



Aislamiento de microalgas mixotróficas a partir de columnas de Winogradsky, con posible aplicación en la remoción de materia orgánica y color en aguas residuales no domésticas pos tratadas

Jorge Arturo Rengel

Programa de Microbiología Industrial

Directora

Aura Marina Pedroza Rodríguez, Bacterióloga, M.Sc., PhD.

Laboratorio Microbiología Ambiental

Pontificia Universidad Javeriana

Bogotá-Colombia

Trabajo de Grado
Programa de Microbiología Industrial

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTA D.C. 28 DE NOVIEMBRE DEL 2018

NOTA DE ADVERTENCIA

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1996

Aislamiento de microalgas mixotróficas a partir de columnas de Winogradsky, con posible aplicación en la remoción de materia orgánica y color en aguas residuales no domésticas pos tratadas

Jorge Arturo Rengel

Aura Marina Pedroza Rodríguez
Bacterióloga, M.Sc., Ph.D.
Directora

Claudia Marcela Rivera Hoyos
Bióloga, M.Sc., Ph.D.
Jurado

Aislamiento de microalgas mixotróficas a partir de columnas de Winogradsky, con posible aplicación en la remoción de materia orgánica y color en aguas residuales no domésticas pos tratadas

Jorge Arturo Rengel

Aprobado

Concepción J. Puerta Bula, Bact., Ph.D.
Decana
Facultad de Ciencias

Marcela Franco Correa Microb., Ph.D.
Directora del Programa
Microbiología Industrial

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento

A mis padres que en cada etapa de mi vida me han acompañado y han sido un apoyo incondicional a lo largo de mi carrera, agradezco sus esfuerzos para que pueda estudiar en otro país pese a las complicaciones que eso implica.

A la Dra. Aura Marina Pedroza Rodríguez por permitirme trabajar en el laboratorio, agradezco sus enseñanzas, orientación, paciencia apoyo y exigencia que contribuyó a que aprendiera mucho en lo personal y académico

A Natalia Céspedes que ha sido un apoyo a lo largo de la tesis y de mis últimos años en la universidad, tanto en el los trabajos de laboratorio como en lo personal ha sido una muy buena amiga y compañera de tesis.

Adicionalmente quisiera agradecer a el proyecto 00007681, titled “*Uso combinado de hongos ligninolíticos y pirólisis para la obtención de biochar modificado empleando el modelo de biorefinería*”.

ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	4

4. MARCO TEÓRICO.....	5
4.1 Aguas residuales no domésticas derivadas de tinciones biológicas (ArnD).....	5
4.2 Impacto ambiental.....	8
4.3 Normatividad Colombiana para vertimientos resolución 0631 y 3957.....	9
4.4 Tratamiento terciario de aguas residuales como sustrato para el cultivo mixitrófico de microalgas.....	11
4.4.1 Mecanismos de remoción de nutrientes.....	15
4.5 Algas eucariotas.....	18
4.6 Función fotosintética.....	19
4.7 Cultivo de microalgas bajo mixotrofia.....	21
4.8 Factores físicos, químicos y biológicos que afectan el crecimiento mixotrófico.....	24
4.8.1 Luz.....	24
4.8.2 Fuente de carbono.....	26
4.8.3 Temperatura.....	28
4.8.4 Iones metálicos.....	28
4.8.5 pH.....	28
4.8.6 Fuentes de nitrógeno.....	29
4.8.7 Fuentes de fósforo.....	30
4.8.8 Otros macronutrientes.....	30
4.8.9 Oxígeno.....	31
4.8.10 Agitación.....	31
4.8.11 Relación N: P.....	32
4.8.12 Reactores para cultivo mixotrófico de algas.....	32
5 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	34

6 HIPÓTESIS Y RESULTADOS ESPERADOS.....	34
7 OBJETIVOS.....	35
7.1 Objetivo general.....	35
7.2 Objetivos específicos.....	35
8. METODOLOGÍA.....	36
8.1 Recuento y caracterización por morfología microscópica de microalgas totales a partir de columnas de Winogradsky con diferentes tiempos de estabilización.....	36
8.2 Selección de microalgas mixotróficas con capacidad para crecer en aguas residuales no domésticas pos tratadas en la planta de tratamiento de la Facultad de Ciencias.....	39
8.3 Montaje de planta y caracterización fisicoquímica de agua residual cada 24 horas por 8 días.....	42
8.4 Técnicas analíticas.....	44
8.5 Curvas espectrales del diseño experimental de paso descendente.....	46
8.6 Preparación de inóculo <i>Plackett Burman</i>	47
8.7 Confirmación de la presencia de las microalgas seleccionadas de la prueba de tolerancia en el inóculo de Plackett Burman.....	48
8.8 Preparación y montaje de unidades experimentales del diseño <i>Plackett Burman</i>	48
8.9 Análisis estadístico.....	51
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
9.1 Recuento y caracterización por morfología microscópica de microalgas totales a partir de columnas de Winogradsky con diferentes tiempos de estabilización.....	51
9.2 Selección de microalgas mixotróficas con capacidad para crecer en aguas residuales no domésticas pos tratadas en la planta de tratamiento de la Facultad de Ciencias.....	58
9.3 Montaje de planta y caracterización fisicoquímica de agua residual por 8 días muestreos cada 24 horas.....	65
9.4 Curvas espectrales de diseño experimental de paso descendente.....	72

9.5 Confirmación de la presencia de las microalgas seleccionadas de la prueba de tolerancia en el inóculo de Plackett Burman.....	73
9.6 Resultados diseño Factorial Plackett Burman con tres puntos centrales.....	75
10. CONCLUSIONES.....	91
11. RECOMENDACIONES.....	92
12. BIBLIOGRAFÍA.....	93
13. ÍNDICE DE FIGURAS	
Figura 1. Esquema general de proteínas involucradas en la asimilación de nitrato.....	16
Figura 2. Esquema reacciones de la fotosíntesis.....	19
Figura 3. Estructura de la clorofila a.....	21
Figura 4. Esquema de vías metabólicas para la asimilación de carbono y producción de energía en microalgas foto autotróficas, heterótrofas y mixotróficas	23
Figura 5. Aislamiento e identificación morfológica de microalgas recuperadas de las columnas de Winogradsky.....	39
Figura 6. Recuento de microalgas mixotróficas resistentes a diferentes concentraciones de agua residual no doméstica pos tratadas en la planta de tratamiento de la Facultad de Ciencias.....	41
Figura 7. Unidades de tratamiento empleadas en la planta piloto a escala de laboratorio.....	44
Figura 8. Preparación del inóculo <i>Plackett Burman</i>	48
Figura 9. Preparación y montaje de unidades experimentales del diseño <i>Plackett Burman</i>	51
Figura 10. Morfologías más representativas pertenecientes a las 9 columnas de Winogradsky...	54
Figura 11. Recuento de microalgas totales según el número de columna y tiempo de estabilización.....	57
Figura 12. Protocolo número 1 recuento de microalgas inicial y final de las 3 primeras columnas.....	62
Figura 13. Protocolo número 2 recuento en placa de microalgas clorófitas según la concentración de agua residual y el número de columna.....	64

Figura 14. Crecimiento en placa de microalgas resistentes a 100 % (v/v) de agua residual.....	65
Figura 15. Unidades de color, DQO, sólidos sedimentables, sólidos suspendidos, pH, en la planta de tratamiento durante 168 horas de operación.....	71
Figura 16. Curvas espectrales del efluente y afluente de la planta de tratamiento.....	73
Figura 17. Confirmación de algas con tolerancia al agua residual al 100% (v/v).....	74
Figura 18. Diagramas de Pareto asociados a las variables de respuesta.....	76
Figura 19. Variables de respuesta del diseño experimental Plackett Burman según el tratamiento.....	78
Figura 20. Diagramas de Pareto asociados con las diferentes longitudes de onda para determinar el efecto de los factores sobre el porcentaje de decoloración.....	84
Figura 21. Porcentaje de decoloración a diferentes longitudes de onda de los 12 tratamientos....	86
	87
Figura 22. Curvas espectrales iniciales y finales de los 12 tratamientos.....	
Figura 23. Nitratos y nitritos iniciales y finales de los 12 tratamientos experimentales del diseño <i>Plackett Burman</i>	91
ÍNDICE DE TABLAS	
	6
Tabla 1. Estructura química de los colorantes.....	
Tabla 2. Valores de referencia vertimientos según la Resolución 3957 de 2009 de la SDA y la Resolución 0631 de 2015 del Ministerio de Ambiente y desarrollo.....	10
	31
Tabla 3. Aspectos técnicos para cultivos mixotróficos.....	
	36
Tabla 4. Columnas de Winogradsky a emplear para el muestreo.....	
Tabla 5. Proporciones de ARnD y Agua destilada a evaluar para las pruebas de crecimiento y tolerancias.....	40
	41
Tabla 6. Valores diseño experimental Plackett Burman.....	
Tabla 7. Valores finales de parámetros evaluados en el agua residual respecto a las resoluciones vigentes: 3957 de 2011 y 0631 de 2015.....	59
	60
Tabla 8. Porcentajes de remoción de la planta de tratamiento.....	
	66
Tabla 9. Caracterización fisicoquímica del efluente y afluente.....	

Tabla 10. Análisis de varianza y coeficientes de regresión para porcentaje de remoción DQO, peso seco (g/L) y recuento de microalgas (Células/mL)	76
Tabla 11. Análisis de varianza y coeficientes de regresión para porcentaje de decoloración a diferentes longitudes de onda.....	82
Tabla 12. Análisis de varianza y coeficientes de regresión para porcentaje de decoloración a diferentes longitudes de onda.....	84

1. Resumen

Las aguas residuales derivadas de tinciones biológicas que son vertidas en los desagües generan un impacto ambiental adverso en los cuerpos de agua receptores debido a que aumentan la DQO, la DBO₅, el contenido de sólidos, el color del agua, nitratos, nitritos, y fosfatos, lo que puede causar problemas como la toxicidad aguda a diferentes niveles tróficos y la eutrofización de los ecosistemas acuáticos. Actualmente, los métodos biológicos no convencionales empleando microalgas son una alternativa para el tratamiento primario, secundario o terciario de estos residuos. En el presente estudio se recuperaron microalgas a partir de columnas de Winogradsky con tiempos de estabilización de 4-3, 9 y 12 meses en donde se identificaron varios géneros de microalgas los cuales fueron disminuyendo en las columnas con mayor tiempo de estabilización, aunque los géneros fueron disminuyendo, el recuento de microalgas totales fue aumentando en las columnas con mayor tiempo de estabilización presentando una proporción mayor de clorofitas que diatomeas. Posteriormente se sometió a las microalgas a una prueba de mixotrofia y tolerancia al agua residual al 100% (v/v) en donde se seleccionaron los morfotipos que pudieron crecer en mixotrofia y que fueron resistentes al agua residual, perteneciendo en su mayoría al género *Chlorella* sp. Adicionalmente, se realizó el montaje, operación y monitoreo de la planta piloto de la Facultad de Ciencias para generar agua residual pos tratada la cual fue utilizada para realizar el diseño experimental *Plackett Burman* con microalgas. El diseño experimental consistió de 12 tratamientos y un punto central evaluado 3 veces, se determinó que el tratamiento 1 el cual tuvo un pH de 7.0, 1000 mL/L de aireación, con solución de nutrientes del Bold, 4 % v/v de inóculo, 1000 lux y 10 días de proceso, fue el que obtuvo mayor porcentaje de remoción de DQO (81%), productividad (3 g biomasa/día), recuento de células ($1,67 \times 10^7$ cel/mL) y porcentaje de decoloración mayor en 5 diferentes longitudes de onda. Sin embargo, a excepción de 2 tratamientos, ninguno logró remover nitritos ni nitratos.

2. Introducción

La contaminación de los suministros de aguas causada por metales, colorantes, nutrientes, y contaminantes orgánicos persistentes es un problema a nivel mundial que ocasiona que la salud de las personas, animales y plantas se encuentre en riesgo químico, físico y biológico (Conway *et al.*, 2015).

Dentro de los laboratorios de docencia e investigación de las instituciones de educación superior como la Pontificia Universidad Javeriana se generan residuos líquidos que contienen componentes similares a los de la industria textil como lo son colorantes, solventes, mordientes y aditivos, por lo que es necesario realizar un tratamiento antes de verter el agua al sistema de alcantarillado para garantizar que los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos puedan cumplir con lo establecido en la normativa del país (para Colombia las resoluciones 3957/2009 Secretaria Distrital de Ambiente y Resolución 0631/2015 Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible). Los contaminantes químicos y biológicos que se encuentran en aguas provenientes de los laboratorios representan un riesgo para la salud, ya que en éstas hay aditivos, solventes, colorantes empleados para tinciones como el cristal violeta, verde de malaquita, rojo congo, fucsina, azul de lactofenol, que son considerados agentes cancerígenos, y adicionalmente se encuentran microorganismos patógenos y no patógenos, haciendo necesaria la implementación de tratamientos que disminuyan o eliminen la presencia de estos contaminantes (Pedroza *et al.*, 2018).

Para realizar el tratamiento de este tipo de aguas residuales, la Pontificia Universidad Javeriana y la Universidad de La Salle, realizaron un proyecto de investigación que tenía como objetivo principal: *“Diseñar, implementar y evaluar a escala de laboratorio un sistema secuencial que combine el potencial enzimático de los hongos lignocelulolíticos y fotocatalisis con TiO₂ para la remoción de color y carga orgánica presente en los subproductos líquidos derivados de las tinciones de microbiología para reutilizados en*

zonas verdes”. Al finalizar este proyecto se diseñó una planta de tratamiento a escala de laboratorio que remueve más del 85 % el color, Demanda Química de Oxígeno, Demanda Bioquímica de oxígeno y sólidos suspendidos totales. Sin embargo, aún persiste en el efluente final aproximadamente un 15 % de color verdadero, materia orgánica y nutrientes. Por esta razón, se busca adicionar a la planta de tratamiento un proceso unitario complementario que tratar de remover ese 15 % al emplear microalgas mixotróficas para la remoción de color y materia orgánica.

Las microalgas, a diferencia de la mayoría de hongos y bacterias, pueden crecer bajo condiciones mixotróficas, lo que significa que fijan el CO₂ del ambiente y pueden emplear compuestos orgánicos sencillos como fuente de carbono para su crecimiento. En un cultivo mixotrófico las microalgas viven en condiciones fototróficas y heterotróficas simultáneamente, siendo esta capacidad de usar compuestos orgánicos como fuente de carbono lo que permite la remoción de materia orgánica y carbono en el agua residual **(Mata et al., 2010)**.

El punto más crítico para el cultivo masivo de microalgas es cubrir los requerimientos de agua y nutrientes. Las aguas residuales industriales como las aguas residuales textiles son una fuente económica de agua, que además contiene nutrientes necesarios (fosfato, nitratos, sulfatos, cloruros, etc.) y colorantes o intermediarios de la biodegradación (fuente potencial de carbono) para el cultivo de algas **(Fazal et al., 2018)**. Las microalgas se pueden emplear eficazmente para biorremediar aguas residuales con colorantes (eliminación de colorantes y nutrientes) y para producir bioproductos como cosméticos, fertilizantes y biocombustibles **(Fazal et al., 2018; Ong et al., 2011)**.

Algunos de los géneros más reportados para tratar este tipo de efluentes son: *Chlorella* sp y *Oscillatoria* sp. Cheriaa y colaboradores en el 2009 aislaron a *Chlorella vulgaris* y la cultivaron en diferentes tintes textiles obteniendo alta productividad de biomasa **(Cheriaa et al., 2009; El-Kassas et al., 2014; Fazal et al., 2018)**.

Las microalgas también tienen la capacidad de remover nutrientes inorgánicos como el fósforo y el nitrógeno de las aguas residuales, lo cual es uno de los objetivos principales de los tratamientos terciarios de las aguas residuales. El exceso de nutrientes como el nitrógeno y el fósforo es uno de los problemas más comunes en las fuentes hídricas, ya que estos compuestos pueden causar un fenómeno llamado eutrofización, el cual causa grandes impactos ecológicos, sanitarios y económicos a escala regional. Un ejemplo de estos impactos es la aparición de las denominadas “zonas muertas” presentes en muchos litorales, que han aparecido y se han extendido en las últimas 5 décadas (**Yang et al., 2008**). Las zonas muertas se caracterizan por tener una disminución del oxígeno disuelto (OD), llegando a estados de hipoxia (0-5 mg/L) y anoxia (0 mg/L).

Teniendo en cuenta la efectividad de las microalgas para remover nutrientes inorgánicos, materia orgánica y colorantes en diferentes tipos de aguas residuales no doméstica (ARnD), es importante poder aislar e identificar diferentes especies de microalgas mixotróficas con capacidad para crecer en ARnD pos tratadas y poder determinar las condiciones ideales en reactores para su uso como tratamiento terciario.

3. Planteamiento del problema y justificación

En la Pontificia Universidad Javeriana se utilizan colorantes para la observación de la morfología de los microorganismos, generando de 10 a 15 mL de mezcla de colorantes y aditivos de tintura y microorganismos que contienen concentraciones aproximadamente de 10^5 a 10^6 UFC/mL (**Pedroza et al., 2018**). Los laboratorios de docencia de la Universidad generan aproximadamente 2100 L de vertimiento por semestre, los cuales son entregados a la empresa Ecoentorno, encargada de hacer tratamientos a este tipo de residuos que puedan disminuir su impacto ambiental, sin embargo, esto genera un costo de \$1.550 por kilo. Para establecer si el agua cumple con lo estipulado en la resolución 0631 de 2015 y la resolución 3157 de 2009 de la SDA se debe evaluar valores de parámetros físicos, químicos y

microbiológicos como la demanda química de oxígeno (DQO), demanda biológica de oxígeno (DBO₅), unidades de color (UC), nitratos, fosfatos entre otros.

Actualmente, en la Facultad de Ciencias de la Universidad existe una planta piloto que cuenta con tratamiento primario, secundario, sedimentador y filtros de arena y carbón para este tipo de aguas residuales no domésticas, aunque la planta piloto ha llegado a disminuir la mayoría de los parámetros fisicoquímicos, todavía persisten cargas de materia orgánica, color residual y algunos nutrientes asociados con nitrógeno y fósforo, que podrían ser removidos al implementar una operación unitaria a la planta piloto asociada con el tratamiento con microalgas bajo condiciones mixotróficas.

Teniendo en cuenta lo anterior, con el presente trabajo de grado se aislaron microalgas a partir de las columnas de Winogradsky empleadas en la asignatura de Microbiología Ambiental, con el fin de cultivarlas bajo condiciones mixotróficas y seleccionar las que toleren y crezcan en presencia de agua residual pos tratada en planta. Adicionalmente, se realizó el montaje, operación y monitoreo de la planta piloto de la facultad de ciencias para generar agua residual pos tratada la cual fue utilizada para realizar el diseño experimental *Plackett Burman* con microalgas en donde se seleccionó las condiciones de crecimiento y operación que favorecieron el crecimiento, remoción de DQO y color residual a escala de reactores de 0.75 L.

4. Marco teórico

4.1 Aguas residuales no domésticas derivadas de las tinciones biológicas (ARnD)

Las aguas residuales no domésticas derivadas de las tinciones biológicas (ARnD/TB) provienen en su mayoría de los laboratorios de microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá (Laboratorios 224P, 224G, 233 y 214), estas aguas son generadas a partir de las tinciones que se utilizan para actividades de tinción microbiológica. Estas actividades son ejecutadas por estudiantes de la universidad con el objetivo de observar microorganismos a través del microscopio. Estas tinciones pueden usarse para diferentes procedimientos como son la observación directa de microorganismos o el uso de colorantes

mediante tinción positiva y negativa, que son procesos dirigidos a incrementar el contraste y por consiguiente observar mejor las estructuras celulares (**Ana et al., 2010**).

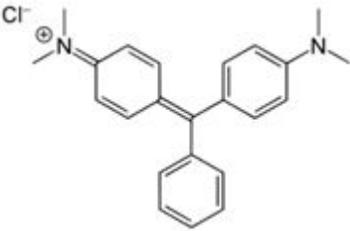
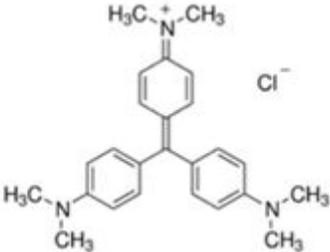
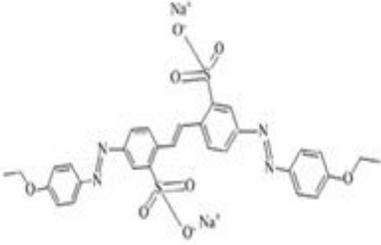
Los colorantes son compuestos químicos que se emplean para realizar tinciones biológicas, son sustancias de origen sintético o natural capaces de unirse y colorear células o sus estructuras internas por afinidad de cargas. Desde el punto de vista químico, los colorantes son compuestos capaces de absorber determinadas longitudes de onda para generar un color característico (**Restrepo Gallego, 2007**). En la Microbiología se utilizan diferentes clases de colorantes como azoicos, trifenil metánicos y antraquinoides. Esto depende si se quiere diferenciar una célula completa o alguna de sus partes como cápsula, esporas, quistes, flagelos, etc (**Morales et al., 2017**).

Estos colorantes o sus intermediarios pueden generar una gran problemática ambiental, debido que son de difícil degradación, algunos intermediarios son más persistentes que el compuesto inicial, representan un riesgo para la salud humana produciendo irritación en la piel, y además por su composición son conocidos como agentes cancerígenos. Adicionalmente, la presencia de estos compuestos en el agua puede generar la inhibición de la fotosíntesis porque no permiten el paso de la luz (**Guldhe et al., 2017; Hongyang et al., 2011**).

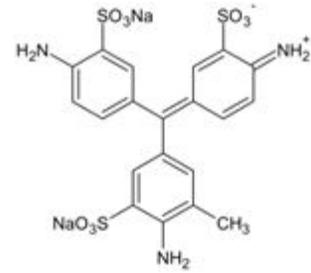
Según la estructura química del grupo cromóforo estos colorantes pueden ser clasificados como: azo (-N=N-), trifenilmetano, heterocíclicos y poliméricos. Dentro de los colorantes trifenilmetánicos empleados en la Universidad se encuentran el verde de malaquita (VM) y el cristal violeta (CV) de origen orgánico, los cuales poseen un grupo cromóforo que tiene un carbono central unido a tres grupos arilos terminales que suelen ser sustituidos por un grupo amino o hidroxilo en el anillo aromático, adicionalmente tienen grupo solubilizante, lo que hace que dichos colorantes sean más resistentes a la degradación (**Morales et al., 2016**); también se utiliza el rojo Congo (RC) un colorante ácido aniónico de tipo azoico que presenta alta estabilidad frente al calor y la luz, puede ser parcialmente metabolizado por microorganismos de forma aerobia y anaerobia. La fucsina de Gram (FG) de tipo

Trifenilmetánico, al igual que los demás colorantes, presenta en su estructura tres anillos de benceno con ramificaciones, lo que dificulta el tratamiento de los mismos. Las estructuras químicas de estos compuestos se pueden observar en la **Tabla 1 (Huan-yan Xu *et al.*, 2010)**.

Tabla 1. Estructura química de los colorantes (Zhuo *et al.*, 2016)

Colorante	Fórmula química	Estructura
Verde malaquita	$C_{23}H_{25}N_2Cl$	
Cristal Violeta	$C_{24}H_{28}N_3Cl$	
Rojo Congo	$C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S$	

Fucsina ácida



Por otro lado, los residuos líquidos provenientes de las coloraciones tienen otros compuestos como los mordientes, que son sustancias que ayudan a fijar el colorante a la célula; en la coloración de Gram, por ejemplo, se utiliza lugol, que es una mezcla de yodo metálico y yoduro de potasio compuestos que pueden provocar irritación en la piel o irritación gástrica si son consumidos por vía oral (**Franklin *et al.*, 2006**). Esta solución en pequeños volúmenes hace parte del residuo líquido. Existe un grupo de compuestos que pueden ser parte del ARG, estos son alcohol, acetona alcohol ácido y aceite de inmersión, estos aditivos incrementan los valores de DQO, DBO₅, grasas y aceites, sólidos disueltos y sólidos totales. Estos parámetros influyen sobre el índice de biodegradabilidad del agua, el cual está dado por la relación DBO₅/DQO, en donde 0.5 y/o >0.5 se considera como un agua en la cual la materia orgánica es de fácil oxidación (**Choi *et al.*, 2017**). Los tratamientos primarios y secundarios están destinados a disminuir estos parámetros, sin embargo, durante estos tratamientos en aguas derivadas de colorantes se producen compuestos intermediarios parcialmente coloreados, materia orgánica residual y nutrientes, los cuales pueden ser eliminados si se realiza un tratamiento terciario de bajo costo y alta eficiencia (**Salama *et al.*, 2017**).

4.2 Impacto ambiental

Las aguas residuales no domésticas derivadas de tinciones biológicas pueden causar varios problemas ambientales, pues estas aguas contienen colorantes y nutrientes como fosfatos y nitratos, y estos nutrientes, cuando llegan a cuerpos de agua, pueden causar un problema ambiental llamado eutrofización (**Chislock *et al.*, 2013**).

La eutrofización es un proceso que sucede cuando un cuerpo de agua se enriquece demasiado con minerales y nutrientes que inducen un crecimiento excesivo de plantas y algas (**Chislock *et al.*, 2013**). Desde un punto de vista ecológico, puede definirse como la suma de los efectos del crecimiento excesivo de fitoplancton (microalgas) que da origen a un desequilibrio en la productividad primaria (organismos autótrofos) y secundaria (organismos heterótrofos) generando un cambio de nivel trófico causado por el enriquecimiento de nutrientes (**Khan *et al.*, 2005**).

