas cromatográficas y de espectrofotometría, se puede concluir de manera cualitativa que además de sobrevivir y crecer, las microalgas realizan algún tipo de acción sobre los contaminantes y que dependiendo de la mezcla de microalgas el resultado es diferente.
- Del experimento final se determinó que la concentración de contaminante y el tiempo de cultivo son variables significativas en el crecimiento celular de las microalgas, por otro lado, la concentración de medio de cultivo no es significativa, pero si se evalúa la interacción del nivel de concentración del medio en el tiempo si es significativa. Se

esperaba que esta interacción lo fuera porque al pasar del tiempo entre más células hay en los cultivos se presenta más demanda de nutrientes provenientes del medio de cultivo ocasionando un mayor impacto sobre el crecimiento de los mismos.

- Los mayores crecimientos celulares se presentan para los caldos con niveles altos de contaminante y baja concentración de medio de cultivo. Esto se puede explicar debido a que se les impone a las microalgas una condición de estrés que puede propiciar el consumo de contaminantes generando un aumento en la densidad celular

7. Trabajos futuros:

Con este estudio exploratorio se abren las puertas en diferentes direcciones de estudio, a continuación se mencionan algunas posibilidades de estudio para ahondar en el estado del arte de la BIORREMEDIACIÓN de efluentes alquitranados con microalgas:

- Establecer cinéticas para la degradación de los alquitranes presentes en las aguas de lavado provenientes de la gasificación de las diferentes biomasas estudiadas y otras, a partir de diferentes tipos de microalgas, tanto en consorcios como en forma aislada.
- Dar robustez a la metodología desarrollada para la remediación de aguas contaminadas con alquitranes provenientes del proceso de lavado de los gases de gasificación utilizando microalgas nativas.
- Determinar la modificación genética asociada, si la hay, a la adaptación de las microalgas por el efecto de las aguas contaminadas con alquitranes del proceso de gasificación.
- Determinar las condiciones óptimas de operación para la biorremediación de efluentes de la gasificación utilizando las microalgas empleadas en este trabajo
- Establecer la relación entre la composición de las biomasas gasificadas y las condiciones de gasificación con la composición de los efluentes resultantes.
- A partir de las condiciones óptimas, plantear escalado en fotobioreactores diseñados (4L), verificar modificaciones en las condiciones de operación óptimas para dicho escalamiento, como una etapa previa a una mayor escala que utilice luz solar como fuente de energía para el crecimiento de las microalgas
- Establecer la relación entre la cantidad de biomasa producida a partir de las microalgas y la fuente de nutriente que está tomando, específicamente en este caso del contaminante.

Referencias

- [1] A. L. Juhasz and R. Naidu, "Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene," *Int. Biodeterior. Biodegradation*, vol. 45, no. 1–2, pp. 57–88, Jan. 2000.
- [2] E. Manoli and C. Samara, "Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters: sources, occurrence and analysis," *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 18, no. 6, pp. 417–428, Jun. 1999.
- [3] A. K. Haritash and C. P. Kaushik, "Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review.," *J. Hazard. Mater.*, vol. 169, no. 1–3, pp. 1–15, Sep. 2009.
- [4] C. E. Cerniglia and S. K. Yang, "Stereoselective metabolism of anthracene and phenanthrene by the fungus *Cunninghamella elegans*," *Appl. Envir. Microbiol.*, vol. 47, no. 1, pp. 119–124, Jan. 1984.
- [5] A. L. Juhasz and R. Naidu, "Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene," *Int. Biodeterior. Biodegradation*, vol. 45, no. 1–2, pp. 57–88, Jan. 2000.
- [6] J. J. Olmos-Espejel, M. P. García de Llasera, and M. Velasco-Cruz, "Extraction and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and benzo[a]pyrene metabolites in microalgae cultures by off-line/on-line methodology based on matrix solid-phase dispersion, solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography.," *J. Chromatogr. A*, vol. 1262, pp. 138–47, Nov. 2012.
- [7] P. Quaak, H. Knoef, and H. E. Stassen, *Energy from biomass: a review of combustion and gasification technologies*, vol. 23. World Bank Publications, 1999.
- [8] L. Devi, K. J. Ptasinski, and F. J. J. Janssen, "A review of the primary measures for tar elimination in biomass gasification processes," *Biomass and Bioenergy*, vol. 24, no. 2, pp. 125–140, Feb. 2003.
- [9] L. Devi, K. J. Ptasinski, and F. J. J. G. Janssen, "A review of the primary measures for tar elimination in biomass gasification processes," *Biomass and Bioenergy*, vol. 24, no. 2, pp. 125–140, 2003.
- [10] S. R. Subashchandrabose, B. Ramakrishnan, M. Megharaj, K. Venkateswarlu, and R. Naidu, "Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: biotechnological potential.," *Biotechnol. Adv.*, vol. 29, no. 6, pp. 896–907, Jan. 2011.
- [11] K. Lah, "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons," 2011. [Online]. Available: <http://www.toxipedia.org/display/toxipedia/Polycyclic+Aromatic+Hydrocarbons>. [Accessed: 01-Jan-2015].
- [12] M. Asadullah, "Biomass gasification gas cleaning for downstream applications: A comparative critical review," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 40, pp. 118–132, Dec. 2014.

- [13] N. Couto, A. Rouboa, V. Silva, E. Monteiro, and K. Bouziane, "Influence of the Biomass Gasification Processes on the Final Composition of Syngas," *Energy Procedia*, vol. 36, pp. 596–606, Jan. 2013.
- [14] J. Sulc, J. Stojdl, M. Richter, J. Popelka, K. Svoboda, J. Smetana, J. Vacek, S. Skoblja, and P. Buryan, "Biomass waste gasification - can be the two stage process suitable for tar reduction and power generation?," *Waste Manag.*, vol. 32, no. 4, pp. 692–700, Apr. 2012.
- [15] V. Kirubakaran, V. Sivaramakrishnan, R. Nalini, T. Sekar, M. Premalatha, and P. Subramanian, "A review on gasification of biomass," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 13, no. 1, pp. 179–186, 2009.
- [16] W. Piekarczyk, L. Czarnowska, K. Ptasiński, and W. Stanek, "Thermodynamic evaluation of biomass-to-biofuels production systems," *Energy*, vol. 62, pp. 95–104, Dec. 2013.
- [17] Y. Shen, P. Zhao, Q. Shao, D. Ma, F. Takahashi, and K. Yoshikawa, "In-situ catalytic conversion of tar using rice husk char-supported nickel-iron catalysts for biomass pyrolysis/gasification," *Appl. Catal. B Environ.*, vol. 152–153, pp. 140–151, Jun. 2014.
- [18] T. A. Milne, N. Abatzoglou, and R. J. Evans, "Biomass gasifier ' tars ': their nature, formation, and conversion," 1998.
- [19] E. Dahlquist, *Technologies for converting biomass to useful energy: combustion, gasification, pyrolysis, torrefaction and fermentation*. CRC Press, 2013.
- [20] Y. Shen, P. Zhao, Q. Shao, D. Ma, F. Takahashi, and K. Yoshikawa, "In-situ catalytic conversion of tar using rice husk char-supported nickel-iron catalysts for biomass pyrolysis/gasification," *Appl. Catal. B Environ.*, vol. 152–153, pp. 140–151, Jun. 2014.
- [21] A. Paethanom, S. Nakahara, M. Kobayashi, P. Prawisudha, and K. Yoshikawa, "Performance of tar removal by absorption and adsorption for biomass gasification," *Fuel Process. Technol.*, vol. 104, pp. 144–154, Dec. 2012.
- [22] L. Devi, K. J. Ptasiński, F. J. J. G. Janssen, S. V. B. van Paasen, P. C. A. Bergman, and J. H. A. Kiel, "Catalytic decomposition of biomass tars: use of dolomite and untreated olivine," *Renew. Energy*, vol. 30, no. 4, pp. 565–587, Apr. 2005.
- [23] P. C. A. Bergman, S. V. B. van Paasen, and H. Boerrigter, "The novel 'OLGA' technology for complete tar removal from biomass producer gas," in *Pyrolysis and Gasification of Biomass and Waste, Expert Meeting, Strasbourg, France*, 2002, vol. 30.
- [24] I. Aigner, U. Wolfesberger, and H. Hofbauer, *Tar content and composition in producer gas of fluidized bed gasification and low temperature pyrolysis of straw and wood-influence of temperature*. na, 2009.
- [25] A. Verdeza, "Caracterización del gasificación en lecho fijo para el residuo agroindustrial cuesco de palma africana en la región caribe," Tesis de Maestría Universidad del Norte, Barranquilla-Colombia, 2013.
- [26] T. Ogi, M. Nakanishi, Y. Fukuda, and K. Matsumoto, "Gasification of oil palm residues (empty fruit bunch) in an entrained-flow gasifier," *Fuel*, vol. 104, pp. 28–35, Feb. 2013.