La eutrofización es la principal causa de deterioro de la calidad del agua, que puede restringir su uso para pesca, recreación, industrial y de consumo. La eutrofización es un proceso que puede ser irreversible, y se presenta en los ecosistemas acuáticos como respuesta al enriquecimiento de ciertos nutrientes, principalmente Fósforo y Nitrógeno, trayendo consigo el deterioro de la calidad del agua por el incremento abundante en la densidad de las comunidades de fitoplancton, las cuales poseen un periodo de vida corto, por lo que al morir y ser descompuestas por las bacterias aeróbicas provocan la disminución del oxígeno disuelto en el agua, desarrollando condiciones hipóxicas o anóxicas, creando medios letales para el desarrollo óptimo de la flora y fauna (**United Nations Development Program, 1999**).

Por otro lado, los colorantes pueden generar una gran problemática en el tema de contaminación de fuentes hídricas: esto se debe principalmente a que los colorantes trifenilmetánicos tienen un grupo cromóforo, que está constituido por un carbono central (grupo metino) unido a tres grupos arilo terminales, que pueden estar sustituidos por los grupos funcionales amino o hidroxilo en la posición -para del anillo aromático; adicionalmente, la afinidad de estos colorantes por diversos solventes se debe al grupo solubilizador, que, en el caso del cristal violeta es el ion Cl^- y en verde malaquita el ion oxalato (C_2O_4). Para el caso de los colorantes azoicos, el colorante auxócromo (de anclaje) suele ser el grupo básico $-\text{NH}_2$, el grupo ácido, ácido sulfónico o ambos.

Las características químicas mencionadas en el párrafo anterior determinan que los trifenilmetánicos sean más resistentes a la degradación biológica que otras familias de colorantes y como subproductos de la biodegradación se pueden formar intermediarios con mayor toxicidad que el compuesto inicial. Por ejemplo, el VM y el CV, por ser colorantes catiónicos interactuarán con la membrana celular (carga negativa) y se acumularán por largos periodos de tiempo, generando irritación en la piel, daño hepático, renal y se ha asociado con la formación de tumores en peces (**Diaz et al 2001; Forgacs et al 2004; Pathak et al 2015**). Por otra parte, es muy importante mencionar que los efluentes coloreados poseen una alta capacidad de bioacumulación, y una baja velocidad de despolimerización, permitiendo que a largo plazo se acumule en lugares como lagos y bahías, lo cual provoca una disminución del poder absorbente del agua y por ende una disminución en la actividad fotosintética de los organismos presentes en dichos ecosistemas, disminuyendo el oxígeno disuelto en el agua (**Khan et al., 2005**). Adicionalmente, estos colorantes representan un riesgo para la salud humana produciendo irritación en la piel, y además por su composición son conocidos como agentes cancerígenos (**Morales et al., 2016**).

4.3 Normatividad Colombiana para vertimientos resolución 0631 y 3957

En Colombia se tienen dos resoluciones sobre aguas residuales que se encuentran en vigencia con el objetivo de controlar y vigilar los vertimientos puntuales al alcantarillado que deben tenerse en cuenta en el momento de realizar descargas a algún cuerpo hídrico o al sistema de alcantarillado por parte de las diferentes empresas, industrias, universidades etc. En estas dos resoluciones se establecen los parámetros y los valores mínimos aceptados para el vertimiento.

La resolución 0631 fue emitida por el ministro de ambiente y desarrollo en el año 2015, y en esta se establecen los parámetros que se deben tener en cuenta, y los límites máximos permitidos para poder realizar el vertimiento en aguas superficiales y en alcantarillados.

Esta resolución es de cobertura nacional y presenta valores específicos según el sector de la industria del que provenga el agua que va a ser vertida, como lo es el sector de ganadería, de minería o de alimentos. El agua proveniente de los laboratorios está asociada al capítulo VII de la resolución, clasificada como agua residual no doméstica, ya que en la resolución no hay una especificación para el agua de docencia e investigación. En la **Tabla 2** se encuentran los valores estipulados.

Tabla 2. Valores de referencia vertimientos según la Resolución 3957 de 2009 de la SDA y la Resolución 0631 de 2015 del Ministerio de Ambiente y desarrollo.

Parámetros	Unidades	Resolución 0631 valor máximo permitido	Resolución 3957 valor máximo permitido
pH		6.0-9.0	5,0-9,0
Color	UC	NA	1000
Grasas y aceites	mg/L	10	100
Sólidos sedimentables	ml/L	<1	2
Sólidos suspendidos totales	mg/L	<50	600
DQO	mg/L	<150	1500
DBO ₅	mg/L	<50	800
Temperatura	°C	30	30

Tensoactivos	mg/L	10	10
Conductividad	ms/cm	ND	ND
Nitratos (N-NO ₃)	mg/L	Análisis y reporte	Análisis y reporte
Nitritos (N-NO ₂)	mg/L	Análisis y reporte	Análisis y reporte
Amoniac (N-NH ₃)	mg/L	Análisis y reporte	Análisis y reporte
Nitrógeno total (N)	mg/L	Análisis y reporte	Análisis y reporte
Fósforo total (P)	mg/L	Análisis y reporte	Análisis y reporte
Ortofosfatos (PO ₄ ³⁻)	mg/L	Análisis y reporte	Análisis y reporte

Para dar cumplimiento a la normatividad vigente en Colombia se deben implementar tecnologías que buscan que el agua residual cumpla con los valores mínimos estipulados en ella, el uso de tratamientos biológicos secundarios y terciarios presentan una buena posibilidad.

4.4 Tratamiento terciario de aguas residuales como sustrato para el cultivo mixotrófico de microalgas

Las algas son organismos que tienen variabilidad en sus características, estas pueden ser unicelulares o multicelulares, adicionalmente son eucariotas o procariotas. Los que son del dominio procariota son las conocidas como cianobacterias que incluyen los géneros (*Arthrospira* sp, *Anabaena* sp y *Synechocystis* sp), mientras que los del dominio eucariota y unicelulares son las microalgas incluyen *Chlorella* sp, *Dunaliella* sp, *Chlamydomonas* sp y la clase de las diatomeas (*Bacillariophyceae*), existen aproximadamente 50,000 especies de microalgas presentes en la tierra y tienen una alta capacidad de adaptación a diversas condiciones ambientales (Han Xu *et al.*, 2006).

La primera vez que se aplicó las microalgas para tratamiento de agua fue aproximadamente hace 75 años. El tratamiento biológico con microalgas tiene ventajas como es la capacidad de convertir energía solar en biomasa y la utilización de nutrientes como el fósforo y el nitrógeno para su alimentación, estos nutrientes cuando están en exceso en ecosistemas acuáticos pueden causar eutrofización (**Bhambulkar & Shinkar, 2013**). La remoción de nutrientes es una de las principales aplicaciones del tratamiento de agua residual con microalgas, estos microorganismos asimilan estos nutrientes para su crecimiento, el potencial de remoción depende del phylum utilizado. Uno de los phylum más grandes es *Chlorophyte*, con una gran variedad de especies y distribuido ampliamente por el mundo en diferentes ecosistemas.

Los procesos normales de tratamiento primario y secundario de aguas residuales no domésticas textiles se han introducido en un número creciente de lugares, con el fin de eliminar los materiales fácilmente sedimentables y oxidar el material orgánico presente en estas aguas. El resultado final es un efluente tratado o depurado que se puede descargar en cuerpos de agua naturales. Sin embargo, este efluente secundario posee nitrógeno inorgánico, fósforo, metales pesados y compuestos orgánicos refractarios los cuales pueden causar problemas ambientales como la eutrofización, por lo que es necesario un tratamiento adicional previo a su descarga en los cuerpos de agua (**Abdel-Raouf et al., 2012**).

El proceso de tratamiento terciario tiene como objetivo reducir los iones inorgánicos, compuestos orgánicos, DQO y DBO₅ que no han sido eliminados en los tratamientos primarios y secundarios, se puede lograr biológica o químicamente (**Matamoros et al., 2015; Qin et al., 2016**). El proceso de tratamiento biológico terciario parece funcionar bien en comparación con los procesos químicos que, en general, son demasiado costosos para implementarse en la mayoría de los lugares y que pueden conducir a una contaminación secundaria (**Bhambulkar et al., 2013**).

El cultivo de microalgas proporciona un tratamiento terciario junto con la producción de biomasa potencialmente valiosa, que puede usarse para varios propósitos. Los cultivos de microalgas ofrecen una solución sustentable para los tratamientos terciarios y secundarios debido a la capacidad de las microalgas para usar carbono orgánico/inorgánico, nitrógeno inorgánico y fósforo para su crecimiento. También, pueden eliminar metales pesados, así como algunos compuestos orgánicos tóxicos como los colorantes los cuales los usan como fuente de carbono (**Bibi R et al., 2016; Khandare et al., 2015; Solís et al., 2012**).

Las microalgas se pueden cultivar en aguas residuales textiles con o sin tratamiento previo, que usan tintes y nutrientes para su crecimiento parecidas a las aguas derivadas de las tintaciones biológicas. La biorremediación con microalgas de estas aguas puede ocurrir de dos diferentes maneras, bioconversión o proceso de bioacumulación y proceso de biosorción (**Solís et al., 2012**). Durante el proceso de bioconversión, microalgas consumen tintes como fuente de carbono y los convierten en metabolitos. Sin embargo, las microalgas también funcionan como biosorbentes donde los tintes se pueden adsorber a su superficie. Ambos fenómenos pueden ocurrir simultáneamente para la biorremediación de aguas residuales coloreadas (**Fazal et al., 2018**).

El mecanismo de acumulación de microalgas implica degradación enzimática, adsorción o ambos (**Solís et al., 2012**). Además, las microalgas muertas y vivientes también participan en estos fenómenos (**Khandare et al., 2015**). Sin embargo, las microalgas muertas solo pueden participar absorbiendo colorantes (**Aravindhhan et al., 2007**). Las algas dan como resultado una alta capacidad de adsorción debido a su gran área superficial y fuerte afinidad de unión hacia azo colorantes (**Pathak et al., 2015**).

Especies de microalgas como *Chlorella vulagris*, *Chlorella pyrenoidosa* y *Oscillatoria tenuis* degradan los colorantes azoicos en aromáticos simples y aminas, y decoloran las aguas residuales donde se encuentra el colorante (**Forgacs et al., 2004**), esta degradación la pueden hacer mediante dos tipos de enzimas, las azoreductasas y las oxidasas (**Solís et al.,**

2012). El mecanismo de acción por el cual las reductasas degradan los colorantes azoicos a sus correspondientes aminas se inicia por la escisión del enlace azo con la ayuda de una azorreductasa y la posterior transferencia de electrones por un mediador redox como naftoquinonas, ácidos húmicos y FAD, que actúan como lanzadera de electrones entre el colorante fuera de la célula y la reductasa intracelular (**Solís *et al.*, 2012**). Las lanzaderas de electrones reducidas pueden transferir electrones a varios compuestos distintos deficientes en electrones, como es el caso de los colorantes azoicos (**Wesenberg *et al.*, 2003**). Este proceso de reducción llega hasta la mineralización de estos colorantes, sin embargo, también se producen intermediarios que pueden actuar como mediadores, estimulando la decoloración y la generación de bioelectricidad (**Solís *et al.*, 2012**). Las azorreductasas catalizan esta reacción solo en presencia de equivalentes reductores, por ejemplo, FADH, NADH y NADPH (**Van der Zee & Cervantes, 2009**).

En el caso de la degradación oxidativa de los colorantes azoicos esta es realizada por las peroxidasas y feniloxidasas. Las lacasas (EC 1.10.3.2) son una de las feniloxidasas que está presente en las algas (**Otto & Schlosser, 2014**), estas tienen una capacidad de oxidación no específica y el uso de oxígeno fácilmente disponible como aceptor de electrones, lo que les permite degradar compuestos de difícil degradación como los colorantes (**Durán & Esposito, 2000**).

En el año 2009 Cheriaa y colaboradores aislaron una microalga del género *Chlorella* sp y la cultivaron en diferentes colorantes textiles, esta alga logró decolorar diversos tintes, como el índigo (89,3 %), azul metileno (DB = 79 %), naranja remazol brillante (RBO = 75.3 %) y cristal violeta (72,5 %) (**Cheria *et al.*, 2009**). Adicionalmente a la reducción del color, El-Kassas y Mohammad en el año 2014 cultivaron a *Chlorella vulgaris* en aguas residuales textiles, y observaron que podía reducir la DQO hasta un 70 % (**El-Kassas *et al.*, 2014**).

Las microalgas también pueden llevar a cabo la bioadsorción de los contaminantes del agua residual coloreada. Por ejemplo, *Spirulina platensis* se usó como biosorbente para eliminar

rojo reactivo 120 (RR-120) de una solución acuosa. Esta alga logró la capacidad de biosorción máxima, eliminando aproximadamente el 97 % del colorante de la solución (**Cardoso *et al.*, 2012**). La capacidad de bioadsorción por parte de un alga se atribuye al heteropolisacárido y a los componentes lipídicos de la pared celular, que contienen diferentes grupos funcionales, incluyendo amino, carboxilo, hidroxilo, fosfato y otros grupos cargados, causando fuertes fuerzas atractivas entre el colorante y la pared celular. La efectividad de este mecanismo depende de las siguientes condiciones: pH, temperatura, fuerza iónica, tiempo de contacto, tipo de microorganismo y concentración y estructura del colorante (**Solís *et al.*, 2012**).

4.4.1 Mecanismos de remoción de nutrientes

El mecanismo por el cual las microalgas pueden remover el fósforo y el nitrógeno del agua es la biotransformación, mediante el cual, en el caso del nitrógeno, transforman las formas inorgánicas a su fórmula orgánica (aminoácidos) en un proceso llamado reducción asimilativa (**Fernandez & Galvan, 2008**).

En las algas, la asimilación de nitrato se realiza mediante dos etapas de transporte y dos de reducción: primero, el nitrato se transporta a la célula, luego la enzima nitrato reductasa (EC 1.7.99.4) (NR) citosólica cataliza la reducción de nitrato a nitrito, que posteriormente se transporta al cloroplasto, donde se produce la enzima nitrito reductasa (NiR) (EC 1.7.99.3) que cataliza su reducción a amonio (**Sanz-Luque *et al.*, 2015**). La enzima NR tiene una estructura homodimérica, con tres grupos protésicos: FAD, hemo b557, y cofactor de molibdeno (Moco), por lo que el molibdeno es un micronutriente esencial para la asimilación de nitratos (**Fernandez & Galvan, 2008**).

Finalmente, el amonio se incorpora a los esqueletos de carbono al convertirse en glutamato, a través del ciclo glutamina sintetasa / glutamina oxoglutarato aminotransferasa o glutamato sintasa (GS / GOGAT) (**Laliberté *et al.*, 1997**). Primero, el amonio se incorpora como el grupo amida de glutamina en una reacción que involucra glutamato y ATP

(catalizado por GS); luego, el grupo amida se transfiere reductivamente a α -oxoglutarato para formar dos moléculas de glutamato.

La **Figura 1** resume la organización de las enzimas / proteínas para la asimilación de nitratos en las algas. La asimilación del nitrato comienza con su entrada en la célula. El transporte de nitrato y nitrito a la célula es un proceso regulado y complejo en las algas, como lo sugiere el alto número y los tipos de proteínas que participan (**Sanz-Luque *et al.*, 2015**).

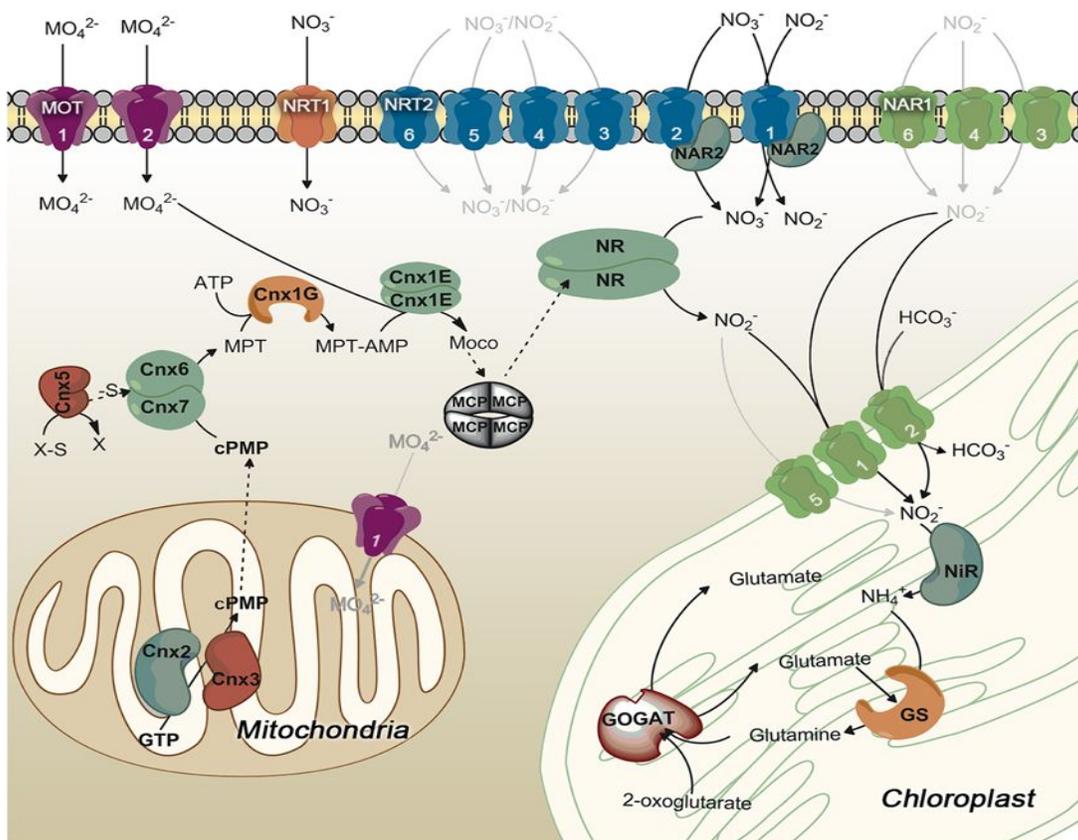


Figura 1. Esquema general de proteínas involucradas en la asimilación de nitrato. Las proteínas que median estos pasos hipotéticos están representadas en la localización más probable, fuente: (**Sanz-Luque *et al.*, 2015**).

La regulación de la adquisición de nitratos es un proceso complejo que involucra una red de proteínas, muchas de ellas poco conocidas. En general, el nitrato y el amonio tienen efectos opuestos sobre los genes de asimilación del nitrato, que se conocen como señales positivas (nitrato) y negativas (amonio). El amonio es la fuente de N preferida debido a su estado reducido y su asimilación energéticamente favorable. Está bien establecido que el amonio tiene un efecto negativo sobre la asimilación de nitratos en los niveles transcripcional y postranscripcional en *Chlamydomonas* sp (**Fernandez & Galvan, 2008**), especialmente en condiciones de alto CO₂.

La expresión del gen que expresa la enzima NR (NIA1), ha sido ampliamente estudiado en muchas especies de algas, se induce en medio con nitratos y está fuertemente reprimida en medio con amonio (**Loppes et al., 1999**). También los transportadores de nitrato se expresan después del agotamiento de amonio en *Micromonas* (**McDonald et al., 2010**). En las microalgas, cuando ambas señales positivas y negativas están presentes juntas, la represión aparece como un proceso cuantitativo que no es estrictamente sensible a la concentración de amonio sino al balance de nitrato / amonio (N / A) (**Llamas et al., 2002**). Una concentración de amonio determinada es menos represiva en condiciones de alto contenido de nitrato (mM) que en bajo contenido de nitrato (μM). Sin embargo, en un medio sin amonio, el gen NIA1 es inducido de manera similar por concentraciones bajas y altas de nitrato. Este patrón indica que es una regulación mediada por el balance N / A.

En lo que se refiere al metabolismo del fósforo, al igual que con el nitrógeno se da un proceso de asimilación donde las formas inorgánicas HPO₄²⁻ / H₂PO₄⁻¹ (orto fosfatos) se combinan para formar compuestos orgánicos durante la fosforilación, dentro de la cual se incluye la producción de ATP de difosfato de adenosina (ADP). Ciertas especies de microalgas utilizan fósforo orgánico proveniente de ésteres para su crecimiento (**Salama et al., 2017**).

Los fosfatos orgánicos pueden ser convertidos a ortofosfatos por fosfatasas en la superficie celular proceso llamado mineralización, y esto ocurre especialmente cuando los

ortofosfatos son escasos (**Lehninger, 2004**). Además, las microalgas son capaces de asimilar el fósforo en exceso, que se almacena dentro de las células en forma de gránulos de polifosfato (volutina), este proceso en el cual las algas incorporan los ortofosfatos a sus estructuras celulares se le llama inmovilización. Estas reservas pueden ser suficientes para un crecimiento prolongado en ausencia de fósforo disponible (**Delgadillo-Mirquez *et al.*, 2016**).

4.5 Algas eucariotas

Las clorofitas o algas verdes son un grupo (División) importante de microalgas, que deben su color verde a la clorofila (sobre todo clorofila a y b), carotenoides y xantofilas presentes en su estructura (**Lewis & McCourt, 2004**). La clase más destacada de clorofitas son las clorofíceas, entre las que a su vez destacan las órdenes de las volvocales (organismos de agua dulce provistos de flagelos) y las clorococales (microorganismos desprovistos de flagelos (**WEHR, 2007**)).

Las crisofitas o algas doradas deben su color al enmascaramiento de la clorofila por parte del alto contenido en carotenos. Las diatomeas son una clase de algas que presentan una estructura silíceas, pertenecen a este grupo (**Kale & Karthick, 2015**).

4.6 Función fotosintética.

La fotosíntesis es un proceso llevado a cabo por organismos fotoautótrofos como es el caso de todas las algas sin excepción, estas tienen la capacidad de sintetizar materia orgánica partiendo de la energía del Sol y la materia inorgánica (**Urria *et al.*, 2009**). La fotosíntesis tiene dos fases una llamada luminosa que se realiza en la membrana tilacoide del cloroplasto y la oscura que tiene lugar en el estroma del cloroplasto, la **figura 2** muestra un esquema de las reacciones más importantes que se dan en la fase luminosa y oscura de la fotosíntesis.

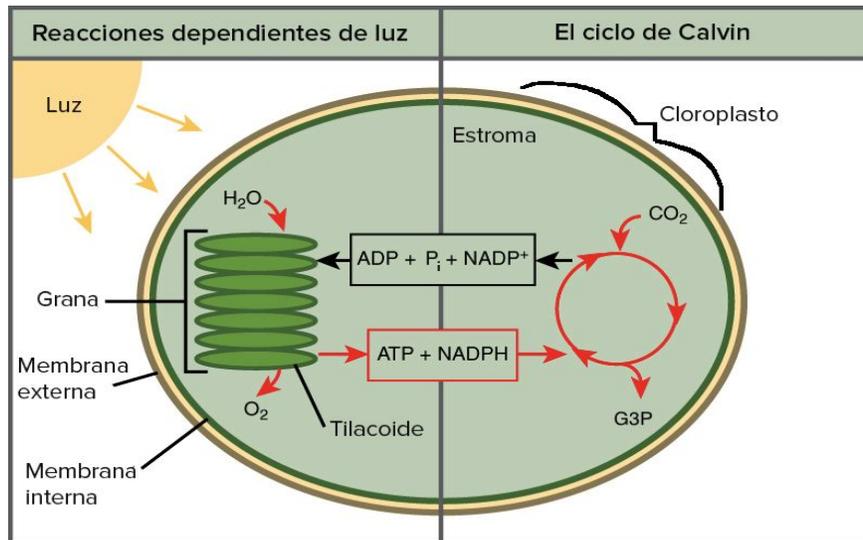


Figura 2. La fotosíntesis tiene lugar en dos etapas: reacciones dependientes de la luz y el ciclo de Calvin. Las reacciones dependientes de la luz, que tienen lugar en la membrana tilacoide, usan energía de la luz para producir ATP y NADPH. El ciclo de Calvin, que tiene lugar en el estroma, utiliza la energía derivada de estos compuestos para producir G3P a partir del CO_2 . Fuente: (Masojídek *et al.*, 2013).

La energía de la luz (fotones) es utilizada en la fase luminosa de la fotosíntesis para producir ATP, oxígeno y NADPH, a partir de la disociación de moléculas de agua, formando oxígeno e hidrógeno (Urria *et al.*, 2009).

El ciclo de Calvin inicia con la etapa de fijación del CO_2 a una molécula orgánica, se da por la acción de una enzima llamada RuBisCO, la cual cataliza la reacción donde una molécula de CO_2 se une a una cadena hidrocarbonada de la ribulosa-1,5-bisfosfato una pentosa activada energéticamente por la fosforilación de los dos carbonos situados en los extremos de la cadena (Masojídek *et al.*, 2013). A través de un estado de transición de seis carbonos, se forman dos moléculas de ácido 3-fosfoglicérico, en la **ecuación 1** se muestra la reacción.

Ecuación 1.



Una vez fijado el CO₂, el NADPH y el ATP producidos en la fase luminosa intervendrán en la reducción del ácido 3-fosfoglicérico a gliceraldehido 3-fosfato o 3GP que es el punto de partida para la formación de otros hidratos de carbono.

En la **ecuación 2** se muestra la reacción estequiométrica del proceso fotosintético total teniendo en cuenta la fase luminosa y oscura en el que se libera oxígeno molecular.

Ecuación 2.