- [27] Y. Lenis, "ESTUDIO DEL PROCESO DE GASIFICACIÓN DE BIOMASA EN LECHO FIJO EQUICORRIENTE," UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA, 2013.
- [28] S. Anis and Z. A. Zainal, "Upgrading producer gas quality from rubber wood gasification in a radio frequency tar thermocatalytic treatment reactor.," *Bioresour. Technol.*, vol. 150, pp. 328–37, Dec. 2013.
- [29] S. Anis and Z. A. Zainal, "Tar reduction in biomass producer gas via mechanical, catalytic and thermal methods: A review," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 15, no. 5, pp. 2355–2377, Jun. 2011.
- [30] M. Ahmadi Svensson, "Sampling and Analysis of Tars by Means of Photo Ionization Detection and Solid Phase Micro Extraction," 2013.
- [31] I. de Godos, V. A. Vargas, S. Blanco, M. C. G. González, R. Soto, P. A. García-Encina, E. Becares, and R. Muñoz, "A comparative evaluation of microalgae for the degradation of piggery wastewater under photosynthetic oxygenation.," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 14, pp. 5150–8, Jul. 2010.
- [32] L. E. de-Bashan and Y. Bashan, "Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects.," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 6, pp. 1611–27, Mar. 2010.
- [33] K. T. Semple, R. B. Cain, and S. Schmidt, "Biodegradation of aromatic compounds by microalgae," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 170, no. 2, pp. 291–300, Jan. 1999.
- [34] S. R. Subashchandrabose, B. Ramakrishnan, M. Megharaj, K. Venkateswarlu, and R. Naidu, "Mixotrophic cyanobacteria and microalgae as distinctive biological agents for organic pollutant degradation.," *Environ. Int.*, vol. 51, pp. 59–72, Jan. 2013.
- [35] Y.-W. Hong, D.-X. Yuan, Q.-M. Lin, and T.-L. Yang, "Accumulation and biodegradation of phenanthrene and fluoranthene by the algae enriched from a mangrove aquatic ecosystem.," *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 56, no. 8, pp. 1400–5, Aug. 2008.
- [36] K. Ben Chekroun, E. Sánchez, and M. Baghour, "The role of algae in bioremediation of organic pollutants," 2014.
- [37] A.-P. Lei, Z.-L. Hu, Y.-S. Wong, and N. F.-Y. Tam, "Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgal species," *Bioresour. Technol.*, vol. 98, no. 2, pp. 273–280, Jan. 2007.
- [38] C. E. Cerniglia, D. T. Gibson, and C. Van Baalen, "Oxidation of naphthalene by cyanobacteria and microalgae," *J. Gen. Microbiol.*, vol. 116, no. 2, pp. 495–500, 1980.
- [39] K. T. Semple, R. B. Cain, and S. Schmidt, "Biodegradation of aromatic compounds by microalgae," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 170, no. 2, pp. 291–300, Jan. 1999.
- [40] B. RATH, "Microalgal bioremediation: Current practices and perspectives," *J. Biochem. Technol.*, vol. 3, no. 3, pp. 299–304, 2012.
- [41] M. T. Ale, M. Pinelo, and A. S. Meyer, "ASSESSING EFFECTS AND INTERACTIONS AMONG KEY VARIABLES AFFECTING THE GROWTH OF MIXOTROPHIC MICROALGAE: pH, INOCULUM VOLUME, AND GROWTH MEDIUM COMPOSITION," *Prep. Biochem. Biotechnol.*, vol. 44, no. 3, pp. 242–256, 2014.