En la actualidad se denomina a este proceso fotosíntesis oxigénica, y se diferencia de la fotosíntesis anoxigénica o bacteriana, llevada a cabo por las bacterias purpúreas y verdes del azufre (**Masojídek *et al.*, 2013**). La fotosíntesis oxigénica tiene lugar en los cloroplastos, unos orgánulos citoplasmáticos de color verde exclusivos de las células que realizan fotosíntesis oxigénica. Dentro de la membrana plastidial interna se encuentra el estroma, una cavidad interna del cloroplasto donde tienen lugar las reacciones oscuras del ciclo de Calvin. El estroma alberga componentes necesarios para la fotosíntesis, como enzima RuBisCO (**Urría *et al.*, 2009**).

Por su parte, los pigmentos fotosintéticos se encuentran en la membrana de los tilacoides, unos sacos que son también llamados lamelas. El pigmento que absorbe la luz solar es la Clorofila.

La clorofila a es el pigmento involucrado directamente en la transformación de la energía lumínica en energía química, la poseen todos los organismos fotosintetizos. Absorbe en la región del rojo (650-700 nm) y azul (400-500 nm). Las células fotosintéticas casi siempre contienen un segundo tipo de clorofila, la clorofila b, con un espectro de absorción ligeramente diferente, la estructura de la clorofila a se puede observar en la **Figura 4**.

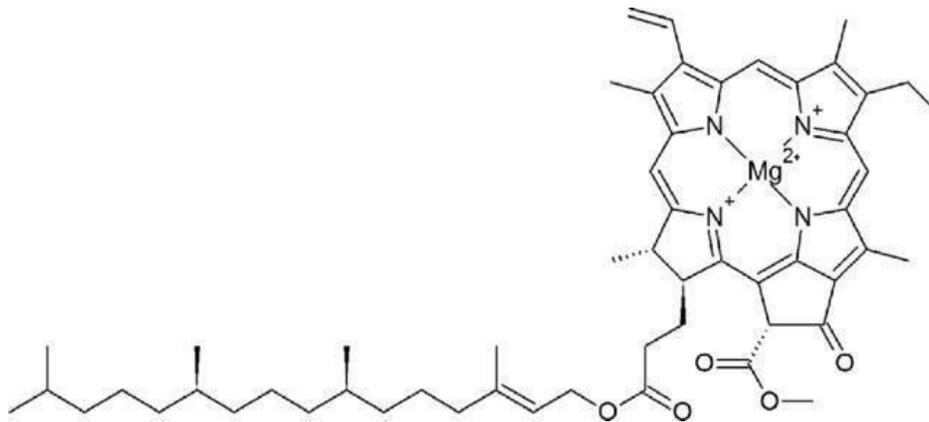


Figura 3. Estructura de la clorofila a. **Fuente:** (Patty *et al.*, 2017)

4.7 Cultivo de microalgas bajo mixotrofia

El cultivo mixotrófico es el modo de crecimiento donde las microalgas utilizan simultáneamente CO₂ y compuestos orgánicos como fuentes de carbono bajo la presencia de luz (Larkum *et al.*, 2003); por lo tanto, foto-autotrofia y la heterotrofia se producen simultáneamente (Kroth, 2015). El CO₂ es fijado a través de la fotosíntesis, que es influenciada por la iluminación, mientras que los compuestos orgánicos se asimilan a través de la respiración aeróbica, que se ve afectada por la disponibilidad de carbono orgánico.

Las algas utilizan el CO₂ del aire durante el ciclo de Calvin, el cual también es conocido como la fase oscura de la fotosíntesis donde este compuesto es fijado por la enzima RuBisCO mecanismo que ya fue explicado previamente. La asimilación del carbono proveniente de los compuestos orgánicos requiere primero del uso de enzimas extracelulares hidrolíticas y oxidativas, las cuales degradan la materia orgánica recalcitrante, produciendo moléculas que pueden ser transportadas a través de la membrana celular para su posterior utilización en el metabolismo central del carbono dentro de la célula (**Rier et al., 2007**). El objetivo de estas enzimas extracelulares no es mineralizar los compuestos sino convertir los compuestos recalcitrantes del agua residual en intermediarios más pequeños que sean más biodegradable por procesos biológicos. En el caso de los intermediarios producidos a partir de colorantes están: Aminas aromáticas, anhídridos de ácidos, oligómeros, monómeros y alcoholes (**Solís et al., 2012**)

Ejemplo de estas enzimas son la beta glucosidasa (GLU) que hidroliza polisacáridos y la fenol oxidasa (POA) que oxida compuestos polifenólicos. Uno de los compuestos derivados de la degradación por las enzimas extracelulares son los monosacáridos como la glucosa (**Rier et al., 2007**). La asimilación oxidativa de la glucosa comienza con la fosforilación de la hexosa, produciendo glucosa-6-fosfato, que está fácilmente disponible para almacenamiento, síntesis celular y respiración (**Hogg et al., 2013**). De las diversas vías utilizadas por los microorganismos para la glucólisis aeróbica., aparentemente solo dos, la vía de Embden-Meyerhof (Vía EM) y la vía Fosfato de Pentosa (vía PP) han sido encontrado en algas (**Zappi, 2015**). Bajo completa oscuridad en el crecimiento heterotrófico, la glucosa se metaboliza principalmente a través de la vía PP, mientras que la EM es la vía es el principal proceso glicolítico de las células en crecimiento mixotrófico con luz. (**Zappi, 2015**). Ambas vías se llevan a cabo en el citosol en las microalgas y se pueden realizar simultáneamente en los organismos mixótrofos, la **Figura 5** resume las rutas más activas en los diferentes modos de crecimiento.

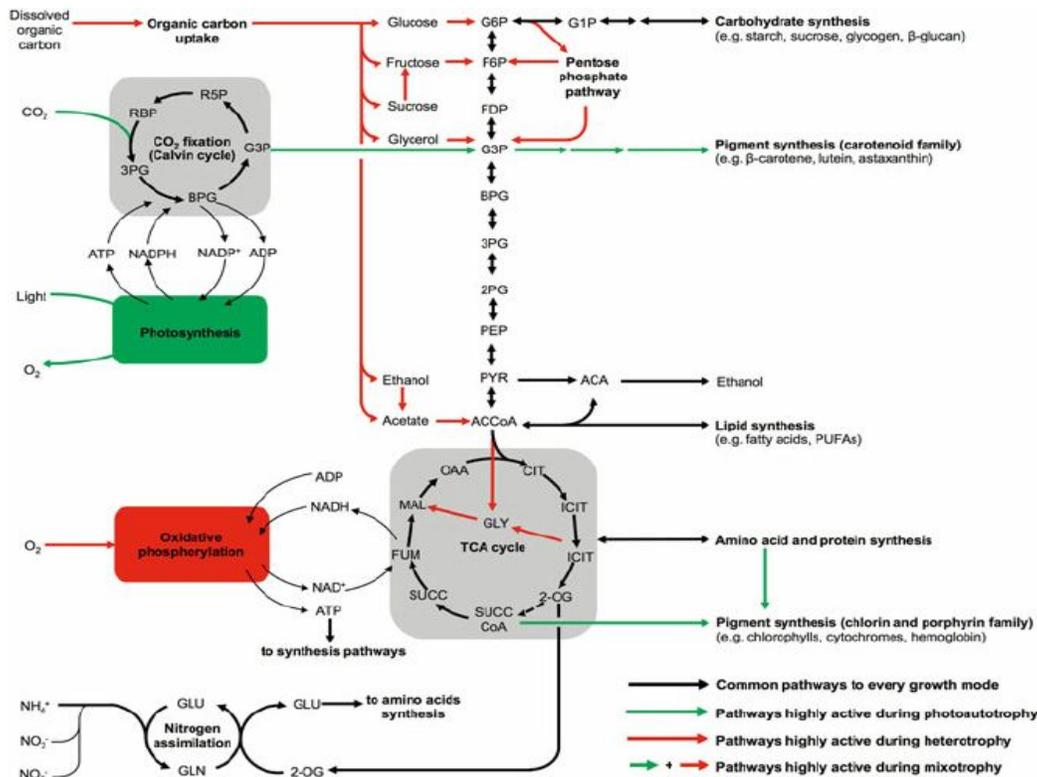


Figura 4. Esquema de vías metabólicas para la asimilación de carbono y producción de energía en microalgas fotoautotróficas, heterótrofas y mixotróficas. Las flechas negras indican las rutas comunes en todos los modos de crecimiento, las flechas verdes indican las rutas más activas en el crecimiento fotoautotrófico, las rojas las rutas más activas en crecimiento heterotrófico y las rojas y verdes indican las rutas más activas en el crecimiento mixotrófico. Fuente: (Zappi, 2015)

El cultivo mixotrófico de algas requiere un suministro de carbono orgánico que se puede proporcionar a partir de productos químicos, como la glucosa o acetato, hortalizas,

desechos industriales de leche y alimentos, materiales lignocelulósicos y aguas residuales (Zappi, 2015).

La mixotrofia hace que las microalgas sean más flexibles porque puede acumular carbono y pueden suplir la demanda de energía con fuentes orgánicas o inorgánicas de carbono y con la energía proveniente de la luz todo esto simultáneamente (T. Li *et al.*, 2014). Entre las ventajas principales que ofrece el cultivo mixotrófico están: Velocidad de crecimiento entre 4 y 7 veces más altas que los regímenes heterotróficos y fotoautótrofos acortando los ciclos de crecimiento y produciendo mayor biomasa, fase de crecimiento exponencial prolongado y flexibilidad para cambiar el régimen de cultivo a heterotrófico o regímenes foto-autótrofos a voluntad (Y. R. Li *et al.*, 2014).

4.8 Factores físicos, químicos y biológicos que afectan el crecimiento mixotrófico

El cultivo de microalgas mixotróficas depende de varios factores, que incluyen especies de microalgas, tipo de reactor utilizado / cultivo métodos, luz pH, temperatura, fuente de carbono, relación N: F y iones metálicos.

4.8.1 Luz

Los organismos fotosintéticos como las microalgas sólo emplean la fracción del espectro de luz solar que es fotosintéticamente visible, es decir entre 350 y 700 nm (Kim *et al.*, 2013). Esta fracción fotosintéticamente activa supone un 40 % de la radiación total del Sol. La mayor parte de los ecosistemas naturales vegetales presentan una eficiencia de conversión de energía lumínica a biomasa de alrededor del 1 %, en el caso de las microalgas, estas eficiencias de conversión luz-biomasa se encuentran en un rango entre 1 y 4 % en sistemas abiertos y aún mayores en fotobiorreactores cerrados (Stephens *et al.*, 2010).

La intensidad de la luz afecta la síntesis de clorofila y el crecimiento de microalgas debido a que de esta depende el desarrollo de los cloroplastos y la expresión génica de enzimas

claves relacionadas a rutas metabólicas esenciales para el crecimiento como el ciclo de Calvin (Su *et al.*, 2014).

En el cultivo de mixotrofia es muy importante optimizar el equilibrio de las actividades metabólicas heterotróficas y fotoautótrofas. Una baja cantidad de luz causara un baja en la actividad fotosintética y consigo una baja en la velocidad de crecimiento, por otro lado una alta concentración de luz puede causar daños fotooxidativos especialmente en reactores cerrados ya que la mientras mayor periodos de luz exista mayor será el oxígeno producido en la fotosíntesis el cual, si no es liberado puede llegar a alcanzar a tener niveles tóxicos para las algas adicionalmente una alta tasa de fotosíntesis puede inhibir la asimilación de carbono orgánico afectando el balance entre las formas reducidas y oxidadas de las moléculas portadoras de energía (ATP y NADH) (Zappi, 2015).

El régimen del ciclo luz oscuridad es una de las estrategias para realizar este propósito. En el período de luz, las microalgas realizan fotoreducción del ADP y NADP absorbiendo la energía de la luz y almacenándola en moléculas portadoras de energía como ATP y NADPH (Morsy, 2011).

En el período oscuro, el dióxido de carbono es fijado a través de Ciclo de Calvin usando ATP y NADPH de la fotoreducción y las microalgas se estimulan al óxidar compuestos orgánicos por heterotrofia para obtener energía (Ogbonna *et al.*, 2000) .El rango de ciclos de luz:oscuridad que normalmente se utilizan para crecimiento mixotrófico son 16:8 como mínimo y 24:0 máximo (FAO, 2010). En un estudio realizado por Dounghpen y colaboradores se determinó que para la microalga *Scenedesmus sp.*, la mayor producción de biomasa se obtuvo de ciclos de luz: oscuridad de 16:8 horas (Dounghpen *et al.*, 2014). En otros experimentos este ciclo de luz oscuridad (16:8 horas) también fue determinado como el más efectivo para producción de biomasa de *Chlorella sp* creciendo mixotroficamente (Sharma *et al.*, 2016). Por otro lado, en experimentos realizados en el 2013 por Alkhamis y Qin mostraron que el crecimiento de *Isochrysis galbana* y *Chlorella sp.* se vio

significativamente afectado por el fotoperiodo, el peso seco máximo se obtuvo a las 12 h de luz y 12 h de oscuridad para ambas cepas (**Alkhamis & Qin, 2013**).

Con respecto a la intensidad de luz que se utiliza en los biorreactores, ésta juega un papel muy importante ya que esta tiene una influencia en el crecimiento y la síntesis de clorofila como se mencionó anteriormente, la intensidad de luz depende de la profundidad y densidad del cultivo: a mayores profundidades y concentraciones celulares se debe aumentar la intensidad de luz para penetrar a través del cultivo (Por ejemplo, 1,000 lx es adecuado para matraces Erlenmeyer, para volúmenes de entre 1000 y 4000 L el rango de intensidad de luz es entre 1000 y 10000 lx dependiendo de la profundidad y densidad del cultivo como se mencionó anteriormente (**FAO, 2010**). La luz puede ser natural o ser suministrada por tubos fluorescentes con una longitud de onda entre 400 y 700 nm, para microalgas clorofilas la longitud de onda ideal es entre los rangos de 450-475 y 630-675 nm ya que la clorofila absorbe la energía luminosa a esa longitud de onda (**T. H. Kim et al., 2013**). Una intensidad de luz demasiado alta (por ejemplo, luz solar directa, un recipiente pequeño cerca de la luz artificial) puede provocar la inhibición de la fotosíntesis. Además, se debe evitar el sobrecalentamiento debido a la iluminación natural y artificial. Deben preferirse los tubos fluorescentes que emiten en el espectro de luz azul o roja ya que son las partes más activas del espectro de luz para la fotosíntesis (**FAO, 2010**). En el año 2018 Babaei y Shayegan cultivaron mixotroficamente a *Chlorella vulgaris* dentro de un fotobiorreactor de 1.5L, para el cual utilizaron una intensidad de luz de 2000 lx (**Babaei & Shayegan, 2018**).

Un parámetro importante en el diseño de un fotobiorreactor es la distancia de penetración de la luz, que depende de la intensidad de la radiación incidente, la dispersión de la luz en la superficie del reactor y la atenuación en el medio de cultivo. La dispersión en la superficie debe ser minimizada para maximizar la luz que entra al reactor, y la atenuación depende de la densidad del cultivo y de la longitud de onda de la radiación, provocando un gradiente de intensidad de luz en su dirección de penetración (**Stephens et al., 2010**).

4.8.2 Fuente de carbono

La concentración y el tipo de fuente de carbono en gran medida va a afectar la producción de biomasa y lípidos. Debido a que tanto la utilización de CO₂ como la utilización de carbono orgánico existen bajo condiciones mixotróficas, el CO₂ y la necesidad de suministro de compuestos orgánicos debe estar finamente optimizado para lograr las mejores productividades en el cultivo mixotrófico. La proporción C/N en la que crecen rápidamente las algas es de 6:1 (**Y. R. Li *et al.*, 2014**). Sin embargo, en experimentos realizados por Silaban y colaboradores la proporción que obtuvo más productividad de biomasa en un cultivo mixotrófico fue de 15:1 utilizando como fuente de carbono glucosa (**Silaban *et al.*, 2014**).

El CO₂ es un importante factor limitante para el crecimiento de algas y su exceso aumenta fuertemente la productividad fotosintética en un rango apropiado (**Barea & Cárdenas, 1975**). Bajo cultivo mixotrófico, las microalgas pueden usar una fuente de carbono inorgánico para la fotosíntesis. La influencia del CO₂ exógeno en el cultivo mixotrófico de *Auxenochlorella protothecoides* fue estudiado y mostró que el vertido de CO₂ promueve la producción de biomasa después de 5 días (**Hu *et al.*, 2012**).

La fuente de carbono orgánico también tiene una influencia importante en crecimiento de microalgas en condiciones de cultivo mixotrófico, y la influencia varía entre los tipos de carbono orgánico, entre concentraciones de carbono orgánico, e incluso entre diferentes especies de microalgas con la misma fuente de carbono. Entre las fuentes de carbono orgánico (como glucosa, xilosa, ramosa, fructosa, sacarosa y galactosa), la glucosa puede ser la fuente de carbono más efectiva para microalgas (**Gim *et al.*, 2014**). Comparando la glucosa con otras fuentes de carbono las otras fuentes necesitan una inter conversión más complicada para proporcionar energía las algas para su crecimiento, así como para la producción de bioenergía, el metabolismo de la glucosa en las algas fue descrito en apartados anteriores.

4.8.3 Temperatura

Las microalgas tienen la capacidad de crecer en un amplio rango de temperaturas, como por ejemplo *Chlorella* que puede crecer entre 5 y 42 °C, aunque todas las microalgas presentan un rango ideal para el crecimiento y uno en el que son inhibidas o pueden llegar a morir.

La temperatura afecta el crecimiento y la acumulación de lípidos de microalgas en cultivo mixotrófico. La densidad celular aumenta por debajo de la temperatura óptima, pero disminuye drásticamente cuando hay un cambio repentino o aumento de la temperatura (**Juneja *et al.*, 2013**). Venkata Subhash y Rohit cultivaron microalgas con aguas residuales domésticas en mixotrofia y la densidad celular máxima se observó con una temperatura de 30 °C seguido de 25 °C y 35 °C (**Venkata Subhash *et al.*, 2014**).

4.8.4 Iones metálicos

La síntesis de pigmentos y ácidos grasos es un proceso de reacción enzimática catalítica compleja que necesita algunos iones metálicos como Fe^{+2} , Mg^{+2} y Mn^{+2} estos son utilizados como cofactores en plantas superiores y algunas algas, Además estos iones metálicos son necesarios para las reacciones de fotosíntesis, el contenido de pigmento y la proporción de ácidos grasos incluso su acumulación (**WEHR, 2007**).

4.8.5 pH

El pH también afecta de manera importante a la actividad enzimática y también puede influir en el crecimiento celular y el metabolismo de microalgas cultivadas bajo condiciones mixotróficas (**Mori *et al.*, 2013**). Se conoce que el pH podría influir en la absorción de diferentes tipos de fuentes de carbono por algunas algas clorófitas. El rango de pH ideal para el cultivo de microalgas en modo mixotrófico es entre 7 y 9 (**FAO, 2010**). En

los cultivos mixotróficos a lo largo del tiempo se produce grupos hidroxilos en la fase autótrofa y CO₂ en la fase heterótrofa por lo que la variación del pH es irregular (**Kim et al., 2013**).

Adicionalmente los cambios en los valores de pH externo a la célula también afectan varios parámetros fisiológicos en las células. El pH en la mayoría de cultivos de microalgas se encuentra entre 7 y 9, con un óptimo entre 8,2–8,7. El control de este factor se consigue mediante aireación o adición de CO₂, el proceso fotosintético de fijación de CO₂ provoca un aumento gradual de pH en el medio debido a la acumulación de OH⁻, lo que puede promover la eliminación de nitrógeno en forma de amoníaco por stripping a la atmósfera y eliminación de fósforo por precipitación de ortofosfatos (**Kosourov et al., 2003**).

4.8.6 Fuentes de Nitrógeno

El contenido en nitrógeno de la biomasa puede suponer desde un 1% hasta más del 10%, y depende de la disponibilidad y el tipo de fuente de nitrógeno. En general, las algas pueden tomar nitrógeno del medio en forma de urea, amonio, nitrato, nitrito, nitrógeno gas y óxidos de nitrógeno (NO_x) en algunos casos.

En un estudio (**Xin et al., 2010**) demostró, para la microalga *Scenedesmus* sp. LX1, que ésta crece más rápidamente con amonio, seguido de urea y finalmente de nitrato. Sin embargo, la eliminación de fósforo y nitrógeno fue más completa en el cultivo donde éste está presente en forma de nitrato y urea que en aquél con amonio. El nitrógeno en forma de amonio, cuyo equilibrio de disociación depende de la temperatura y el pH del medio, inhibe también el crecimiento de las microalgas, ya que es en general tóxico para los organismos fotosintéticos.

4.8.7 Fuentes de Fósforo

El fósforo es un nutriente esencial en el crecimiento de las microalgas. Es tomado en forma de ortofosfatos, cuya concentración en equilibrio con las formas protonadas depende del pH del medio. Al igual que en las plantas superiores existen factores que ralentizan la toma de fosfatos por parte de las algas, como un pH excesivamente alto o bajo, o la ausencia de iones como, por ejemplo: Potasio, sodio y magnesio (**Xin et al., 2010**).

4.8.8 Otros macronutrientes

Adicionalmente a los nutrientes esenciales como el carbono, nitrógeno y fósforo, las microalgas requieren para su crecimiento de otros macronutrientes como es el caso del azufre, calcio, magnesio y potasio, así también como de micronutrientes como molibdeno, hierro, níquel, cobre, zinc, manganeso, cobalto, boro y cloro. En ciertos grupos de algas se requieren nutrientes especiales o característicos, como sucede con las diatomeas y el silicio el cual es un componente estructural de su pared celular (**Zappi, 2015**). La mayoría de estos nutrientes sirven como cofactores de enzimas involucradas en rutas metabólicas de mucha importancia y como partes estructurales como es el caso del azufre en ciertas proteínas (**Blair et al., 2014**)

Un nutriente esencial para la correcta asimilación de nitratos (NO_3) es el molibdeno, este elemento es el cofactor de la enzima nitrato reductasa (NR) que reduce los nitratos a nitritos. La concentración de molibdeno en aguas residuales es baja (0,75-11 ppb), por lo que la suplementación de molibdeno puede incrementar la asimilación de nitratos (**Wallen & Cartier, 1975**).

4.8.9 Oxígeno

El oxígeno es necesario para la mayoría de microalgas ya que sin este no se puede realizar la respiración aerobia necesaria para el crecimiento de las microalgas, sin embargo, el nivel de oxígeno disuelto debe ser controlado, ya que altas concentraciones pueden inhibir la

fijación de carbono por parte del enzima RuBisCo. Esta inhibición se ve favorecida por alta radiación y temperatura, así como en el caso de déficit de CO₂ (**Raso et al., 2012**).

Una alta actividad del metabolismo fotoautotrófico aumenta la cantidad de oxígeno en el medio lo cual puede ser tóxico para algunas algas, esto oxígeno en exceso puede reducirse durante el metabolismo heterotrófico evitando que llegue a concentraciones tóxicas, hecho que indica que debe existir un equilibrio entre estos dos metabolismos en el cultivo mixotrófico, lo cual se puede regular con la relación de luz: oscuridad utilizada en el cultivo (**Zappi, 2015**).

4.8.10 Agitación

La agitación es necesaria para evitar la sedimentación de las algas, para asegurar que todas las células de la población estén igualmente expuestas a la luz y los nutrientes y para mejorar el intercambio de gases entre el medio de cultivo y el aire (**FAO, 2010**).

Este último factor es de primordial importancia ya que el aire contiene la fuente de carbono para la fotosíntesis en forma de dióxido de carbono necesario para realizar el ciclo de Calvin (**Larkum et al., 2003**).

Dependiendo de la escala del sistema de cultivo, la mezcla se logra agitando diariamente a mano (tubos de ensayo, erlenmeyers), aireando (bolsas, tanques), o usando ruedas de paletas y bombas de chorro (estanques). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que no todas las especies de algas pueden tolerar la mezcla vigorosa (**FAO, 2010**). Se tiene que tener en cuenta, sin embargo, que no todas las especies toleran una agitación fuerte, ya que existen microalgas que son sensibles al estrés hidrodinámico (**Hoekema et al., 2002**).

4.8.11 Relación N: P

La relación N: P en aguas residuales es un factor vital para el éxito cultivos mixotróficos de microalgas por lo que debe estar en un rango óptimo. La relación N: P óptima depende de la especie de microalga debido a que sus actividades metabólicas son diferentes (**Whitton et al., 2016**). Un ejemplo de esta relación óptima es la de *Chlorella vulgaris*, esta especie crece óptimamente cuando la relación N: P es de 7, hecho que coincide con la relación N: P de 7.2 basada en la fórmula empírica de Stumm para algas ($C_6H_{263}O_{110}N_{16}P$) la cual permite dar una aproximación teórica sobre cuál debería ser la relación N: P.

Existen especies de microalgas que necesitan una mayor relación que la de *Chlorella vulgaris*, como es el caso de las especies del género *Scenedesmus sp* las cuales necesitan una relación de N: P de 30 para su crecimiento óptimo. Cabe mencionar que la tasa de disminución de nitrógeno siempre es más rápida que la de P debido a la proporción comparativamente mayor de nitrógeno (**Hongyang et al., 2011**).

4.8.12 Reactores para cultivo mixotrófico de algas

Los reactores que se utilizan para el cultivo mixotrófico de microalgas son los fotobioreactores cerrados transparentes, de plástico o vidrio, con geometrías de diverso tipo: tubulares, cilíndricas o planas. Se empezaron a desarrollar tiempo después que los sistemas de lagunaje y su configuración y geometría dependen de condiciones locales, del producto que se desea obtener y de las especificaciones económicas del sistema.

Una de las principales ventajas de los sistemas cerrados es que es más difícil que se contamine con otras especies facilitando la obtención de un monocultivo, lo que es indispensable para proveer un producto de pureza apta para su procesado en la industria farmacéutica o alimentaria. Adicionalmente, este tipo de cultivo evita que ingresen depredadores al sistema facilitando que el cultivo puede mantenerse por periodos de tiempos más extensos. (**Posten et al., 2009**).

La productividad de biomasa que se alcanza en los fotobiorreactores cerrados es mayor que la de los sistemas abiertos, por lo que requieren mucho menos espacio que los sistemas abiertos. Esta alta productividad es debida también a desventajas importantes que tienen los sistemas abiertos de cultivo, por ejemplo, una baja eficiencia de mezclado y bajas eficacias fotosintética y de consumo de CO₂, los sistemas cerrados permiten una mayor manipulación de las condiciones dentro del cultivo (**Zappi, 2015**). Sin embargo, los costos totales son mayores cuando se emplean fotobiorreactores cerrados, comparados con sistemas de cultivo abierto, esto se debe a que presentan mayores costes de inversión, operación y mantenimiento. Por otro lado, la productividad alcanzada en los fotobiorreactores aún no llega a ser la máxima teórica, y no ha sido siempre posible llevar a gran escala resultados de laboratorio (**Stephens et al., 2010**).

El desarrollo y optimización de fotobiorreactores que permitan el cultivo económico a gran escala de microalgas es aún hoy en día una de las mayores tareas a realizar. En la **Tabla 3** se puede observar los principales aspectos técnicos para el cultivo mixotrófico de algas.

Tabla 3. Aspectos técnicos para cultivos mixotróficos

Aspecto técnico	Cultivo Mixotrófico
Fuente de energía	Luz y carbono orgánico
Fuente de carbon	Inorgánico y orgánico
Uso de energía renovable	Parcialmente
Productividad de biomasa	Alta
Luz	No obligatoria

Factor limitante de crecimiento	Luz y Oxígeno
Emisión de CO ₂	Neutral CO ₂ producido y consumido
Tipo de bioreactor	Fotobiorreactor cerrado en paneles o tubos
Disponibilidad de bioreactor	Puede hacerse en casa
Biorreactor relación superficie volumen (m ² /m ³)	Alta
Control de los parámetros de operación	Alta
Esterilidad	Esterilidad de preferencia, pero no requerida
Riesgo de contaminación	Media
Dificultad de cosecha	Baja debido a alta densidad
Costo de instalación del biorreactor	Alta por unidad de volumen
Costo de operación del biorreactor	Alto por kilogramo de biomasa

Fuente: (Zappi, 2015)

La velocidad específica de crecimiento de algunas microalgas cuando crecen mixotróficamente, es la suma de la fotosíntesis y velocidades crecimiento específica heterotrófica, un ejemplo de especies en lo que ocurre esto son *Chlorella vulgaris* y *Haematococcus pluvialis*. Las velocidades de crecimiento promedio de los cultivos mixotróficos están entre 3 y 4 gramos de biomasa por día (T. Li *et al.*, 2014).

5. Pregunta de investigación

¿Las microalgas aisladas a partir de columnas de Winogradsky pueden crecer bajo condiciones mixotróficas empleando ARnD pos tratada como sustrato para la remoción de color y demanda química de oxígeno?

6. Hipótesis y resultados esperados

Mediante la selección de microalgas mixotróficas por pruebas de tolerancia y la determinación de sus condiciones ideales de crecimiento es posible remover color y Demanda química de oxígeno (materia orgánica) residuales presentes en un efluente no doméstico.

Se espera el desarrollo de simuladores de 0.75 L en los cuales se encuentren las condiciones óptimas para el crecimiento de microalgas mixotróficas seleccionadas por pruebas de tolerancia que permitan remover materia orgánica y nutrientes de aguas residuales no domésticas.

7. Objetivos

7.1 Objetivo general Aislar y seleccionar microalgas mixotróficas con capacidad de remoción de color y demanda química de oxígeno o materia orgánica a escala de laboratorio.

7.2 Objetivos específicos

- Realizar el recuento y caracterizar por morfología microscópica microalgas totales a partir de columnas de Winogradsky con diferentes tiempos de estabilización.
- Seleccionar las microalgas mixotróficas con capacidad para crecer en aguas residuales no domésticas pos tratadas en la Planta de tratamiento de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana (Bogotá D.C).

- Realizar el tratamiento primario y secundario del agua residual no doméstica a escala de planta piloto con biomasa fúngica/bacteriana.
- Determinar las condiciones de operación a escala de reactores de 0.5 L para realizar el tratamiento terciario de ARnD.

8. Metodología

8.1 Recuento y caracterización por morfología microscópica de microalgas totales a partir de columnas de Winogradsky con diferentes tiempos de estabilización

Las muestras utilizadas para poder realizar recuento y caracterización microscópica de las microalgas fueron tomadas de 9 columnas de Winogradsky (columnas para estudio del ciclo de azufre para la asignatura de Microbiología Ambiental) que tuvieron diferentes tiempos de estabilización (**Tabla 4**).

Tabla 4. Columnas de Winogradsky a emplear para el muestreo

Código columna	de Tiempo de estabilización	de Descripción reactor	Capacidad para condiciones aeróbicas microaerofilicas y anaeróbicas
1-3	12 meses	Recipientes de vidrio de 3.5 L	Volumen total del reactor 3.5 L Volumen efectivo: 3 L

4-6	9 meses	Recipientes de vidrio de 3.5 L	Volumen total del reactor 3 L
7-9	3-4 meses	Probeta de vidrio de 1 L	Volumen total del reactor 0.9 L

Inicialmente, se tomaron 20 mL de agua de la parte superficial de cada columna y adicionalmente se utilizó un hisopo de algodón estéril para recolectar muestras de las paredes laterales de las columnas donde se observaba formaciones de biopelículas en la gama de los colores verdes, posteriormente las muestras de agua fueron transferidas a 9 diferentes Erlenmeyer de 250 mL con 150 mL de medio basal de Bold (**Blair *et al.*, 2014**), con un código correspondientes a cada columna, en los cuales se desprendieron las muestras de biopelículas recuperadas previamente con los hisopos estériles. Las muestras de microalgas se incubaron en los Erlenmeyer por 15 días en sheaker a 120 rpm con ciclos de luz artificial/oscuridad de 12 horas con una intensidad lumínica del 1000 Lux y una temperatura promedio de 22°C.

Una vez terminado el periodo de incubación, se tomaron con pipetas pasteur muestras de los sólidos sedimentables y suspendidos que se encontraban en los Erlenmeyer, las cuales sirvieron para realizar 5 preparaciones en fresco por columna y poder documentar observaciones microscópicas con aumento 40 y 100 X. En cada preparación se observaron 5 campos microscópicos para poder identificar morfologías, donde se buscaron dos grupos de interés Clorófitas y Diatomea (grupo Crisofitas), adicionalmente, se hizo un registro fotográfico de las muestras para posteriormente poder usar las claves de clasificación taxonómica: (**S, Taylor, Gerber, & C, 2006; WEHR, 2007**).

Finalmente, se estimó el recuento de microalgas totales, Clorofitas y Diatomeas (grupo Crisofitas) por columna y tiempo de estabilización, para esto se hicieron diluciones decimales de 10^{-1} a 10^{-3} usando como diluyente solución salina, de las muestras pre cultivadas de cada columna y posteriormente se realizaron montajes en fresco para cámara

de Neubauer. Se determinó como variable de respuesta el número de microalgas totales, Clorófitas y Diatomeas por mL de muestra analizada, estos recuentos en cámara de se determinaron mediante la fórmula universal de la cámara de Neubauer **Ecuación 3**, (**Canseco et al., n.d.**). Cada recuento se realizó por triplicado y se obtuvieron los promedios con las correspondientes desviaciones estándar.

Ecuación 3.

$$FUC = \frac{\#celulas\ contadas \times Factor\ de\ dilución}{Profundidad\ Cámara \times Cuadrados\ grandes\ de\ 1mm^2}$$

Posterior a realizar la identificación y el recuento, se inoculó 10 mL de cada uno de los 9 pre cultivos a 9 Erlenmeyer de 100 mL correspondientes a cada columna, los cuales tenían 50 mL de medio Bold modificado diluido a la mitad para el crecimiento de las algas, estas se mantuvieron en estos recipientes creciendo a una temperatura de 25 °C 120 rpm. La composición del medio Bold modificado fue: CaCl₂ (25 mg/L), NaCl (25 mg/L), NaNO₃ (250 mg/L), MgSO₄ (75 mg/L), KH₂PO₄ (105 mg/L), K₂HPO₄ (75 mg/L), adicionalmente para preparar el medio se añadieron 3 mL de solución traza de metal por cada 1000 mL de la solución anterior, la composición de la solución traza fue la siguiente: FeCl₃ (0.194 g/L), MnCl₂ (0.082 g/L), CoCl₂ (0.16 g/L), Na₂MoO₄ 2H₂O (0.008 g/L) y ZnCl₂ (0.005 g/L) (**Blair et al., 2014**). La diferencia entre este medio de cultivo y el medio Bold estándar se basa en que el medio modificado posee menor concentración de nitratos, lo que favorece el crecimiento de algas clorofitas.

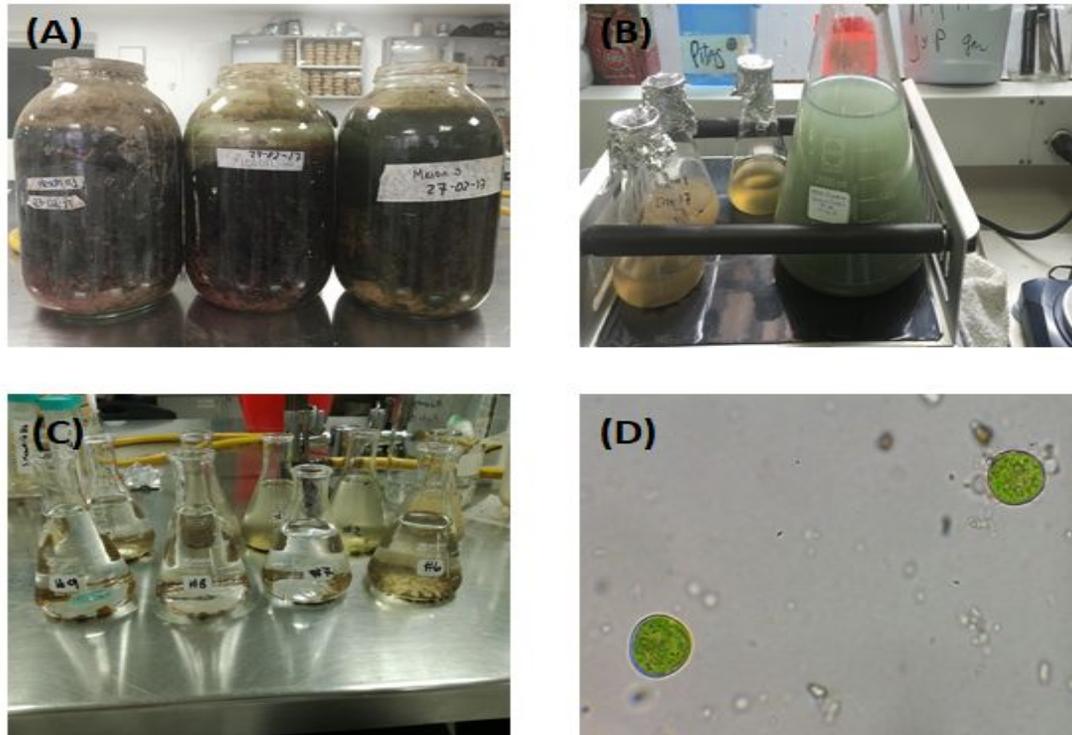


Figura 5. Aislamiento e identificación morfológica (A) Toma de muestras a partir de las columnas de Winogradsky (B) precultivo en sheaker a 120 rpm con ciclos de luz artificial/oscuridad de 12 horas con una intensidad lumínica del 1000 Lux (C) Enriquecimiento con medio Bold modificado (D) Observación microscópica de las microalgas 40 X.

8.2 Selección de microalgas mixotróficas con capacidad para crecer en aguas residuales no domésticas pos tratadas en la planta de tratamiento de la Facultad de Ciencias

Para la selección de microalgas mixotróficas con capacidad para tolerar y crecer en presencia de aguas residuales no domésticas (ARnD) pos tratadas en la planta de tratamiento de la Facultad de Ciencias. Se empleó ARnD pos tratada en la planta por un periodo de 8 días la cual pasó por 4 unidades de tratamiento: Trampa de grasas, reactor

biológico con un consorcio fúngico/bacteriano de aireación extendida, sedimentador secundario y filtros de arena cuarcítica.

El tiempo establecido para el cumplimiento de este objetivo era dos meses. Durante el desarrollo de la metodología planteada se observó que el crecimiento de la biomasa algal en medio líquido era lento, 10-15 días, y al no contar con un agitador para el montaje de todas las unidades experimentales (protocolo 1) no era posible terminar en el tiempo establecido. Por este motivo se decidió modificar la metodología planteada (protocolo 2) y realizar la siembra de las microalgas directamente en medio agarizado como única variable de respuesta.

Protocolo No 1.

Se prepararon 3 concentraciones descendentes del ARnD pos tratada y un control (medio Bold). Las dosificaciones se presentan en la **tabla 5** y como diluyente se empleó agua destilada que contenía los nutrientes del medio de Bold (medio reportado para el cultivo mixotrófico de algas). Se colocaron 10 mL de cada una de las dosificaciones a evaluar en tubos de 16x150 tapa rosca fondo curvo y se esterilizaron en ciclo normal. El pH del agua residual se ajustó a 7.0 con NaOH [0.1N]. Posteriormente se inocularon con 1.0 mL del cultivo de enriquecimiento de cada una de las 3 primeras columnas y se cultivaron por 15 días a 120 rpm, 15° C en ciclos de luz oscuridad de 12 horas con una intensidad de luz de 1000 lx. Finalmente se tomaron muestras para realizar diluciones decimales se sembró en agar Bold suplementado con 1 % de ARnD para determinar el número de UFC/mL de microalgas totales, clorofitas y Diatomeas que toleren y crezcan en las proporciones más altas de ARnD.

Protocolo No 2.

Para agilizar el protocolo de recuperación, se realizó una modificación al protocolo número 1. El cual consistió en tomar directamente 1 mL de los cultivos de pre enriquecimiento de

las columnas 3-9 y hacer diluciones decimales hasta 10^{-3} . De esta se sembró por duplicado en agar Bold suplementado con concentraciones del 10, 50 y 100% (v/v) de agua pos tratada. Las cajas se incubaron por 8 días en oscuridad a 25°C. Posteriormente se realizó el recuento de las cajas que crecieron directamente en agar agua residual suplementadas con las sales Bold. Se trabajó con los promedios y la desviación estándar.

A partir de las colonias que se obtuvieron en las dosificaciones más altas de ARnD, se realizó el aislamiento y purificación por triplicado empleando la misma dosificación agarizada con 20 g/L de agar agar **figura 6**.

Tabla 5. Proporciones de ARnD y Agua destilada a evaluar para las pruebas de crecimiento y tolerancias

Tratamiento y control	Proporción de ARnD % (v/v)	Proporción de agua destilada con nutrientes medio Bold modificado % (v/v)
1	100	0
2	50	50
3	10	90
Control	0	100

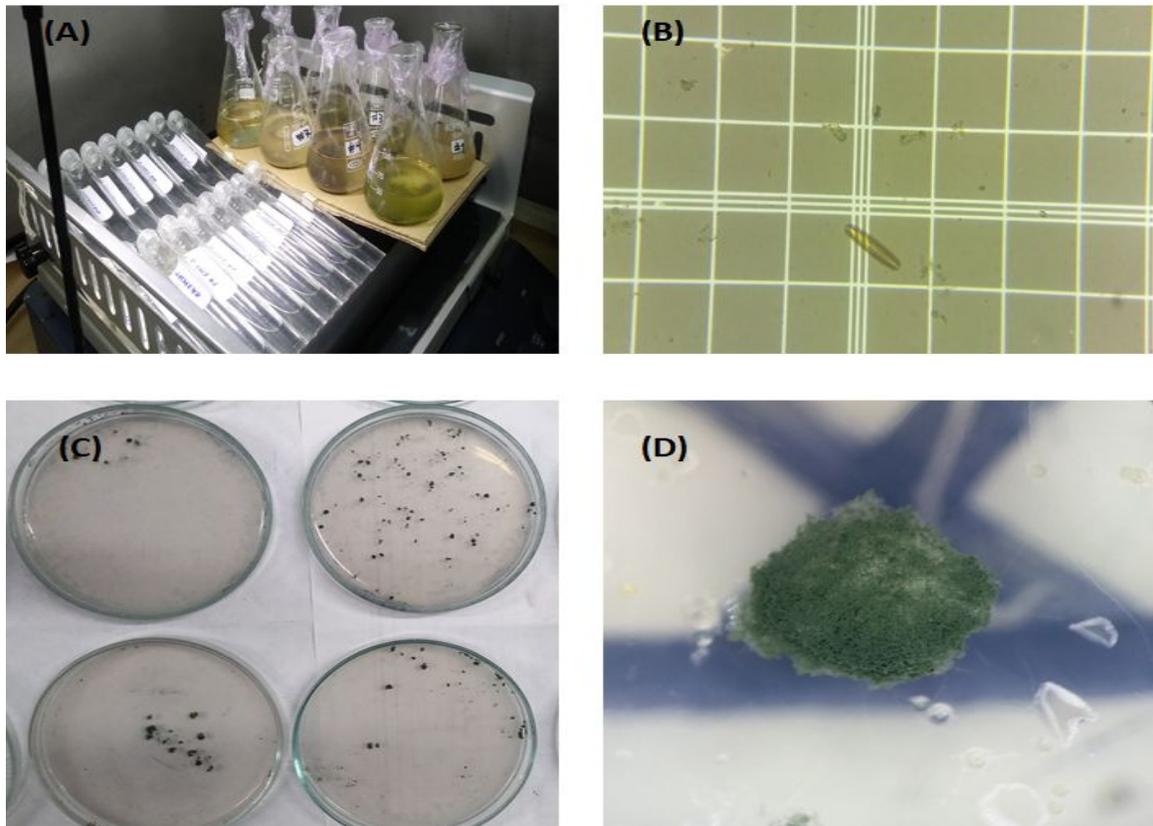


Figura 6. Recuento de microalgas mixotróficas resistentes a diferentes concentraciones de agua residual no domésticas pos tratadas en la planta de tratamiento de la Facultad de Ciencias **(A)** Cultivo medio liquido en tubos de 16 x 150 mm con medio Bold modificado y agua residual al 10%, **(B)** Observación microscópica de cámara de Neubauer en 40 X **(C)** Crecimiento de microalgas en medio Bold Agarizado con agua residual al 100% **(D)** Observación macroscópica de microalgas en medio Bold modificado agarizado.

8.3 Montaje de planta y caracterización fisicoquímica de agua residual cada 24 horas por 8 días

Para el inicio del montaje de la planta de tratamiento se tomaron 20 L de agua residual no doméstica derivada de tinciones biológicas y se pasaron por una trampa de grasa, posteriormente, se transfirieron a un reactor biológico aerobio, neumático y mesófilo de 30 L que fue aireado mediante difusores porosos instalados en la profundidad del reactor,

donde se manejó un VET de 15 L. El volumen del consorcio fúngico/bacteriano que se inoculó en el reactor fue del 10 % (v/v) del VET, es decir 2 L de inóculo. Los hongos que formaron parte del consorcio fueron: *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* y *Trametes* sp, mientras que las bacterias involucradas en el consorcio fueron: *Pseudomonas azotoformans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter xiangfangensis* y *Pseudomonas* sp. Inmediatamente, después de la inoculación el reactor se aireó y se mezcló por 5 minutos, para tomar la muestra inicial dentro del reactor, el reactor se operó por 8 días a temperatura ambiente (**figura 7**).

Una vez transcurridos los 8 días en el reactor biológico se pasaron 15 L del afluente del reactor al sedimentador secundario para clarificar por 1 h, el agua residual clarificada se llevó a las unidades de filtración post tratamiento compuestas por carbón activado y arena cuarcítica. Finalmente, se tomó la muestra de efluente final (afluente) al salir del sistema de filtración y se caracterizó para determinar la eficiencia global de la planta.

Se evaluaron los siguientes parámetros en el reactor biológico: UC, pH, DQO, sólidos suspendidos y sólidos sedimentables. Estos parámetros fueron medidos cada 24 horas por un transcurso de 8 días, adicionalmente en la muestra inicial y en la muestra final se evaluó COT y se realizó 2 curvas espectrales correspondientes al efluente inicial y al efluente final (afluente).

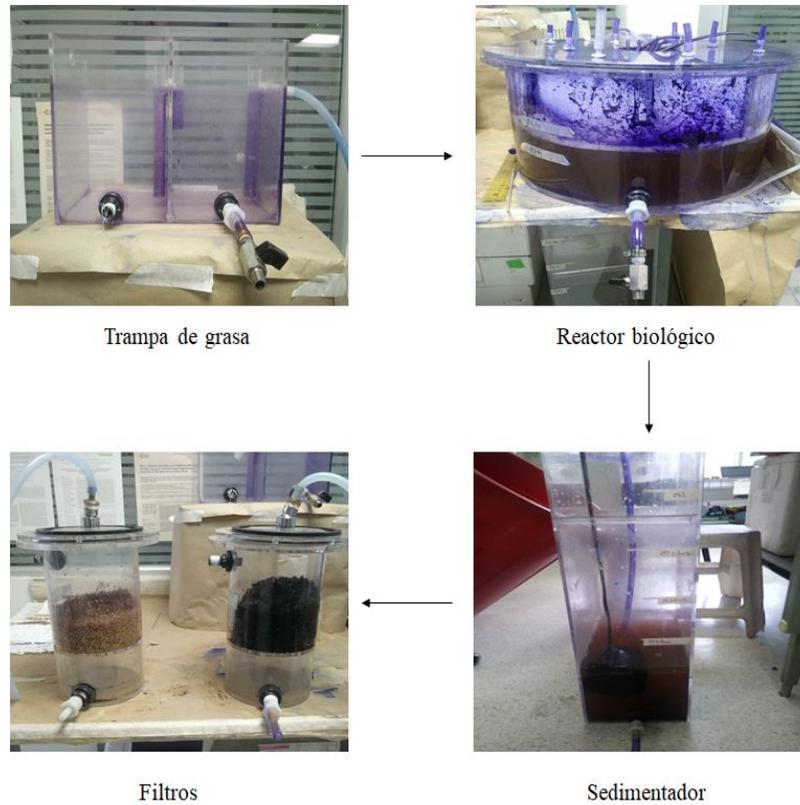


Figura 7. Unidades de tratamiento empleadas en la planta piloto a escala de laboratorio

Fuente: (Pedroza *et al.*, 2018).

8.4 Técnicas analíticas

- Unidades de color (UC)

Para la determinación de las unidades de color se siguió el procedimiento 2120 C de Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater con modificaciones. Estas modificaciones se refieren al uso de una ecuación universal para la determinación de las UC, **Ecuación 4 (Federation, 1999)**, se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 551 nm usando como blanco agua destilada.

$$\text{Unidades de Color} = \frac{\text{Absorbancia} \times 500}{0.132} \quad (4)$$

- pH

La determinación del pH se realizó mediante un electrodo de medición OAKTON-pH 510/ion series Benchtop Meters directamente sobre el agua (antes y después del tratamiento) (**Federation, 1999**).

- Sólidos

Se realizaron las mediciones de sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos sedimentables empleando los métodos 2540 D y 2040 F de Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. (**Federation, 1999**).

- Determinación demanda química de oxígeno (DQO)

Para esta determinación se empleó un kit comercial HACH basado en el método 8000 de HACH (**HACH, 2014**) se leyó en un espectrofotómetro de la marca HACH a una longitud de onda de 350 nm usando como blanco el Tubo de DQO con agua destilada en vez de agua residual.

- Determinación carbono orgánico total (COT)

Para la determinación del carbono orgánico total se empleó un kit comercial HACH basado en el método 5310 C, específicamente el uso de oxidación por combustión de persulfato, se leyó en un espectrofotómetro de la marca HACH a 430 nm usando como blanco 1 Tubo de COT con agua destilada en vez de agua residual. (**Method, 2016**).

- **Determinación de nitratos (NO_3)**

Para la determinación de nitratos se utilizó un kit comercial NitraVer® de HACH basado en el método 8171 reducción de Cadmio rango 0.1 – 10 mg/L NO_3 -N, se tomaron 10 mL de la muestra de agua residual a analizar y se los pasó a un tubo HACH, posteriormente se añadió el sobre y se mezcla en vórtex por 1 minuto y se lo dejó reposar por 5, finalmente se lleva el tubo al espectrofotómetro en donde los resultados son medidos a 500 nm usando como blanco agua residual con el sobre Nitriver (**Hach, 2014**).

- **Determinación de nitritos (NO_2)**

Para la determinación de nitritos se utilizó un kit comercial NitriVer® 3 de HACH basado en el método 8507 diazotización rango 0,002 - 0,300 mg/L NO_2 ⁻-N, se tomaron 10 ml de la muestra de agua residual a analizar y se los pasó a un tubo HACH, posteriormente se añadió el sobre y se mezcla en vórtex por 1 minuto y se lo dejó reposar por 20 minuto, finalmente se llevó el tubo al espectrofotómetro en donde los resultados son medidos a 507 nm, usando como blanco agua residual con el sobre Nitriver (**Hach Company, 2014**).

8.5 Curvas espectrales del diseño experimental de paso descendente.

Adicionalmente se realizaron curvas espectrales o barridos UV/VIS (400-750nm) en un espectrofotómetro determinando la longitud de onda de máxima adsorción del agua residual antes y después de los tratamientos para evaluar los cambios en el espectro de absorción de los compuestos coloreados en la muestra y determinar si se están llevando a cabo procesos de mineralización o si se están produciendo compuestos intermediarios (**Pedroza-Camacho et al., 2018**).