- [42] J. K. Pittman, A. P. Dean, and O. Osundeko, "The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources.," *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 1, pp. 17–25, Jan. 2011.
- [43] J. Huisman and F. J. Weissing, "Fundamental unpredictability in multispecies competition," *Am. Nat.*, vol. 157, no. 5, pp. 488–494, 2001.
- [44] F. C. Rubio, M. E. M. Sancho, and S. S. Villasclaras, "Influencia del pH en el Crecimiento Heterotr{ö}fico de *Chlorella pyrenoidosa*," *AFINIDAD*, vol. 45, no. 418, p. 497, 1988.
- [45] J. Van Wagenen, T. W. Miller, S. Hobbs, P. Hook, B. Crowe, and M. Huesemann, "Effects of Light and Temperature on Fatty Acid Production in *Nannochloropsis Salina*," *Energies*, vol. 5, no. 12, pp. 731–740, Mar. 2012.
- [46] K. O. Cassidy, "Evaluating algal growth at different temperatures," 2011.
- [47] L. Xin, H. Hu, G. Ke, and Y. Sun, "Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp.," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 14, pp. 5494–500, Jul. 2010.
- [48] A. Juneja, R. M. Ceballos, and G. S. Murthy, "Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: a review," *Energies*, vol. 6, no. 9, pp. 4607–4638, 2013.
- [49] K. Miazek, C. Remacle, A. Richel, and D. Goffin, "Effect of lignocellulose related compounds on microalgae growth and product biosynthesis: a review," *Energies*, vol. 7, no. 7, pp. 4446–4481, 2014.
- [50] A. P. Carvalho, S. O. Silva, J. M. Baptista, and F. X. Malcata, "Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects.," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 89, no. 5, pp. 1275–88, Mar. 2011.
- [51] W. H. Thomas and C. H. Gibson, "Effects of small-scale turbulence on microalgae," *J. Appl. Phycol.*, vol. 2, no. 1, pp. 71–77, Mar. 1990.
- [52] V. D. CORTES and C. O. OVALLE, "EVALUACION DEL pH Y LA AGITACION DEL MEDIO MAS ADECUADA PARA EL CRECIMIENTO DE *Dunaliella salina* EN CONDICIONES DE LABORATORIO.," Pontificia Universidad Javeriana, 2006.
- [53] L. H. R. Rodrigues, A. Arenzon, M. T. Raya-Rodriguez, and N. F. Fontoura, "Algal density assessed by spectrophotometry: A calibration curve for the unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*," *J. Environ. Chem. Ecotoxicol. Vol*, vol. 3, no. 8, pp. 225–228, 2011.
- [54] R. R. L. Guillard and M. S. Sieracki, "Counting cells in cultures with the light microscope," *Algal Cult. Tech.*, pp. 239–252, 2005.
- [55] A. M. Wood, R. C. Everroad, and L. M. Wingard, "Measuring growth rates in microalgal cultures," *Algal Cult. Tech.*, pp. 269–285, 2005.