8.6 Preparación de inóculo *Plackett Burman*

Debido a que la biomasa obtenida en las pruebas de tolerancia no alcanzaría a suplir el inóculo requerido para los 15 tratamientos del Plackett Burman, se decidió que el inóculo utilizado para realizar el modelo experimental sería una mezcla tomada a partir de tres columnas de vidrio con una capacidad de 1600 mL. Para el montaje de las tres columnas, en primer lugar, se preparó el inóculo: se mezcló un cuarto del contenido (25 mL) de los cultivos de algas previamente enriquecidos provenientes de las nueve columnas de Winogradsky. Adicionalmente, para aprovechar la biomasa algal proveniente de los tubos de 16x150 mm utilizados en el primer protocolo correspondiente al segundo objetivo, se utilizó todo su contenido, para alcanzar un volumen total de inóculo de 130 mL para cada columna para obtener un porcentaje de inóculo de 11% (v/v). Las columnas contenían un volumen efectivo de trabajo (VET) de 1200 mL suplementada con medio Bold. Las columnas son alimentadas cada mes con agua residual y medio Bold cargado.

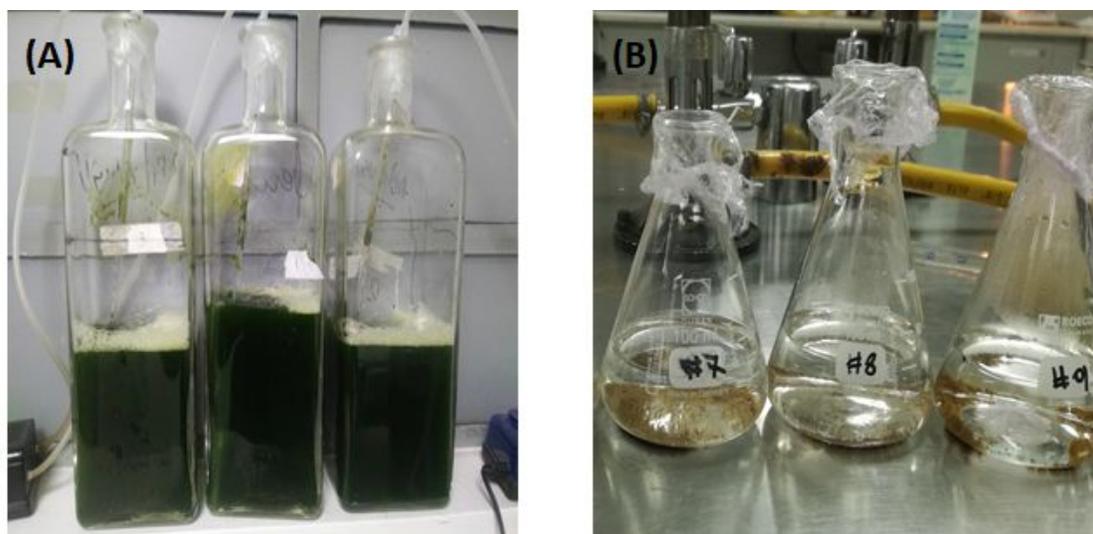


Figura 8. Preparación del inóculo *Plackett Burman*. **(A)** Columnas de vidrio de 1600 mL con biomasa algal. **(B)** Cultivos enriquecidos con medio Bold modificado

8.7 Confirmación de la presencia de las microalgas seleccionadas de la prueba de tolerancia en el inóculo de Plackett Burman

Este experimento se realizó para poder confirmar que el inóculo que se utilizaría para los diseños experimentales del Plackett Burman poseía las algas seleccionadas en la prueba de tolerancia.

Para poder realizar este experimento inicialmente se realizó un mix de las 3 columnas previamente realizadas para el inóculo del diseño de *Plackett Burman*, este mix se hizo inoculando 30 mL de cada columna en un Erlenmeyer de 150 mL, el cual una vez inoculado se agitó manualmente por 3 minutos. Posteriormente, se preparó 10 medios de Bold con agua residual al 100 %, los cuales se inocularon con 1 mL del mix previamente preparado. Finalmente, los medios ya inoculados se sembraron en oscuridad en una incubadora por 15 días a 25°C, el medio que se usó y las condiciones de crecimiento fueron las mismas a las que se sometieron las algas seleccionadas en la prueba de tolerancia.

Transcurridos los 15 días, se observó en microscopio las morfologías de las algas que crecieron en los medios y se comparó con la morfología reportada previamente de las algas seleccionadas en la prueba de tolerancia al agua residual, en esta metodología no se utilizaron réplicas.

8.8 Preparación y montaje de las unidades experimentales del diseño *Plackett Burman*

Para determinar las mejores condiciones para el tratamiento de ARnD pos tratada en planta se realizó un diseño experimental de *Plackett Burman*. En este diseño se evaluaron 6 factores con un nivel alto y un nivel bajo, de la siguiente manera: pH (5 y 7), aireación (0 y 1000), tiempo (10 y 20 días), nutrientes de Bold (0 y 1), iluminación (0 y 1000 lx) y porcentaje de inóculo (0,2 y 4% (v/v), en la **tabla 6** se puede observar estos valores. En este diseño se incluyó un punto central que fue evaluado tres veces; los valores incluidos en el punto central fueron (PH 6, aireación 500, tiempo 15 días, nutrientes de Bold 0,5, iluminación 500 lx y porcentaje de inóculo. Todos estos tratamientos dieron un total de 15 corridas (12 tratamientos, 1 punto central el cual fue ensayado por triplicado). Como variables de respuesta iniciales y finales relevantes para el diseño estadístico se determinó

recuento de microalgas (células/mL), peso seco (g/L), unidades de color y DQO (Kit HACH), para la medición de estos parámetros se siguió las técnicas descritas anteriormente. Como variables adicionales no estadísticas se cuantifican NO_3 y NO_2 .

Tabla 6. Valores diseño experimental Plackett Burman

Tratamiento	pH	Aireación (mL/L)	Tiempo (Horas)	Nutrientes de Bold (con sales/sin sales)	% Inóculo (v/v)	Iluminación (lux)
1	7	1000	10	1	4	1000
2	5	1000	20	0	4	1000
3	7	0	20	1	0,2	1000
4	5	1000	10	1	4	0
5	5	0	20	0	4	1000
6	5	0	10	1	0,2	1000
7	7	0	10	0	4	0
8	7	1000	10	0	0,2	1000
9	7	1000	20	0	0,2	0
10	5	1000	20	1	0,2	0
11	7	0	20	1	4	0
12	5	0	10	0	0,2	0
13	6	500	15	0,5	2,1	500

14	6	500	15	0,5	2,1	500
15	6	500	15	0,5	2,1	500

Los experimentos se realizaron en reactores tipo columnas de burbujeo de 0.75 L de capacidad, los cuales operaron con 49 % VET (370 mL) y fueron inoculados con el porcentaje de inóculo determinado por el factor G del Plackett Burman. Los 15 tratamientos fueron separados y colocados en diferentes lugares dentro de un cuarto según la iluminación que recibieron.

El pH se ajustó con NaOH y HCl según el tratamiento, los lx fueron medidos con un luxímetro, aquellos tratamientos que no tenían luz se los forro con papel aluminio y a los tratamientos que se les suministro aireación se lo hizo mediante bombas de pecera.

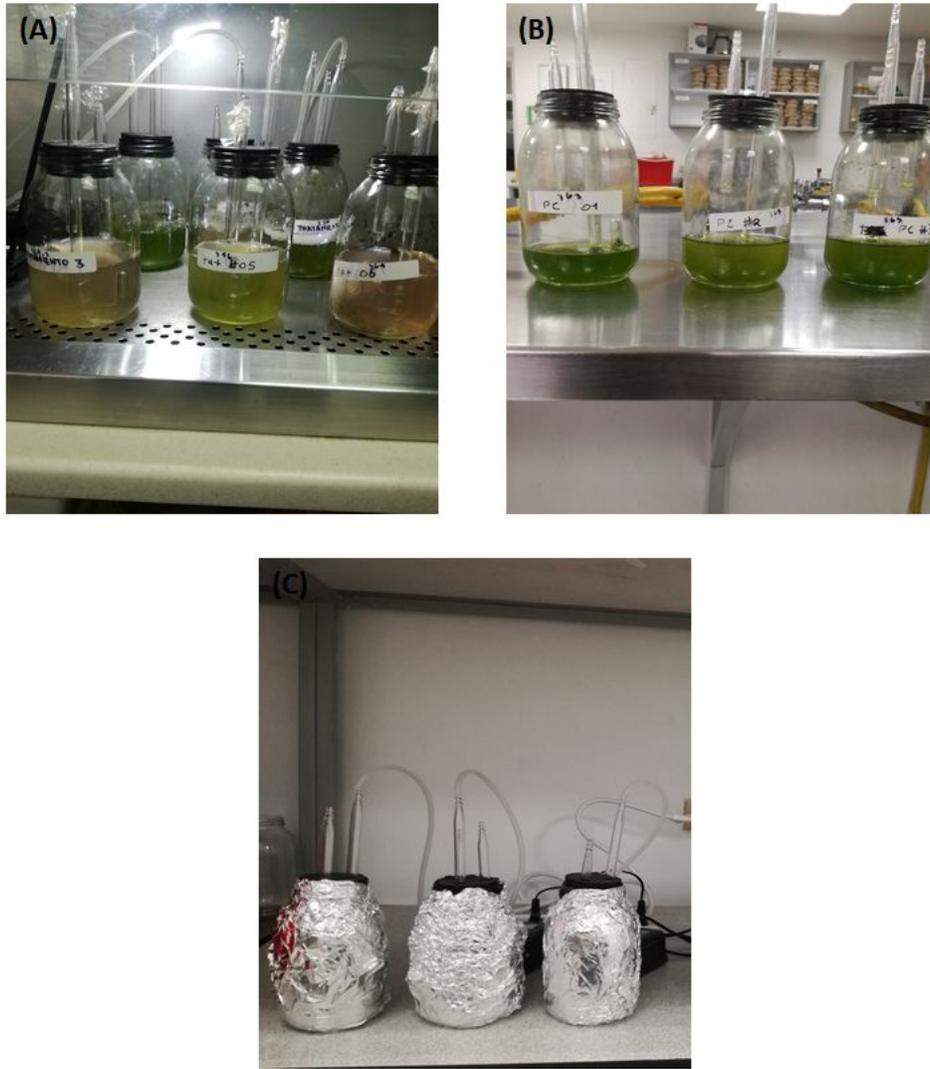


Figura 9. Preparación y montaje de unidades experimentales del diseño Plackett Burman. **(A)** Tratamientos sometidos a una iluminación de 1000 lx. **(B)** Puntos centrales del diseño experimentales. **(C)** Tratamientos sin iluminación.

8.9 Análisis estadístico

Para el diseño de Plackett Burman se empleó el programa Desing Expert y SAS. Se realizó comprobación de supuestos de normalidad, homogeneidad. Se realizó un análisis de varianza para la selección de los factores influyentes y una comparación de medias entre tratamientos para determinar en cual se obtenía mayor remoción, recuento de células y

biomasa en peso seco. Dado que el proyecto continúa con la fase dos que incluye las cinéticas de crecimiento, remoción empleando el mejor tratamiento

9. Resultados y Discusión

9.1 Recuento y caracterización por morfología microscópica de microalgas totales a partir de columnas de Winogradsky con diferentes tiempos de estabilización

La columna de Winogradsky es un ecosistema microbiano único que permite estudiar las interacciones microbianas, su dinámica y el ciclo de los nutrientes a lo largo del tiempo (*de Sousa et al., 2012*). Los resultados de este objetivo demostraron una influencia del tiempo de estabilización de las columnas con respecto a los morfotipos de microalgas recuperados y su recuento dentro de las columnas el cual será discutido más detalladamente en este apartado.

Las **figuras 10A,10B Y 10C** presentan las imágenes de los morfotipos recuperados con más frecuencia de las columnas con tiempo de estabilización entre 3 y 4 meses (columnas código 7, 8 y 9), se puede observar que existe una gran variedad de morfologías de clorofitas como de diatomeas. Entre los posibles géneros recuperados de Diatomeas en estas columnas están: *Fragilaria*, *Navicula*, *Gomphonema* y *Achnantheidium*. Entre los géneros del grupo de las algas clorofitas que se pudieron recuperar en estas columnas estuvieron: *Chlorococcus*, *Euglena*, *Westella* y en una mayor proporción *Chlorella*.

Con respecto a las columnas con un tiempo de estabilización entre 9 y 12 meses (columnas código 4, 5, 6, 7, 8, y 9,) las **figuras 10D,10E, 10F ,10G ,10H y 10I** muestran los morfotipos recuperados con más frecuencia en las columnas que se encuentran dentro de este intervalo de tiempo de estabilización. Entre los géneros pertenecientes al grupo de las diatomeas que se pudieron recuperar estuvieron: *Nitzschia* y *Achnantheidium*, y entre los géneros del grupo de las clorofitas estuvieron únicamente *Chlorella* y *Coelastrum* los cuales se caracterizan por ser esféricas y no poseer flagello (**S, Taylor, Gerber, & C, 2006**).

Se pudo observar que en las columnas que tuvieron un tiempo de estabilización de 9 y 12 meses se recuperó menos cantidad de morfologías que en las columnas con un tiempo de estabilización de 3 a 4 meses, lo que indicaría que algunos géneros de algas en la columna de Winogradsky como *Fragilaria*, *Navicula*, *Euglena* y *Westella*, van desapareciendo a medida que aumenta el tiempo de estabilización. La desaparición de algunos géneros de microalga podría ser explicada por diversas razones, una de ellas es que a medida que pasa el tiempo los nutrientes como amonio y fosfatos van disminuyendo y se van acumulando productos metabólicos intermedios tóxicos para algunas algas como H₂S (**Babcsányi et al., 2017**). Adicionalmente a medida que pasa el tiempo en las columnas se van liberando metales pesados (Cu, Zn, Ni y Pb) de los sedimentos por disminución de pH debido a reacciones metabólicas como producción de CO₂ en la mineralización de la materia orgánica por parte de los heterótrofos, estos metales pueden ser tóxicos para algunos géneros de algas mientras que otros géneros como *Chlorella* sp poseen mayor resistencia a los metales pesados.

Estudios previos han determinado que la diversidad microbiana en las columnas va disminuyendo desde el segundo mes de estabilización hasta llegar a alcanzar una comunidad con géneros microbianos estables los cuales no cambian con el tiempo (**Esteban et al., 2015**) hecho que se puede demostrar en las **figuras 10D, 10E, 10F, 10G, 10H y 10I** las cuales presentan las morfologías encontradas en las columnas con tiempo de estabilización de 9 y 12 meses. Se puede observar que las morfologías recuperadas en las columnas de 9 meses (**figuras 10D, 10E y 10F**) son muy similares a las de 12 meses (**10G, 10H y 10I**) lo que podría sugerir a partir de los 9 meses la comunidad de algas dentro de las columnas se va alcanzando una estabilidad en donde los géneros no cambian con el tiempo. Adicionalmente, es necesario mencionar que la morfología perteneciente al género *Chlorella* estuvo presente en todas las columnas y en una cantidad mayor que las otras morfologías, esto pudo ser debido a su alta capacidad de resistir estrés químico y físico. (**Van Acoleyen & Verschelde, 2002**).

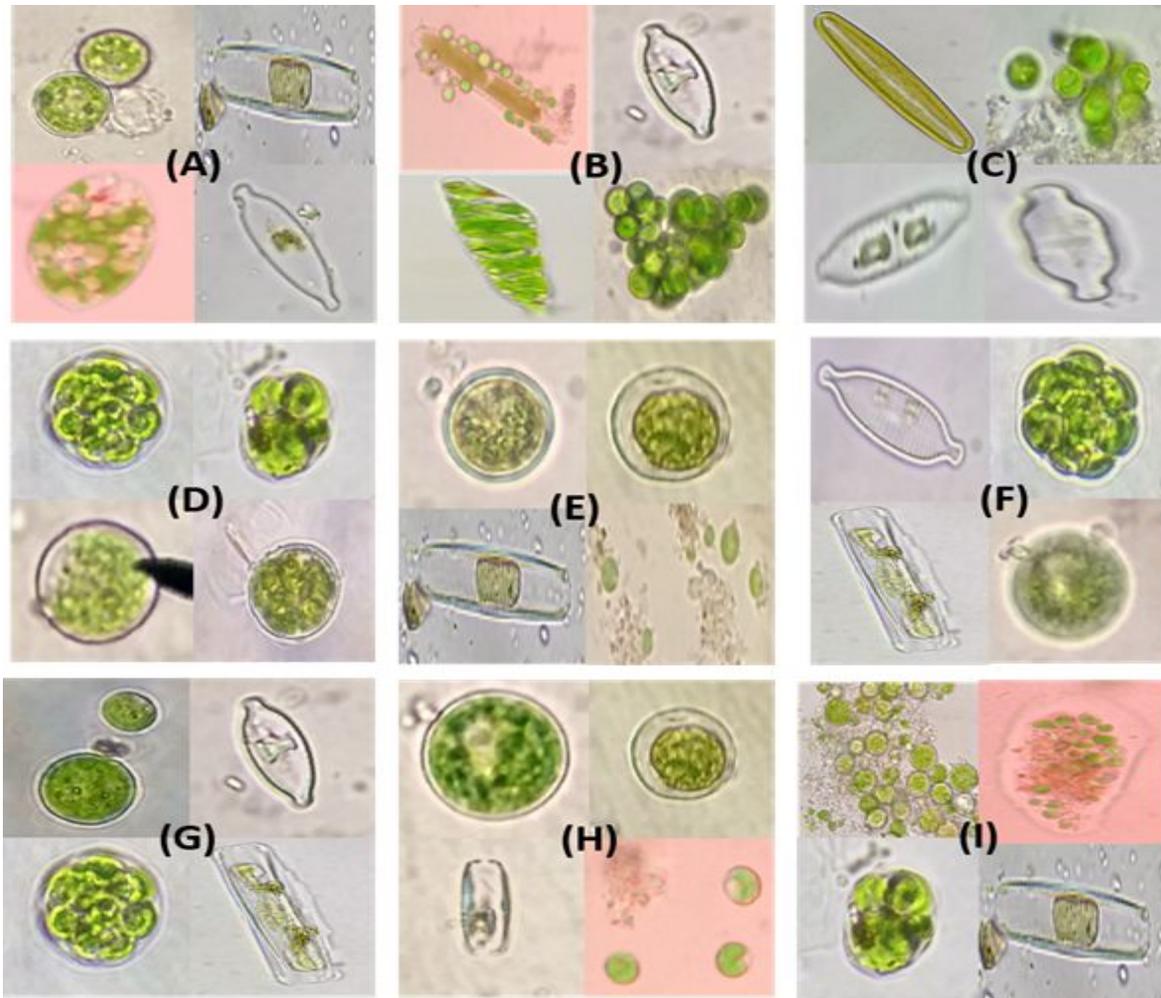


Figura 10. Morfologías más representativas pertenecientes a las 9 columnas de Winogradsky. A) Morfologías más representativas columna #9, B) Morfologías más representativas columna #8, C) Morfologías más representativas columna #7, D) Morfologías más representativas columna #6, E) Morfologías más representativas columna #5, F) Morfologías más representativas columna #4, G) Morfologías más representativas columna #3, H) Morfologías más representativas columna #2 I) Morfologías más representativas columna #1.

La **figura 11** muestra los resultados de los recuentos de microalgas clorofitas, diatomeas y totales, según su tiempo de estabilización, se pudo observar que las columnas con un

tiempo de estabilización de 12 meses presentaron un recuento promedio de microalgas totales de $2,2 \times 10^7$ células/mL, el cual fue mayor que las columnas con tiempo de estabilización de 9 meses ($2,5 \times 10^5$ células /mL) y 3-4 meses ($2,0 \times 10^5$ células/ mL). Este hecho podría indicar que a medida que el tiempo de estabilización es mayor el recuento de algas va aumentando, fenómeno contrario a lo que paso con la cantidad de géneros recuperados de las columnas los cuales disminuyeron con el aumento del tiempo de estabilización

El aumento de las microalgas en las columnas podría ser debido a que el oxígeno va aumentando a lo largo del tiempo en las columnas (**Larkum et al., 2003**). El oxígeno inhibe ciertos grupos microbianos lo que permite que los que son capaces de soportarlo como las algas tomen el nicho que dejaron disponible los microorganismos que fueron inhibidos, permitiéndoles obtener nutrientes más fácilmente sin necesidad de competir por ellos. Los mecanismos específicos detrás de los cambios y aumento de ciertos grupos de la comunidad microbiana en las columnas de Winogradsky son desconocidos. Sin embargo, es probable que los cambios y el aumento en ciertas poblaciones implique una combinación de efectos de nicho deterministas como competencia y selección de hábitat (**Esteban et al., 2015**).

Otra causa del aumento del recuento de algas con el tiempo podría ser a la disminución de materia orgánica dentro de las columnas. La materia orgánica sirve como fuente de energía para cierto tipo de microorganismos como son los heterótrofos, a medida que pasa el tiempo en la columna esta materia va disminuyendo y estos microorganismos se van quedando sin fuente de energía, esto no ocurre con los autótrofos como las algas las cuales pueden conseguir su energía por medio de la fotosíntesis (**Larkum et al., 2003**).

Con respecto a la disminución de géneros de microalgas, esto podría ser debido, como se mencionó anteriormente a que existen géneros algas que son más resistentes a compuestos tóxicos como el compuesto HS_2 y a metales pesados los cuales se van acumulando con el tiempo en las columnas. La disminución de géneros no disminuye en el recuento de microalgas totales, ya que las algas que son más tolerantes ocupan los nichos de los géneros

de algas que desaparecieron por falta de resistencia a los compuestos anteriormente mencionados.

Finalmente en la **figura 11** se puede observar que en el tiempo de estabilización de 12 meses el recuento promedio de microalgas pertenecientes al grupo de las clorofitas fue 28,71 veces mayor que el de las diatomeas ($2,03 \times 10^7$ cel/mL y $7,07 \times 10^5$ cel/mL), esto coincide con el experimento reportado por Babcsányi y colaboradores en el año 2017, se reportó que después de un tiempo de estabilización de 528 días con 4 columnas de Winogradsky las clorofitas fueron el grupo de microalgas que se encontraban en mayor proporción (**Babcsányi et al., 2017**). Esto se podría deber a que el crecimiento de las diatomeas está limitado por la disponibilidad de silicio en el medio el cual es necesario para la conformación de su pared celular, fenómeno que no sucede con las clorofitas. Adicionalmente las Diatomeas son muy sensibles a los cambios ambientales, razón por la que se las a utilizado como indicadores de agua (**Bondoc et al., 2016**).

Finalmente, en la **figura 11** se puede observar que existen diferencias significativas en los recuentos de las columnas y los tiempos de estabilización. Obteniendo los valores más altos en las columnas de 12 meses (1-3) ($p < 0.0001$). Las diferencias de recuentos entre columnas con igual tiempo de estabilización puede ser debido a que las muestras de sedimento utilizadas para la elaboración de las columnas fueron tomadas de lugares diferentes. La diversidad y cantidad de algas que se encuentran en una columna de Winogradsky puede cambiar dependiendo de la muestra de sedimento utilizado (**Esteban et al., 2015**).

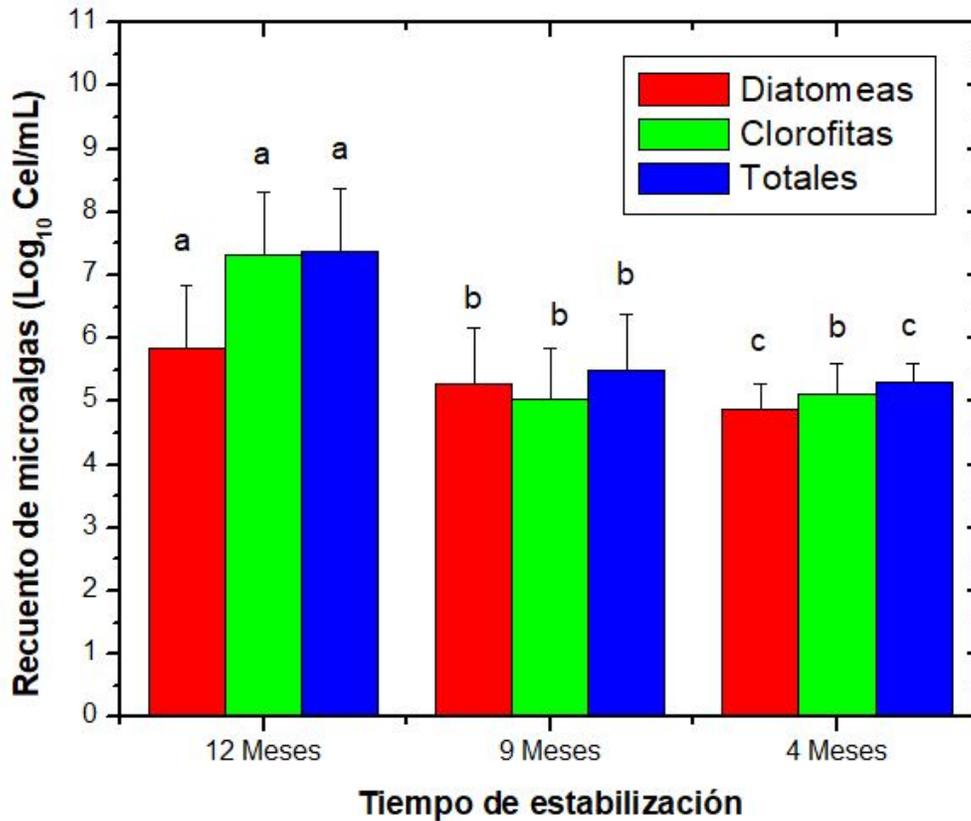


Figura 11. Recuento de microalgas totales según el número de columna y tiempo de estabilización. A) Recuento microalgas totales/ml según el número de columna, B) Recuento Diatomeas/ml según el número de columna, C) Recuento Clorófitas/ml según el número de columna D) Recuento promedio de las columnas con tiempo de estabilización de 12 meses (columnas 1,2 y 3) 9 meses (columnas 4,5 y 6) y 3-4 meses (columnas 7,8 y 9).

9.2 Selección de microalgas mixotróficas con capacidad para crecer en aguas residuales no domésticas pos tratadas en la planta de tratamiento de la Facultad de Ciencias

El primero de los lotes utilizados para la selección de microalgas mixotróficas con capacidad para tolerar y crecer en presencia de aguas residuales no domésticas (ARnD) pos tratadas en la planta de tratamiento de la Facultad de Ciencias fue sometido durante un periodo de 8 días a 4 unidades de tratamiento: Trampa de grasas, reactor biológico con un consorcio fúngico/bacteriano de aireación extendida, sedimentador secundario y filtros de arena cuarcítica. Se realizó caracterización inicial y final a el agua residual no doméstica proveniente de los laboratorios de docencia para conocer la eficacia de la planta de tratamiento y las concentraciones a las cuales serán sometidas las microalgas para la prueba de tolerancia **tabla 7**. El tratamiento en la planta piloto presentó alto porcentaje de remoción **tabla 8**, el más alto fue el de los sólidos sedimentables (99.9 %) seguido por las unidades de color (87,9 %) lo que demuestra la eficacia de las unidades de tratamiento que posee la planta. Sin embargo, aún sigue sin cumplir con la normativa Colombiana, para el vertimiento en el alcantarillado público y a los cuerpos de aguas superficiales con valores de DQO, DBO₅, que superan los límites máximos permisibles, 473.29 mg/ L, 184.00 mg/ L, 119.00 mg/ L respectivamente. El tratamiento terciario con microalgas no solo permite bajar estos parámetros, sino también aquellos que no están contemplados en la normativa colombiana, como las unidades de color y el COT, los cuales presentaron en el efluente los siguientes valores 215.36 UC y 119.00 mg/ L respectivamente. Los colorantes básicos (verde malaquita, rojo congo y cristal violeta) tienen una alta intensidad de color y son muy visibles incluso en muy poca concentración. Sin embargo, al presentar un enlace azo los hace peligrosos debido a la presencia de aminas tóxicas en el efluente (**Hao et al., 2000**). Además, la desaparición o una disminución del color con una diferencia 1028.64 UC en las aguas residuales no significa la mineralización de las moléculas orgánicas del colorante, sino que la mayoría de las veces, la decoloración ocurre cuando se rompe el enlace cromóforo, pero los fragmentos principales de la molécula original permanecen intactos. Por lo tanto, la reducción de TOC y DQO puede ser insignificante incluso para una decoloración completa de las aguas residuales (**Yagub et al., 2014**). Se realizó pruebas de tolerancia de las microalgas a el agua residual previamente caracterizada (**tabla 7**) a diferentes concentraciones 10-50-100 % (v/v).

Tabla 7. Valores finales de parámetros evaluados del agua residual utilizada para la prueba de tolerancia respecto a las resoluciones vigentes: 3957 de 2011 y 0631 de 2011.

Parámetro	Unidades	Agua residual inicial	Agua residual tratada	Resolución 3957 de 2009	Resolución 0631 de 2015
Sólidos totales	mg/L	9430	1195.83	No aplica	No aplica
Sólidos suspendidos totales	mg/L	1755	445.40	600.00	50.00
Sólidos disueltos totales	mg/L	1295	1079.60	No aplica	No aplica
Sólidos sedimentables	mL/L	300	0.30	2.00	1.00
DQO	mg/L O ₂	3388	473.29	1500.00	150.00
DBO ₅	mg/L O ₂	1773	184.00	800.00	50.00
DBO ₅ /DQO	-	0.52	0.388	No Aplica	No Aplica
COT	mg/L	215.00	119.00	No aplica	No aplica
pH	-	6.3	8.02	5.00-9.00	6.00-9.00
Conductividad eléctrica	mS/cm	1.2	1.15	No aplica	No aplica
Unidades de color	UC	1244	215.36	1000.00	No aplica
Recuento de hongos	UFC/mL	2.65 x10 ⁸	3.50 x10 ⁶	No aplica	No aplica
Recuento de bacterias	UFC/mL	5.51 x10 ⁷	6.03 x10 ⁵	No aplica	No aplica

Tabla 8. Porcentajes de remoción planta de tratamiento

Parámetro	Porcentaje de Remoción
Sólidos Totales	82,9 %
Sólidos Disueltos Totales	8,4 %
Sólidos Suspendidos Totales	81,6 %
Sólidos Sedimentables	99,9 %
Color	87,9 %
DBO ₅	79,1 %
DQO	88,9 %

La **figura 12** presenta los resultados del recuento en cámara de las microalgas presentes en las columnas 1-2-3 con concentración de agua residual no doméstica al 10 % (v/v) correspondientes al primer protocolo. El tratamiento que contenía una concentración de ARnD al 10 % (v/v) tuvo mayor crecimiento de biomasa algal con respecto al control, para la columna 1 fue 1.59 veces mejor que el control, para la columna 2 fue 1.75 veces mejor y para la columna 3 fue 1.37, esto se debe a que el tratamiento a diferencia del control contiene agua residual en la que se encuentran formas orgánicas de carbono que pueden ser utilizadas por algas mixotróficas como fuentes de carbono, adicional al CO₂ que fijan por auxotrofia una ventaja que si bien se ve reflejada en velocidades de crecimiento altas para los regímenes heterotróficos y fotoautótrofos acortando los ciclos de crecimiento y produciendo mayor biomasa, fase de crecimiento exponencial prolongado y flexibilidad

para cambiar el régimen de cultivo a heterotrófico o regímenes foto-autótrofos a voluntad (Y. R. Li *et al.*, 2014). Por otro lado, el agua no se encuentra en concentraciones elevadas, por la dilución que se realizó para tenerla en una concentración del 10 % lo que disminuye la toxicidad y los valores de los parámetros fisicoquímicos del efluente **tabla 7**.

Las siembras por superficie en agar provenientes de los tubos que contenían agua residual a una concentración del 10 % (protocolo 1) de las columnas 1-2-3 refleja una disminución en el número de colonias (UFC/ mL) en comparación con el recuento en cámara (microalgas/ mL) **figura 12** y **figura 13A**, esto se explica porque, primero que todo las cajas fueron incubadas en oscuridad a 25°C condiciones que favorece un crecimiento heterótrofo sin capacidad de vivir fotoautotrofia, lo que permite el crecimiento de microalgas únicamente mixotróficas con capacidad de utilizar compuestos orgánicos como sustrato. En segundo lugar, el medio agarizado utilizado no contiene sílice, un compuesto limitante para el crecimiento de las microalgas de la clase diatomea, lo que fue un criterio de selección para eliminar las diatomeas, esto se ve reflejado en la **figura 13** donde solo existe recuento de clorofitas (Bondoc *et al.*, 2016). Por último, pueden existir microalgas que son viables no cultivables, existen microorganismos que generan un estado celular adaptativo, de supervivencia a condiciones ambientales desfavorables, están vivas y con actividad metabólica pero no pueden desarrollar colonias en condiciones de cultivo en que habitualmente podrían crecer (Ducret *et al.*, 2014) lo que de alguna forma explica que solo se haya observado un solo morfotipo como *Chlorella* la cual es mixotrófica cultivable y que géneros como *Euglena* que a pesar de ser mixotrófica no haya crecido en placa.

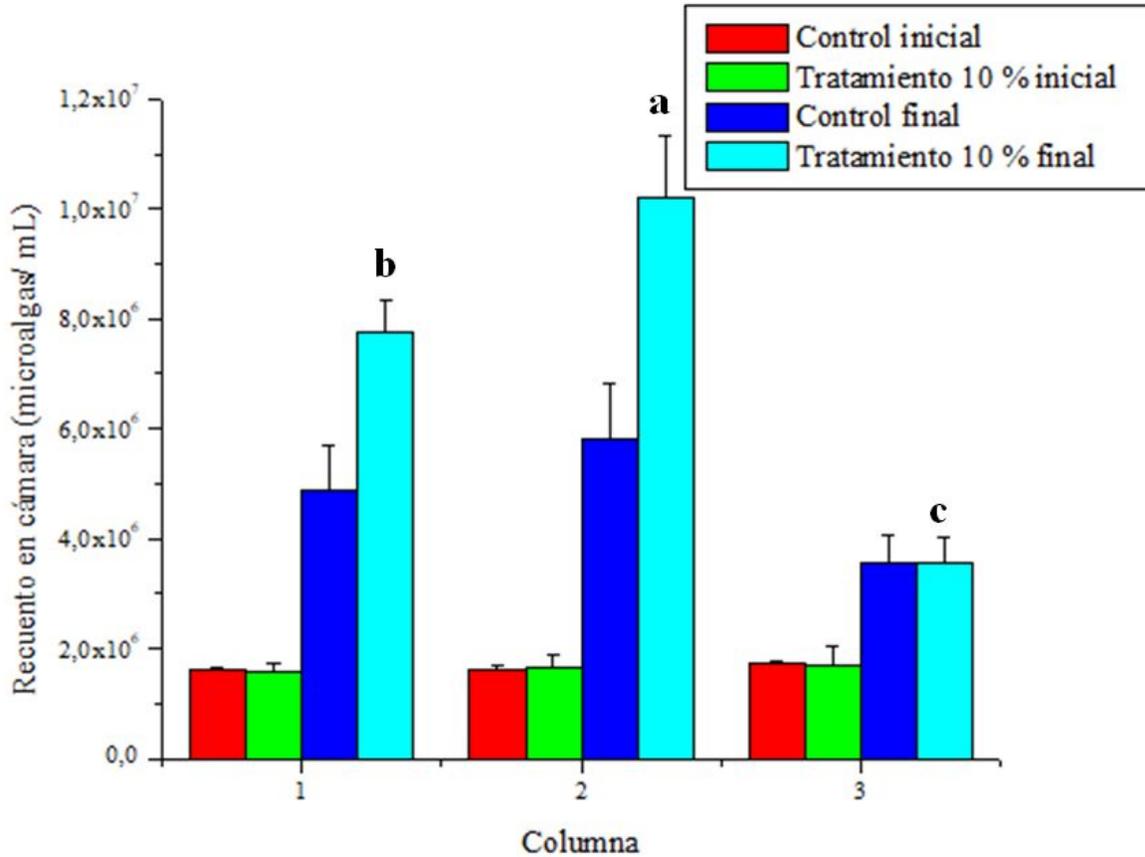


Figura 12. Protocolo número 1 recuento de microalgas totales inicial y final de las 3 primeras columnas en tratamiento con medio Bold líquido y agua residual al 10%.

Las letras presentadas en la figura corresponden a las diferencias estadísticas entre columnas. Siendo la letra a la del mejor recuento, seguido por las letras b y c.

A medida que aumenta la concentración del agua residual disminuye el recuento de clorofitas en placa **figura 13**. Las columnas 1-2-3 son las que presentan mayor tiempo de estabilización y de acuerdo con la **figura 11C** también son las que contienen mayor número de microalgas del filo *Chlorophyta*. En la **figura 13** se presentan los resultados de los recuentos según la concentración de agua residual y el número de columna. Se pudo observar diferencias significativas entre columnas y concentración de agua residual. Determinando que las algas con mayor tolerancia se recuperaron en el agua al 100 % en las columnas 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 9. Los recuentos oscilaron entre 6.9×10^4 y 1.36×10^4 UFC/ mL.

La **figura 14** presenta la macroscopía y microscopía de las algas que pudieron crecer en los medios con 100% de agua residual, se puede observar que estos morfotipos pertenecen al grupo de las clorofitas posiblemente al género *Chlorella* sp debido a ser unicelular con forma esférica sin flagelo y a su conocida resistencia al agua residual (**Hongyang et al., 2011**). Muchos de los mecanismos de resistencia utilizados por las algas para tolerar altas concentraciones de agua residual no doméstica son desconocidas. Sin embargo, según estudios realizados por Osundeko y colaboradores en el año 2013 se demostró que dos especies, identificadas como *Chlorella luteoviridis* y *Parachlorella hussii*, podrían crecer muy bien en aguas residuales sin tratar debido a su gran tolerancia al estrés oxidativo que es altamente inducido por el ambiente de las aguas residuales. Esto se debe a que las microalgas al ser organismos fotosintéticos, las tensiones ambientales desencadenan la excesiva formación y acumulación de especies de oxígeno reactivo intracelular (ROS) como el superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo, que inducen el estrés oxidativo y causan daños a través de la oxidación de los componentes celulares como las membranas. Las células son capaces de mediar en la defensa antioxidante a través de las actividades de diversas enzimas de captación de ROS, como la peroxidasa de ascorbato (APX). Ambas cepas utilizadas en el estudio demostraron ser eficientes en la remediación de nutrientes de las aguas residuales y mostraron valores altos de productividad de biomasa (**Osundeko et al., 2013**)

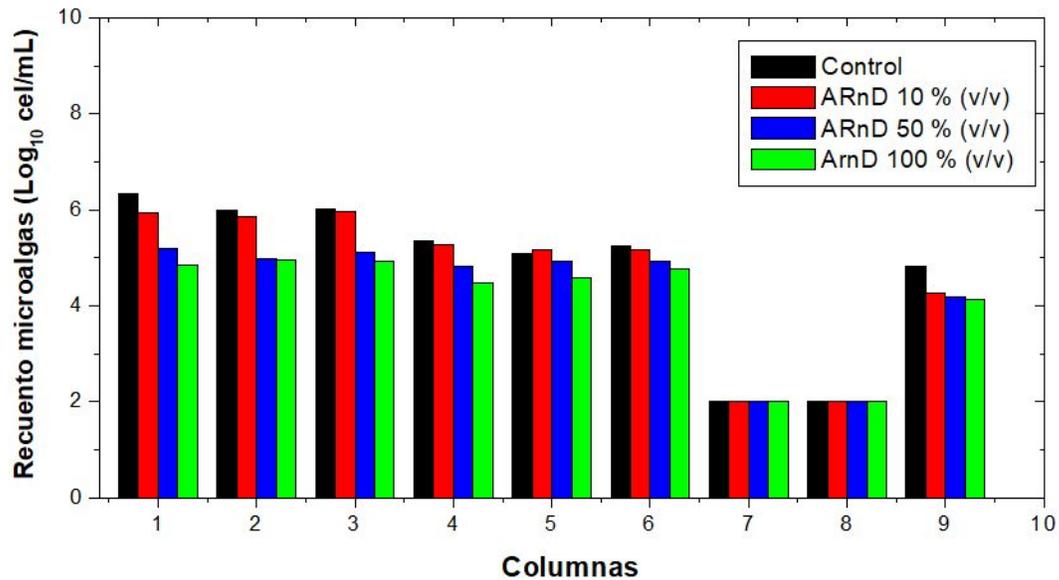


Figura 13. Protocolo 2 recuento en placa de microalgas clorofitas según la concentración de agua residual y el número de columna. A) Recuento en placa de microalgas totales según la concentración de agua residual de las columnas 1,2,3,4,5,6 y 9 B) Recuento en placa de microalgas totales según la concentración de agua residual de las columnas 7 y 8 C) Macroscopía en placa de petri de microalgas resistentes a 100% de agua residual

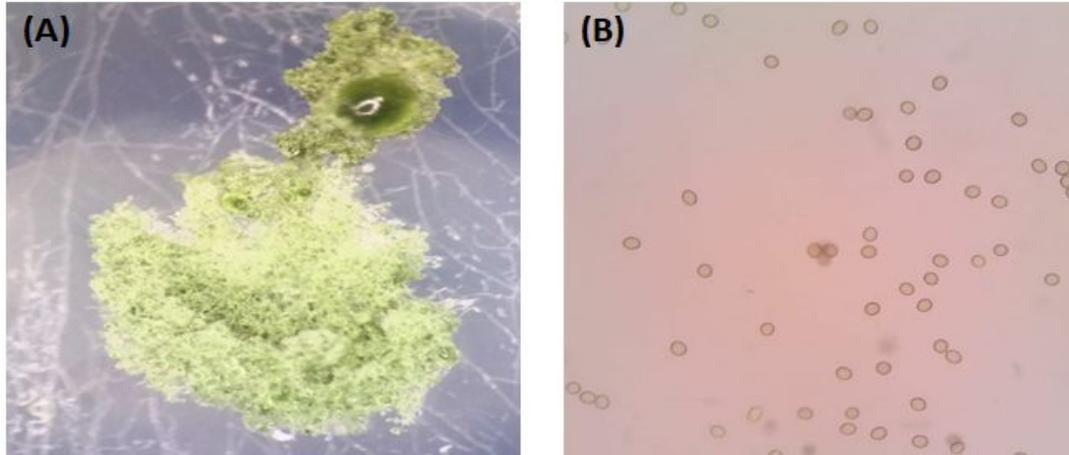


Figura 14. Crecimiento en placa de microalgas resistentes a 100 % de agua residual.

A) Macroscopía del morfotipo resistente a 100 % (v/v) de agua residual **B)** Microscopia del morfotipo resistente a 100 % (v/v) de agua residual

9.3 Montaje de la planta residual y caracterización fisicoquímica de agua residual por 8 días muestreos cada 24 horas

Con el fin de tener suficiente agua residual para el diseño Plackett Burman fue necesario procesar un nuevo lote de agua en la planta piloto de la facultad de Ciencias, el cual fue caracterizado cada 24 horas por 8 días.

Los resultados de la caracterización fisicoquímica del efluente y el afluente se presentan en la **Tabla 9**. Se puede observar que, aunque los parámetros fisicoquímicos han disminuido existen diferentes parámetros que sobrepasan los valores permisibles según las resoluciones 3957 y 0631 que rigen el vertimiento de aguas residuales en Colombia, ejemplo de estos valores que sobrepasaron los límites es el DQO. El afluente presentó un valor de 420 mg/L cuando el valor máximo permitido por la resolución 0631 es 150 mg/L.

Tabla 9. Caracterización fisicoquímica del efluente y afluente. Se observan los valores de los parámetros fisicoquímicos del agua antes de ingresar a la planta de tratamiento (efluente) y después de haber sido tratada por la planta por 8 días.

Parámetro	Efluente	Afluente	Resolución 3957 Valor máximo	Resolución 0631 (Artículo 8) Valor máximo
Sólidos Suspendidos Totales (mg/L)	40	79	600	70
Sólidos Sedimentables (ml/L)	0,3	0	2	5
pH	5,04	6,92	5,0-9,0	6,0-9,0
UC	4303	369	1000	ND
DQO	3410	420	1500	150
COT	-	67,22	ND	ND

En la **Figura 15** se presentan los resultados de los parámetros fisicoquímicos evaluados en función del tiempo. Las unidades de color disminuyeron comenzando en la hora 0 con 4303 UC y terminando el tratamiento después de 168 horas con 368,86 UC. Estos valores obtenidos estuvieron por debajo de los límites máximos permisibles para el vertimiento puntual (Resolución 3957 de la secretaría distrital de ambiente) demostrando la eficiencia

del consorcio fúngico/bacteriano en el proceso de remoción después de 8 días. En el proceso de biotransformación del colorante por parte del consorcio existió una alta eficiencia de remoción, esto podría ser porque diferentes estudios han demostrado que existe una reacción sinérgica entre hongos y bacterias que aumenta la tasa de decoloración (**Agunbiade *et al.*, 2017**). En lo que respecta a los hongos de podredumbre blanca usados en el consorcio, la diversidad de especies utilizadas le brindó al tratamiento una diversidad metabólica que fue esencial para poder conseguir un porcentaje alto de remoción de color. Los resultados de las UC iniciales y finales se presentan en la **figura 15B**, se puede observar una alta eficiencia de disminución, este hecho resulta de la acción conjunta de la batería enzimática de lacasas, manganoso peroxidasas y lignino peroxidasas que poseen los hongos empleados en el consorcio, estas enzimas debido a que no presentan especificidad por el sustrato pueden degradar compuestos estructuralmente parecidos a las moléculas aromáticas naturales sobre las cuales actúan por ejemplo la lignina, los colorantes de Gram (Fucsina y cristal violeta), así como el verde de malaquita que tienen una estructura constituida por tres anillos aromáticos (**Forgacs *et al.*, 2004**). Con respecto a las bacterias utilizadas, estas llevaron a cabo mediante enzimas procesos de hidroxilación y oxidación de los componentes intermediarios que se produjo por el metabolismo de los hongos.

Adicionalmente, la degradación enzimática de los colorantes está altamente influenciada por su estructura. Los colorantes azoicos y triarilmetánicos como es el caso de los colorantes de Gram, tienen compuestos xenobióticos deficientes de electrones que debido a su enlace azo ($-N=N$), lo que hacen que el colorante sea menos susceptible a la degradación por los microorganismos. Sin embargo, bajo condiciones apropiadas, pueden ser degradados por enzimas del tipo reductasas (**Tomei *et al.*, 2016**), lo que sugiere que los microorganismos utilizados en el consorcio poseían este tipo de enzimas y estaban en las condiciones apropiadas ya que el porcentaje de remoción fue alto.

Como se mencionó anteriormente el otro mecanismo involucrado en la remoción de color aparte de la biotransformación es la adsorción que realizan hongos y bacterias, pues estos microorganismos son capaces de retener los colorantes en su biomasa mediante

mecanismos de intercambio iónico, precipitación, atrapamiento en espacios interiores de la biomasa, fuerzas físicas y la formación de enlaces de hidrógeno (**Wanyonyi et al., 2017**).

Sin embargo, existe la necesidad de comentar que los hongos son los principales microorganismos que llevan a cabo esta acción debido a la dimensión de sus estructuras de crecimiento que les brinda más superficie de contacto con colorantes y las características estructurales de su pared.

Por otro lado, en la resolución 0631, la cual aplica para el territorio nacional, no se reportan valores de unidades de color específicas, sólo se informan las absorbancias medidas a diferentes longitudes de onda (436 nm, 525 nm y 620 nm). Igualmente, en la **figura 16** se muestra las absorbancias medidas a 551 nm del efluente y del afluente, se pudo evidenciar que existió valores inferiores al final del tratamiento, esto se debe como se mencionó anteriormente a la capacidad de remoción basada en la adsorción de la biomasa tanto fúngica como bacteriana y la biotransformación principalmente por acción de las enzimas y sus mecanismos mencionados anteriormente.

Como se observa en la **figura 15A.**, las concentraciones de sólidos sedimentables y suspendidos se lograron disminuir pasados los 8 días de tratamiento; monitorear las cargas de sólidos es importante, porque permite evaluar el grado de contaminación del agua residual y determina la eficiencia de la planta de tratamiento (**Verma et al., 2013**). Los sólidos pudieron haber disminuido por el uso de las unidades de la planta de tratamiento como son el sedimentador, los filtros de carbón activado y arena cuarcítica, ya que, en estas operaciones, los sólidos se acumulan en el fondo del sedimentador por efectos la gravedad. Después, aquellos sólidos que no sedimentaron, al atravesar los filtros de carbón activado y arena cuarcítica, son adsorbidos por la superficie de estos compuestos y eliminados del agua a tratar. Por otro lado, no se logró cumplir con lo establecido en la norma 0631 de 2015 para sólidos suspendidos (50 mg/L); pero, si con lo determinado por la resolución 3957 de 2009 (600 mg/L)

Con respecto a los valores del pH la **tabla 9** muestra los valores obtenidos para el pH, cuando se comparan estos valores con lo establecido por la ley colombiana, se puede apreciar que el efluente cumple con los parámetros de pH, ya que los valores se encuentran dentro de los límites máximos para el vertimiento de aguas residuales en la ciudad de Bogotá (pH: 6-9). Como se puede ver en la **figura 8A** el pH presentó algunos descensos lo que pudo haber favorecido procesos de adsorción. El pH ácido tiende a favorecer la eliminación del colorante debido al cambio de estado de ionización de la molécula del colorante y su interacción con los sitios activos de la pared celular. Las posibles explicaciones de este fenómeno se basan en dos teorías propuestas por varios autores. La primera está asociada a la carga adquirida por los grupos funcionales de la biomasa fúngica a pH ácido. Cuando esto sucede y el medio es ácido, los colorantes adquieren una carga positiva, pasa lo contrario con los grupos carboxílicos de la pared de los microorganismos, estos son neutros o tienen una carga negativa. Estos grupos descritos con cargas opuestas podrían estar participando en la adsorción de colorante a pH ácido. (**Daâssi et al., 2013; Puentes et al., 2015; Morales-Álvarez et al., 2016**). Con respecto a la segunda teoría hace referencia al fenómeno probable de la adsorción química en centros activos o ligandos sin carga, estos permitirían formar pares iónicos permitiendo la neutralización de cargas en especies adsorbidas, superando la repulsión electrostática (**Lin et al., 2011; Sarkar et al., 2014**).

Adicionalmente la **figura 15B** muestra los valores de DQO tomados cada 24 horas durante 8 días, se inició en la hora 0 con 3410 mg/L y se finalizó en la hora 168 con 420 mg/L, esta disminución pudo ser debido a que la mayor parte de la materia orgánica a degradar ya fue transformada por el consorcio y los intermediarios generados pueden ser altamente estables y de requieren de procesos adicionales (**Vijayaraghavan & Balasubramanian, 2013**). De acuerdo con la norma 0631 de 2015, el agua no cumple con estos parámetros ya que se encuentran por encima de los límites permitidos (DQO=150 mg/L), lo que indicaría que se necesita un tratamiento adicional acoplado a la planta para poder llegar a cumplir con la resolución. En cuanto a la resolución 3957 de 2009, que dicta los parámetros que deben cumplir los vertimientos realizados en el distrito capital, el agua tratada si cumple con los

valores propuestos ya que se encuentra por debajo de los límites permitidos (DQO=1500 mg/L).