- [56] N. R. Moheimani, M. A. Borowitzka, A. Isdepsky, and S. F. Sing, "Standard Methods for Measuring Growth of Algae and Their Composition," in *Algae for Biofuels and Energy*, Dordrecht: Springer Netherlands, 2013, pp. 265–284.
- [57] J. H. A. Kiel, S. V. B. Van Paasen, J. P. A. Neeft, L. Devi, K. J. Ptasinski, F. Janssen, R. Meijer, R. H. Berends, H. M. G. Temmink, G. Brem, and others, "Primary measures to reduce tar formation in fluidised-bed biomass gasifiers," *ECN, ECN-C-04-014*, 2004.
- [58] P. Hasler and T. Nussbaumer, "Sampling and analysis of particles and tars from biomass gasifiers," *Biomass and Bioenergy*, vol. 18, no. 1, pp. 61–66, Jan. 2000.
- [59] J. PAWLISZYN, B. PAWLISZYN, and M. PAWLISZYN, "Solid phase microextraction (SPME)," *Chem. Educ.*, vol. 2, no. 4, pp. 1–7, 1997.
- [60] D. A. Skoog, D. M. West, and F. J. Holler, *Fundamentos de química analítica*, no. v. 2. Revert{é}, 1997.
- [61] A. Bacher, "Gas Chromatography," *University of California Department of Chemistry and Biochemistry*, 2015. [Online]. Available: <http://www.chem.ucla.edu/~bacher/General/30BL/gc/theory.html>. [Accessed: 10-Nov-2015].
- [62] J. Richardson, "Gas Chromatography," *Organic Chemistry at CU Boulder*, 2015. [Online]. Available: <http://orgchem.colorado.edu/Technique/Procedures/GC/GC.html>. [Accessed: 10-Nov-2015].
- [63] S. M. N. Chan, T. Luan, M. H. Wong, and N. F. Y. Tam, "Removal and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Selenastrum capricornutum*," *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 25, no. 7, pp. 1772–9, Jul. 2006.
- [64] Q. T. Gao, Y. S. Wong, and N. F. Y. Tam, "Removal and biodegradation of nonylphenol by different *Chlorella* species," *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 63, no. 5–12, pp. 445–51, Jan. 2011.
- [65] L. Luo, P. Wang, L. Lin, T. Luan, L. Ke, and N. F. Y. Tam, "Removal and transformation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons in water by live and dead microalgae," *Process Biochem.*, Jul. 2014.
- [66] C. E. Gattullo, H. Bährs, C. E. W. Steinberg, and E. Loffredo, "Removal of bisphenol A by the freshwater green alga *Monoraphidium braunii* and the role of natural organic matter," *Sci. Total Environ.*, vol. 416, pp. 501–6, Feb. 2012.
- [67] G. Markou and E. Nerantzis, "Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions," *Biotechnol. Adv.*, vol. 31, no. 8, pp. 1532–42, Dec. 2013.
- [68] R. Sager and S. Granick, "Nutritional control of sexuality in *Chlamydomonas reinhardtii*," *J. Gen. Physiol.*, vol. 37, no. 6, pp. 729–742, 1954.
- [69] Z. T. Wang, N. Ullrich, S. Joo, S. Waffenschmidt, and U. Goodenough, "Algal lipid bodies: stress induction, purification, and biochemical characterization in wild-type and starchless *Chlamydomonas reinhardtii*," *Eukaryot. Cell*, vol. 8, no. 12, pp. 1856–1868, 2009.

- [70] D. Carrera-Martínez, A. Mateos-Sanz, V. López-Rodas, and E. Costas, "Microalgae response to petroleum spill: An experimental model analysing physiological and genetic response of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to oil samples from the tanker Prestige," *Aquat. Toxicol.*, vol. 97, no. 2, pp. 151–159, 2010.
- [71] J. Romero-Lopez, V. Lopez-Rodas, and E. Costas, "Estimating the capability of microalgae to physiological acclimatization and genetic adaptation to petroleum and diesel oil contamination," *Aquat. Toxicol.*, vol. 124–125, pp. 227–237, 2012.
- [72] D. Carrera-Martinez, A. Mateos-Sanz, V. Lopez-Rodas, and E. Costas, "Adaptation of microalgae to a gradient of continuous petroleum contamination.," *Aquat. Toxicol.*, vol. 101, no. 2, pp. 342–50, Jan. 2011.
- [73] G. Roldan and T. Machado, "Manual de limnología teoría y práctica," *Univ. Antioquía*, pp. 69–180, 1979.
- [74] M. Al-Qasmi, N. Raut, S. Talebi, S. Al-Rajhi, and T. Al-Barwani, "A review of effect of light on microalgae growth," in *Proceedings of the world congress on engineering*, 2012, vol. 1, pp. 4–6.
- [75] E. Leal, "Manual de laboratorio de cultivo de microalgas," *Universidad del Atlantico*. Universidad del Atlantico, pp. 3–60, 1998.
- [76] D. L. Roelke and P. M. Eldridge, "Losers in the 'Rock-Paper-Scissors' game: The role of non-hierarchical competition and chaos as biodiversity sustaining agents in aquatic systems," *Ecol. Modell.*, vol. 221, no. 7, pp. 1017–1027, Apr. 2010.
- [77] K. Rogers, "Encyclopedia Britannica," 2015. [Online]. Available: <http://global.britannica.com/science/inclusive-fitness>. [Accessed: 01-Jan-2015].