Finalmente en cuanto a los valores del COT, la **tabla 9** muestra el valor de COT en el afluente, aunque no se hizo medición inicial de este parámetro comparándolo con el valor de DQO el valor de COT correspondió al 16% del valor de DQO, el valor del carbono orgánico se encuentre entre un intervalo del 10- 30 % del valor de la demanda química de oxígeno, lo que indicaría que el valor de COT fue relativamente bajo comparándolo con el de DQO, esto podría indicar el carbono orgánico disminuyó en mayor proporción que el carbono inorgánico, ya que la técnica de COT mide únicamente el carbono orgánico. Adicionalmente Hayat et al. 2015 mostraron que la concentración de los colorantes influye en los procesos de decoloración y por tanto en la disminución de los valores del COT, ya que se requieren diluciones del agua (**Wanyonyi et al., 2017**).

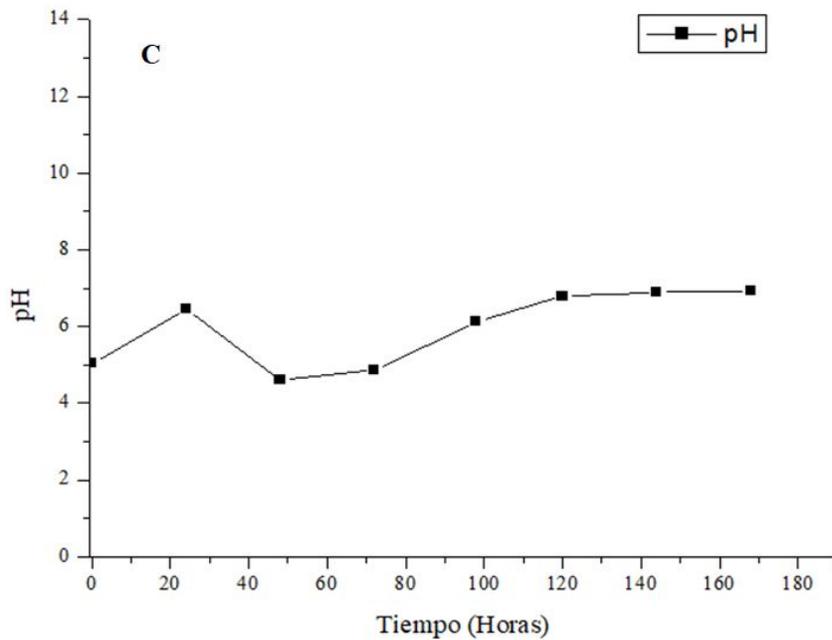
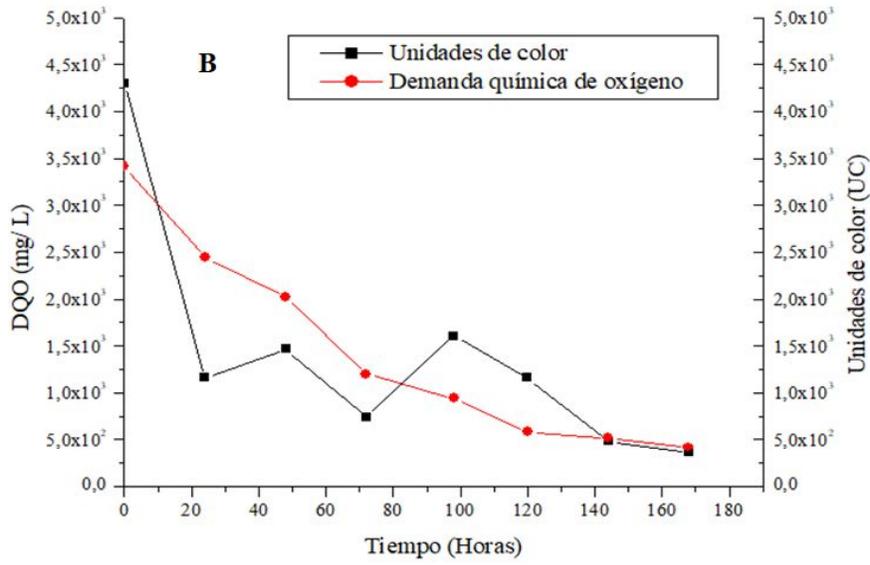
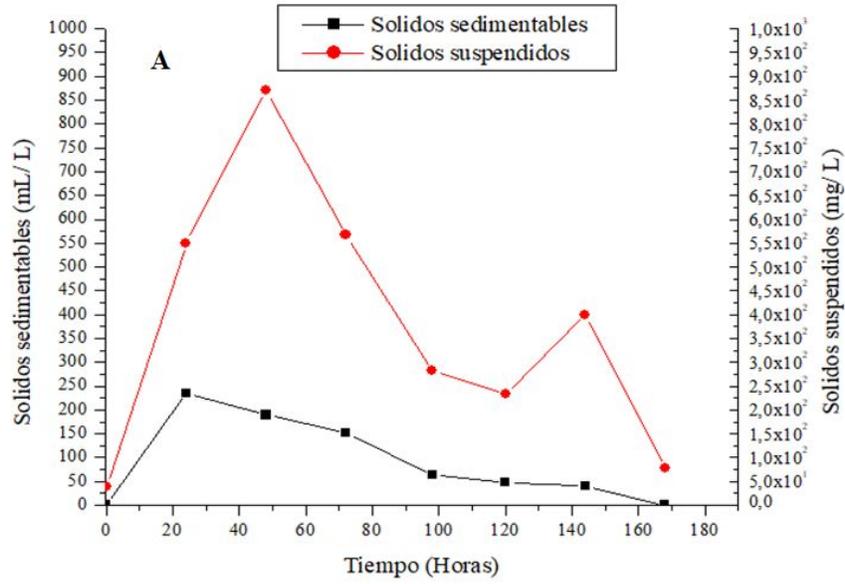


Figura 15. Unidades de color, DQO, sólidos sedimentables, sólidos suspendidos, pH, en la planta de tratamiento durante 168 horas de operación. A) sólidos sedimentables y sólidos suspendidos en función del tiempo B) DQO en función del tiempo y unidades de color en función del tiempo C) pH en función del tiempo

9.4 Curvas espectrales de diseño experimental de paso descendente.

En la **Figura 16** se presentan las curvas espectrales del efluente y afluente, se determinó que el máximo de adsorción en el rango visible en el efluente fue a 551 nm. Al inicio del proceso se presentaron valores de 1,2 UA cuando se leyó a 551 nm; sin embargo, la intensidad de la señal fue disminuyendo en el tiempo, obteniendo un valor de 0 UA a los 8 días de tratamiento leyendo a 551 nm, lo que demuestra que se llevó a cabo un proceso de mineralización que pudo estar mediado por enzimas y procesos de adsorción por parte del consorcio fúngico/bacteriano usado en el reactor biológico (**Morales *et al.*, 2016**). Las señales leídas correspondientes a 551 nm posiblemente corresponden a la presencia del colorante cristal violeta, el cual absorbe a esa longitud de onda (**Singh *et al.*, 2011**)

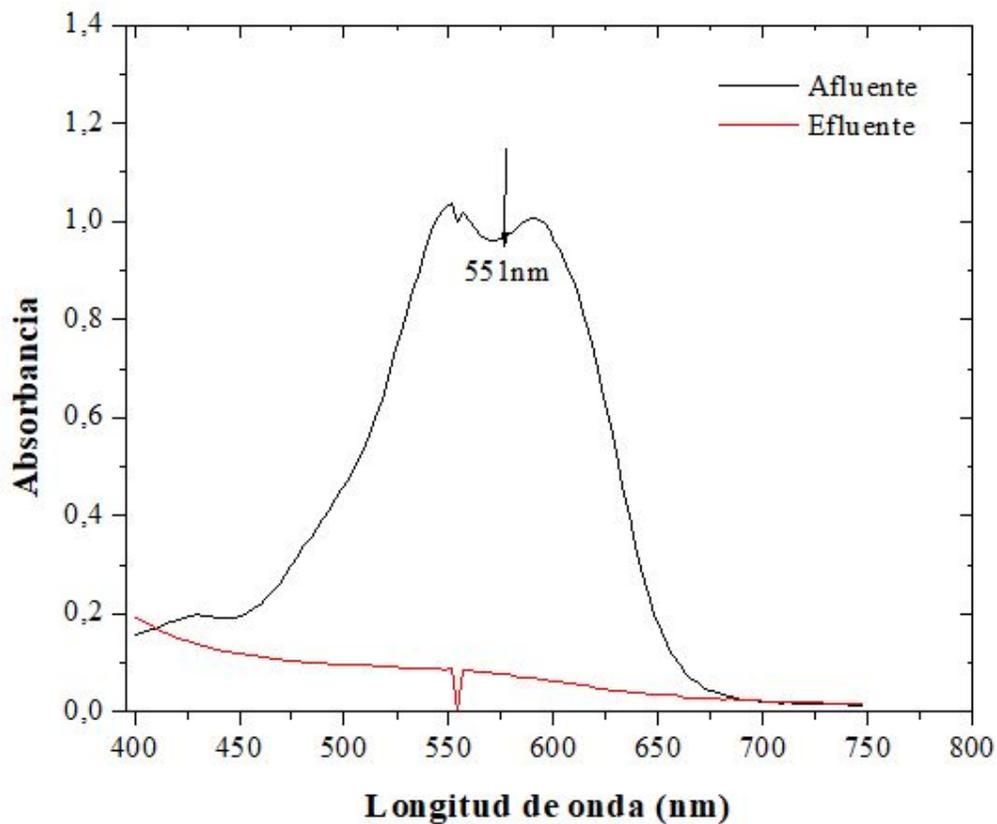


Figura 16. Curvas espectrales del efluente y afluente de la planta de tratamiento.

9.5 Confirmación de la presencia de las microalgas seleccionadas de la prueba de tolerancia en el inóculo de *Plackett Burman*

Este experimento se realizó para poder confirmar que el inóculo que se utilizaría para los diseños experimentales del Plackett Burman poseía las algas seleccionadas en la prueba de tolerancia. En la prueba de tolerancia se realizó el aislamiento y purificación del morfotipo que creció en el agar medio Bold con agua residual al 100%, en estos medios sólo creció un morfotipo, el cual por claves taxonómicas se propuso que pertenecía al género *Chlorella*.

En la **figura 19A y 19B** muestra la microscopía del morfotipo seleccionado en la prueba de tolerancia y la de las microalgas provenientes del inóculo de plackett burman luego de haber crecido en las mismas condiciones que las de la prueba de tolerancia. Se puede observar que las dos morfologías son idénticas, poseen una forma esférica, no poseen flagelos y su coloración es verde, esta descripción coincide con el género *Chlorella* (S *et al.*, 2006; Wehr & Sheath, 2015) el cual tiene una alta resistencia al agua residual y se lo ha usado en diversos estudios para tratamiento de este tipo de aguas (Kim *et al.*, 2013; Pathak *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2011). Adicionalmente, en la **figura 19C** se puede observar la macroscopía del morfotipo seleccionado en la prueba de tolerancia, al compararlo con el morfotipo que se obtuvo de la prueba de comprobación es evidente que existe mucha similitud entre las colonias, siendo estas amorfas verde oscuro aterciopelados y centro blanco. Finalmente debido a las similitudes microscópicas y macroscópicas entre los dos morfotipos se puede asegurar que en el inóculo de plackett burman si contaba con las microalgas seleccionadas en la prueba de tolerancia al agua residual

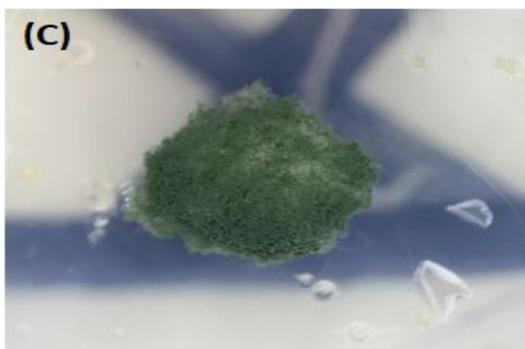
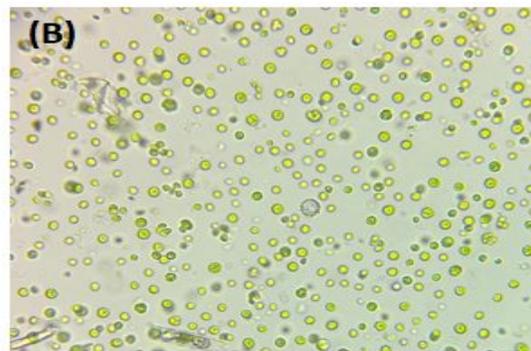
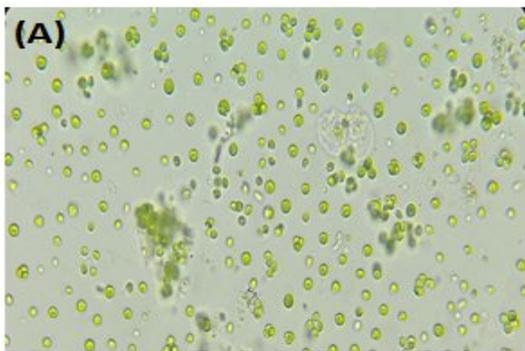


Figura 17. Confirmación de algas con tolerancia al agua residual al 100% (v/v) A) Microscopia de las algas seleccionadas en la prueba de tolerancia **B)** Microscopía de las microalgas del inóculo de Plackett Burman creciendo en mismas condiciones que las microalgas seleccionadas en las pruebas de tolerancia **C)** Macroscopía de las algas seleccionadas en la prueba de tolerancia **D)** Macroscopía de las microalgas del inóculo de Plackett Burman creciendo en mismas condiciones que las microalgas seleccionadas en las pruebas de tolerancia.

9.5 Resultados diseño Factorial Plackett Burman con tres puntos centrales

De acuerdo con el análisis de varianza para la variable de respuesta remoción de DQO, se puede observar en el diagrama de Pareto (**Figura 18A**) que los factores influyentes fueron C, F, E y B, los cuales estuvieron por encima del límite del valor de t en la gráfica. En relación con el ajuste aplicado para esta variable, el modelo de regresión fue significativo ($R_2 = 0.86$ y $p = 0.092$) y con una presión adecuada de 9.32, siendo superior a 4.0 y permite navegar en el modelo. Los factores que tuvieron los mayores porcentajes de contribución y sus respectivos valores de p fueron: El tiempo (34 % de contribución y $p = 0.037$), iluminación (13.5 % contribución y $p = 0.031$), porcentaje de inóculo (12.6 % de contribución y $p = 0.036$) y oxígeno (11.2 de contribución y $p = 0.044$) (**tabla 10**).

Al analizar los resultados de la segunda variable de respuesta (Peso seco de las microalgas), el diagrama de Pareto permite evidenciar que los factores influyentes fueron solamente B, C y E (las barras están por encima del límite del valor de p) (**figura 18 B**). El R_2 para este modelo fue de 0.77, con un valor de $p = 0.047$ y precisión adecuada de 6.82. Los factores significativos se obtuvieron valores de p y porcentajes de contribución de: 0.026, 0.041, 0.046, 26 %, 20 % y 18 %, para la aireación, tiempo y porcentaje de inóculo respectivamente (**tabla 10**).

El recuento de microalgas expresado como células/mL, el modelo no fue significativo ($p = 0.199$), esto se hizo evidente en el diagrama de Pareto (**figura 18 C**), en el cual se puede evidenciar que solamente el factor B estuvo por encima del límite del valor de t. Para este

factor (aireación) el valor de p fue de 0.033 y el porcentaje de contribución fue de 5.8×10^{-4} . Bajo las condiciones para esta variable de respuesta todas las variables podrían ser utilizadas en sus niveles bajos (**tabla 10**).

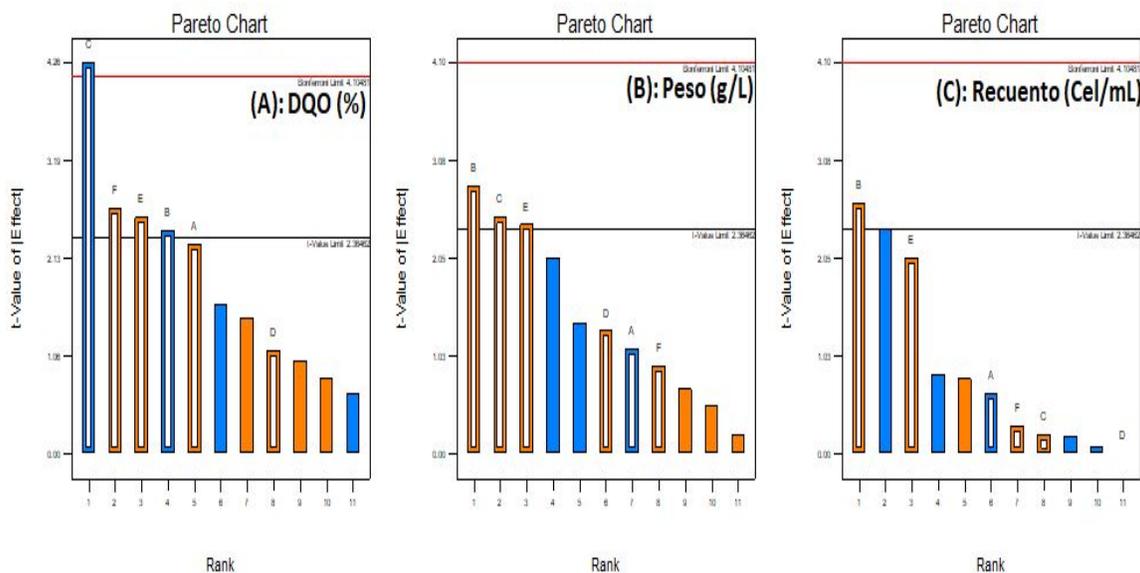


Figura 18. Diagramas de Pareto asociados a las variables de respuesta. (A) Porcentaje de remoción DQO (B) Peso seco de microalgas (g/L) (C) Recuento (Cel/mL).

Tabla 10. Análisis de varianza y coeficientes de regresión para porcentaje de remoción DQO, peso seco biomasa algal (g/L) y recuento de microalgas (Células/mL).

Facto	Remoción DQO (%)			Peso seco biomasa algal (g/L)			Recuento microalgas (Células/mL)		
	Valor p	Contribución	Efecto estandarizado	Valor p	Contribución	Efecto estandarizado	Valor p	Contribución	Efecto estandarizado
Modelo	0.0092		6.8	0.047		0.72	0.199		6.3
A pH	0.056	9.9	8.11	0.30	3.9	-0.17	0.54	1.9	-0.071

B O₂	0.044	11.2	-0.017	0.026	26	8.8x10 ⁻⁴	0.033	32.8	5.8x10 ⁻⁴
C Tiempo	0.0037	34.4	-3.0	0.041	20	0.078	0.84	0.19	4.5x10 ⁻³
D Nutrientes	0.29	2.4	8.1	0.23	5.4	0.41	0.00	4x10 ⁻⁴	-2.1x10 ⁻³
E Inóculo	0.036	12.6	9.6	0.046	18	0.40	0.074	19.9	0.24
F Iluminación	0.031	13.5	0.019	0.38	2.8	3x10 ⁻⁴	0.77	0.41	6.6x10 ⁻⁵
Precisión	9.32			6.82			4-2		
Curvatura	0.28			0.63			0.15		
CV	21			22			5		
R²	0.86			0.77			0.62		

En la **figura 19A** se observan los resultados para remoción de DQO, peso seco y recuento de células, en función de los 12 tratamientos evaluados. Con respecto a la DQO se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.0001$), siendo T1 y T7, en los que se removió mayor cantidad de DQO obteniendo 81 % y 63 %, partiendo de (427 mg/L y 420 mg/L iniciales). En la producción de biomasa algar expresada como g/L, también se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.0001$) siendo el T2, T1 y T10, en los que más biomasa se produjo a expensas de ARnD obteniendo valores de 3.04, 2.85 y 2,71 g/L (**Figura 19B**) con una productividad de 0,152, 0,285 y 0,135 g/día respectivamente. Los tratamientos 1 y 10, comparten grupos con el tratamiento 2 (letra compartida a), lo que demuestra que a su vez entre ellos no existen diferencias significativas ($p > 0.0001$), lo que determine que para la producción de biomasa cualquiera de ellos podría ser utilizado. Sin embargo, al emplear el T2 se necesitan 20 días de proceso para obtener un valor de biomasa similar al obtenido en tan solo 10 días de proceso.

Con respecto al recuento de células por mL, se observaron diferencias significativas ($p < 0.0001$) siendo T2 y T1 los mejores tratamientos con valores de 7.6 y 7.2, expresados como \log_{10} de células/mL. A su vez entre estos dos no se observaron diferencias significativas ($p > 0.0001$) (**figura 19C**).

Al analizar las tres variables de respuesta se determinó que las condiciones evaluadas en el tratamiento 1, que permite el cultivo de las microalgas a un pH de 7.0, 1000 mL/L de aireación, con solución de nutrientes del Bold CaCl_2 (25 mg / L), NaCl (25 mg/L), NaNO_3 (250 mg/L), MgSO_4 (75 mg/L), KH_2PO_4 (105 mg/L), K_2HPO_4 (75 mg/L) , 4 % v/v de inóculo, 1000 lux y 10 días de proceso. Son las que favorecen la remoción de DQO, producción de biomasa y recuento de células.

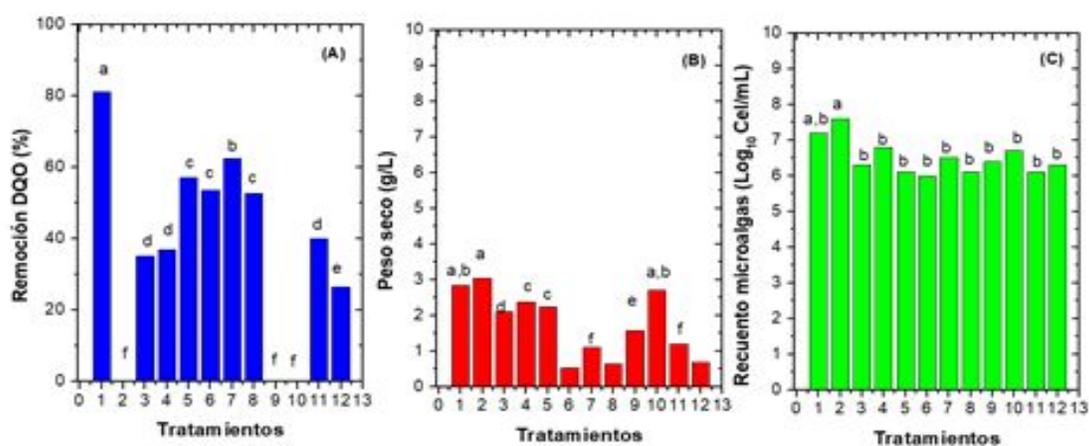


Figura 19. Variables de respuesta del diseño experimental Plackett Burman según el tratamiento. A) % de remoción de DQO. B) Peso seco (g/L). C) Recuento de microalgas (\log_{10} Cel/mL).

En el tratamiento 1 se utilizó una intensidad de luz de 1000 lux, esta intensidad de luz es la reportada en la literatura como la más adecuada para volúmenes entre 500 mL y 1,5 L, los tratamientos experimentales se realizaron en microcosmos con capacidad de 0,75 L por lo que la intensidad de luz utilizada fue la más adecuada. La intensidad de la luz afecta la

síntesis de clorofila y el crecimiento de microalgas debido a que de esta depende el desarrollo de los cloroplastos y la expresión génica de enzimas claves relacionadas a rutas metabólicas esenciales para el crecimiento como el ciclo de Calvin **(Su et al., 2014)**. Para que se puede realizar el ciclo de Calvin se necesita un ciclo en el que exista oscuridad, en los tratamientos realizados en el *Plackett Burman* se realizaron ciclos de luz/oscuridad de 12:12. Un aumento en la cantidad de algas en el medio trae consigo una mayor descomposición de materia y un aumento en la remoción de DQO. La intensidad de luz utilizada en el tratamiento 1 ha sido utilizada en otros estudios como el de Babaei y Shayegan en el año 2018, ellos cultivaron mixotroficamente a *Chlorella vulgaris* dentro de un fotobiorreactor de 1.5L, para el cual utilizaron una intensidad de luz de 1000lx obteniendo altas productividades de biomasa **(Babaei & Shayegan, 2018)**

Con respecto al tamaño del inóculo utilizado, este tiene influencia significativa en la eliminación de DQO de las aguas residuales ya que los inóculos más concentrados como el utilizado en el tratamiento 1 (4% (v/v)) permiten la eliminación de materia orgánica en tiempos más cortos que los tratamientos con menos inóculo inicial **(Cordero & Voltolina, 1997)**. Adicionalmente a la remoción más rápida de materia orgánica del medio, los cultivos más concentrados tienen una mayor tasa de crecimiento los primeros días que los cultivos con inóculos poco concentrados. Aunque un inóculo alto y una alta tasa de crecimiento pueden provocar altas densidades celulares que traen consigo problemas como el auto-sombreado y la acumulación de auto inhibidores, en el tratamiento 1 el uso de un tiempo de retención corto (10 días) y una mezcla constante por aireación evitó que ocurriera estos problemas relacionados a las altas densidades poblacionales.

La influencia positiva de un tiempo de retención de 10 días y la alta productividad puede ser debido a que los tiempos de retención corto aumentan la velocidad de toma de nutrientes por parte de las algas y con esto su velocidad de crecimiento **(Marbelia et al., 2014)**. Sin embargo, cuando la densidad de algas es muy alta se crea a auto sombreado, una acumulación de auto inhibidores, y una reducción en la eficiencia en la fotosíntesis y en la

división celular (**Fogg, 1975; Darley, 1982**). Los cortos tiempos de retención evitan este problema ya que a pesar de tener una alta productividad no se alcanza a tener una densidad suficientemente alta para provocar los problemas mencionados. Adicionalmente, en los tiempos de retención cortos se evita la acumulación de algas muertas, las cuales al descomponerse aumentan el DQO en el medio (**Khan & Ansari, 2005**), lo que se hizo evidente en la mitad de los tratamientos de retención altos (20 días) (**Khan & Ansari, 2005**). En el tratamiento 1 se aplicó un tiempo de retención corto y se suplemento nutrientes del medio de Bold, esto pudo ser uno de los factores que influyeron en que este tratamiento sea el que alcanzó mayor productividad ya que un tiempo de retención bajo junto con un carga de nutrientes alta aumentan la productividad en los cultivos de microalgas (**Honda et al., 2017**). En el año 2014 Ficara y colaboradores probaron diferentes tiempos de retención para cultivos de microalgas, en su estudio se demostró que a los 10 días fue el tiempo en el que mayor productividad se alcanzó (**Ficara et al., 2014**).

Como se mencionó anteriormente en el tratamiento 1 se utilizaron las sales del medio basal de Bold que es reportado como un medio para enriquecimiento de clorofitas en especial las algas del género *Chlorella sp*, el cual fue el género que se encontró en mayor cantidad en el inóculo del Plackett Burman, según autores como Wong y colaboradores la productividad y la tasa de crecimiento cuando se usa este medio es significativamente mayor que en otros medios llegando a ser hasta 3 veces mayor, esta alta productividad está estrechamente relacionada con la biomasa algal y el recuento de células porque entre mayor productividad mayor será el número de células y la biomasa algal. Adicionalmente esta alta densidad de microalgas en el medio podría estar relacionada con la disminución de DQO ya que entre más algas están presentes en el medio mayor consumo de materia orgánica existirá (**Wong, 2017**).

Otro factor que pudo haber influido en que el tratamiento 1 haya sido el mejor es la aireación que se le suplemento. El oxígeno es necesario para la mayoría de microalgas ya que sin este no se puede realizar la respiración aerobia necesaria para el crecimiento de las

microalgas, el tratamiento 1 estaba dentro del grupo de tratamientos que mayor aireación se le suministro (1000ml/L), esto pudo haber sido un problema debido a que las altas concentraciones de oxígeno pueden inhibir la fijación de carbono por parte del enzima RuBisCo (**Kroth, 2015**). Sin embargo, el modo de cultivo utilizado en este tratamiento fue de mixotrofia, por lo que el oxígeno en exceso que pudo haber existido fue reducido durante el metabolismo heterotrófico evitando que llegue a concentraciones tóxicas (**Zappi, 2015**). Adicionalmente la aireación suplementada permitió la agitación y mezclado del cultivo, esto es muy importante para evitar la sedimentación de las algas, asegurar que todas las células de la población están igualmente expuestas a la luz y los nutrientes y para mejorar el intercambio de gases entre el medio de cultivo y el aire (**FAO, 2010**). En un estudio realizado por Gris y colaboradores en el año 2003 se alcanzó altas productividades de biomasa suplementando 1000 ml/L de aireación (**Gris et al., 2013**)

Finalmente, el pH que se utilizó en el tratamiento 1 fue de 7, el rango de pH ideal para el cultivo de microalgas en modo mixotrófico es entre 7 y 9 (**FAO, 2010**) por lo que el pH utilizado entra en este rango óptimo. El tratamiento 1 obtuvo una productividad de 3.04 g/día siendo esta la más alta entre todos los tratamientos, el pH utilizado pudo haber tenido influencia en esto debido a que este factor afecta de manera importante a la actividad enzimática y también puede influir en el crecimiento celular y el metabolismo de microalgas cultivadas bajo condiciones mixotróficas (**Mori et al.,2013**).

El uso de pH 7 ha sido reportado por varios autores como el mejor para alcanzar altas productividades de biomasa según los estudios realizados por Rai et al (2015) el pH 7 puede aumentar hasta un 30 % la productividad (**Rai et al., 2015**). Con respecto al pH y la remoción de DQO se conoce que este factor podría influir en la absorción de diferentes tipos de fuentes de carbono por algunas algas, la materia orgánica que se encuentra en el agua residual sirve de fuente de carbono para las algas por lo que sí existe un pH óptimo la absorción de esta materia orgánica será mayor lo que reduciría el DQO en el agua. Algunos autores han reportado que el pH óptimo para la remoción de DQO es 7, en un estudio realizado por Hernández et al en el año 2016 se documentó que la remoción del DQO fue

mayor cuando se usó pH 7 que cuando se utilizó otros valores de pH (**Hernández et al., 2016**).

La remoción de color se determinó a las longitudes de onda de 292 nm, 398 nm, 436 nm, 524 nm y 621 nm, Las cuales fueron seleccionadas de acuerdo con los resultados de las curvas espectrales y estipulado por la resolución 0631 del 2015, que indica las tres longitudes de onda a las que debe leerse el color y debe reportarse. No existe un valor máximo permisible, por lo tanto, se determinó el porcentaje de decoloración para cada una de ellas calculando con respecto a la inicial.

De acuerdo con el análisis de varianza para la variable de respuesta porcentaje de decoloración a la longitud de onda 292 nm, se puede observar que el modelo no fue significativo ($p= 0,14$) esto se hizo evidente en el diagrama de Pareto (**figura 20A**) donde se puede observar que ninguno de los factores estuvo por encima del límite del valor t. En relación con el ajuste aplicado para este variable, el modelo de regresión no fue significativo ($R^2 = 0.66$ y $p = 0.14$) sin embargo se presentó una precisión de 4,72, siendo superior a 4.0 lo que permite navegar en el modelo (**tabla 117**).

Al analizar los resultados de la segunda longitud de onda que fue 398 nm, el diagrama de Pareto permite evidenciar que únicamente el factor F (iluminación) fue influyente ya que este fue el único que estuvo por encima del límite del valor t (**figura 20B**). El R^2 para este modelo fue de 0.73, con un valor de $p = 0.074$ siendo no significativo adicionalmente la precisión fue de 5,86 siendo adecuada (**tabla 11**). Para el factor F (iluminación) el valor de p fue de 0,013 y el porcentaje de contribución fue de 34,53

En cuanto al porcentaje de decoloración a la longitud de onda de 436 nm el modelo tampoco fue significativo ($p = 0.314$), esto se hizo evidente en el diagrama de Pareto (**figura 19C**) en el cual se puede evidenciar que ningún factor fue influyente debido a que ninguno superó el límite del valor t. El R^2 para este modelo fue de 0,555 y su precisión de 4,35 (**tabla 11**).

Los resultados de la cuarta longitud de onda 524 nm, el diagrama de Pareto permite evidenciar que únicamente el factor D (nutrientes) fue influyente ya que este fue el único

que estuvo por encima del límite del valor t (figura 21D) aunque por un valor muy cercano muy cercano al límite. El R² para este modelo fue de 0.607, con un valor de p = 0.229 siendo no significativo, adicionalmente la precisión del modelo fue de 4,742 siendo adecuada. Para el factor D (nutrientes) el valor de p fue de 0,0435 y el porcentaje de contribución fue de 33,89 (**tabla 11**).

Finalmente, para el modelo de la quinta longitud de onda que fue 621 nm el modelo no fue significativo (p=0,311) esto se hizo evidente en el diagrama de Pareto (**figura 20 E**) en el cual se puede evidenciar que ningún factor fue influyente debido a que ninguno supero el límite del valor t. El R² para este modelo fue de 0,557 y su precisión fue de 3,625 siendo el único modelo de decoloración que estuvo por debajo de 4 indicando que no se puede navegar por el modelo (**tabla 11**).

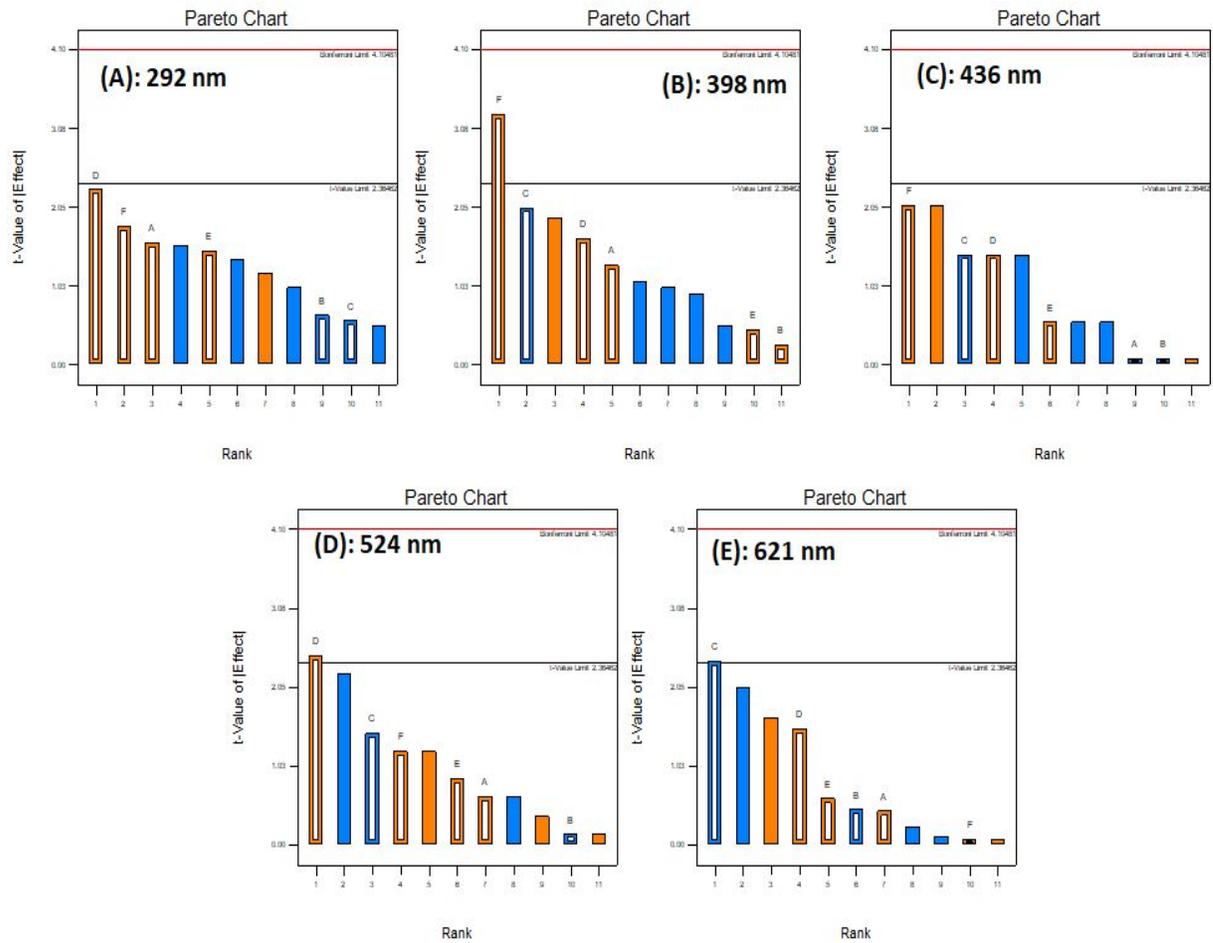


Figura 20. Diagramas de Pareto asociados con las diferentes longitudes de onda para determinar el efecto de los factores sobre el porcentaje de decoloración. (A) Porcentaje de decoloración a 292 nm. (B) Porcentaje de decoloración a 398 nm. (C) Porcentaje de decoloración a 436 nm. (D) Porcentaje de decoloración a 524 nm. (E) Porcentaje de decoloración a 621 nm.

Tabla 11. Análisis de varianza y coeficientes de regresión para porcentaje de decoloración a diferentes longitudes de onda.

Factor	Decoloración a 292 nm (%)			Decoloración a 398 nm (%)			Decoloración a 436 nm (%)		
	Valor p	Contribución	Efecto estandarizado	Valor p	Contribución	Efecto estandarizado	Valor p	Contribución	Efecto estandarizado
Modelo	0.14		-46.40	0.074		-23.3	0.314		+10.43
A pH	0.15	11	+7.350	0.23	5.486	+5.63	0.938	0.0384	-0.500
B: O₂	0.53	1.81	-5.6x10 ⁻³	0.80	0.22	+2,0x10 ⁻³	0.938	0.0384	-1,0 x10 ⁻³
C Tiempo	0.58	1.4	-0.530	0.079	13.59	-1.77	0.194	12.4657	-1.800
D Nutrientes	0.056	22	+21.03	0.14	8.79		0.194	12.4657	+18,00
						+14.26			
E Inóculo	0.18	9.5	+7.210	0.66	0.66	+2.070	0.593	1.885	+3.684
F Iluminación	0.11	14	+ 0.0167	0.013	34.53	+0.028	0.076	26.0087	+0,026
Precisión	5.1			5.86			4,353		
Curvatura	0.19			0.07			0,40		
CV	12		-	16.68			20,70		
R²	0.66			0.73			0,555		

Tabla 12. Análisis de varianza y coeficientes de regresión para Porcentaje de decoloración a diferentes longitudes de onda

Facto	Decoloración a 524 nm (%)			Decoloración a 621 nm (%)		
	Valor p	Contribución	Efecto estandarizado	Valor p	Contribución	Efecto estandarizado
Modelo	0,229		-18,74912	0,311		+37,449

A	0,547	2,240	+4,5	0,6718	1,23	+3,583
pH						
B:	0,892	0,11	-2x 10 ⁻³	0,657	1,34	-7.5x10 ⁻³
O2						
C	0,1896	11,81	-2,0666	0,0478	36,19	-3,883
Tiempo						
D	0,0435	33,89	+35,00	0,1745	14,40	+24,50
Nutrientes						
E	0,4147	4,20	6,491	0,5633	2,32	5,175
Inóculo						
F	0,2626	8,30	0,0173	0,9446	0,032	1,16 x10 ⁻³
Iluminación						
Precisión	4,742			3,625		
Curvatura	0,847			0,828		
CV	13,89			19,81		
R²	0,607			0,557		

En la **figura 21** se observan los resultados para remoción de color a diferentes longitudes de onda en función de los 12 tratamientos evaluados. Con respecto a la remoción a 292 nm se observaron diferencias entre los diferentes tratamientos, siendo T1 y T11, en los que se removió mayor cantidad de color obteniendo 72 % y 32 %, partiendo de (3606 UC y 2310 UC iniciales).

En la decoloración a 398 nm también se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.0001$) siendo el T1, T6 en los que más porcentaje de decoloración se alcanzó obteniendo valores de 77% y 38 % (**Figura 21**).

Con respecto a la decoloración 436 nm, se observaron diferencias significativas ($p < 0.0001$) siendo T1 y T6 los mejores tratamientos con valores de 71 y 55%

La decoloración a 524 nm se observaron diferencias entre los diferentes tratamientos, siendo T1, T6 y T11 en los que se removió mayor cantidad de color obteniendo 88 %,69% y 40 %, partiendo de (428 UC, 193 UC y 196,6 UC iniciales)

Finalmente, en la decoloración a 621 nm se presentaron diferencias entre los tratamientos, siendo al igual que en la mayoría de las longitudes de onda T1, T6 en los que se removió mayor cantidad de color obteniendo 99,5% y 89 % (**Figura 21**).

Al analizar las tres variables de respuesta se determinó que las condiciones evaluadas en el tratamiento 1, que permite el cultivo de las microalgas a un pH de 7.0, 1000 mL/L de aireación, con solución de nutrientes del Bold CaCl_2 (25 mg / L), NaCl (25 mg/L), NaNO_3 (250 mg/L), MgSO_4 (75 mg/L), KH_2PO_4 (105 mg/L), K_2HPO_4 (75 mg/L) , 4 % v/v de inóculo, 1000 lux y 10 días de proceso. Son las que favorecen la remoción de color a las diferentes longitudes de onda analizadas.

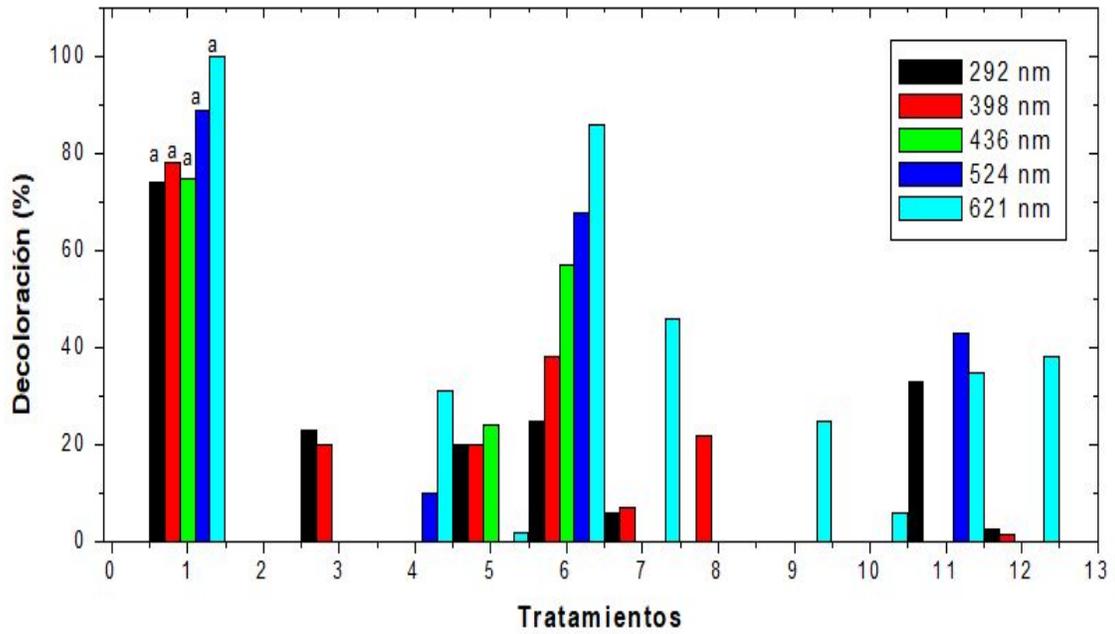


Figura 21. Porcentaje de decoloración a diferentes longitudes de onda de los 12 tratamientos.

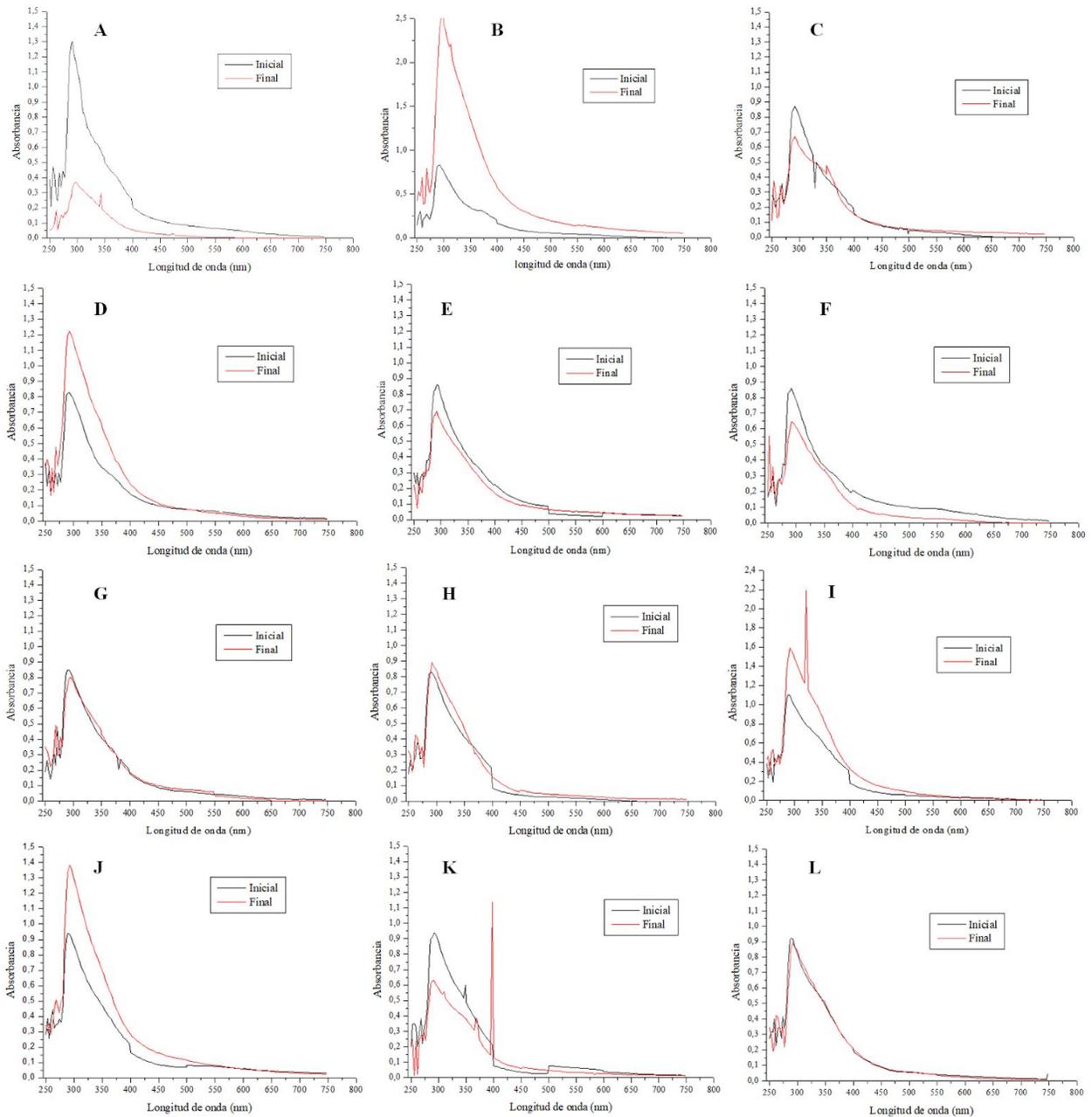


Figura 22. Curvas espectrales iniciales y finales de los 12 tratamientos **A)** Curva espectral inicial y final del tratamiento 1 **B)** Curva espectral inicial y final del tratamiento 2 **C)** Curva espectral inicial y final del tratamiento 3 **D)** Curva espectral inicial y final del tratamiento 4 **E)** Curva espectral inicial y final del tratamiento 5 **F)** Curva espectral inicial y final del tratamiento 6 **G)** Curva espectral inicial y final del tratamiento 7 **H)** Curva espectral inicial y final del tratamiento 8 **I)** Curva espectral inicial y final del tratamiento 9

J) Curva espectral inicial y final del tratamiento 10 **K)** Curva espectral inicial y final del tratamiento 11 **L)** Curva espectral inicial y final del tratamiento 12.

Las microalgas producen compuestos especiales beneficiosos como pigmentos, enzimas, azúcares, lípidos con ácidos grasos valiosos, esteroides y vitaminas (β -caroteno, tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantoténico, piridoxina, biotina, ácido fólico) (**koller, 2014**).

El ácido pantoténico, como resultado del ataque en varios sitios de la molécula da como resultado la formación de varios radicales libres, el espectro de absorción transitoria se ubica en una longitud de onda 270-340 nm a pH 6.7. La biotina puede reaccionar con radicales OH y producir un espectro de absorción óptica transitoria a pH 10.4 con máximos de absorción a 350 y 680 nm. Por otro lado, la tiamina es inestable a $\text{pH} \geq 7$ y la reducción de un electrón de tiamina a pH 0,5 por los radicales (CH_3) y OH dio un espectro transitorio con máximos a 345 y 362 nm (**Koller et al., 2014**). Teniendo en cuenta esta información, según la **figura 22A** el tratamiento 1 fue el que obtuvo mayor remoción de compuestos contaminantes presentes en el agua con máximos de absorción a 250-350 nm, con pH de 7 lo que hace que diferentes productos intermediarios de las microalgas sean inestables y justifica que en otros tratamientos donde el pH era ácido o alcalino haya aumentado la presencia de compuestos que absorben a determinada longitud de onda.

Con respecto a los intermediarios derivados de los colorantes. En la figura 22A se presenta el análisis inicial y final de la zona ultravioleta, en el rango de 250 a 300 nm del agua del tratamiento 1, en el análisis inicial se evidenció unos picos aproximadamente a 292 nm relacionados con posiblemente anillos alifáticos intermediarios y alcoholes, lo que indica que en ese tiempo del proceso no se había llevado a cabo un proceso total de mineralización sino que se pudieron estar llevando a cabo proceso de desmetilación mediados por una feniloxidasas posiblemente lacasa (**Casas et al., 2012; Pedroza et al., 2018**). En el análisis final del agua se pudo observar que estos picos desaparecieron, posiblemente por la mineralización de estos intermediarios por parte de las algas (**Solís et al., 2012**). Con respecto a las unidades de color medidas a 398 nm estas pudieron haber sido causada por

compuestos alifáticos derivados de la degradación incompleta de los colorantes (**Zahid et al., 2013**).

Con respecto a las longitudes de onda 436, 524 y 621 nm estas permiten realizar método de color real el cual es una ayuda útil y rápida para obtener un indicio de que tipo de contaminación por color está afectando un cuerpo de agua, ya que usa la relación de los colores primarios con las respectivas longitudes de onda propuestas (436 nm= amarillo; 522 nm= rojo; 621 nm= azul), por lo que la presencia de unidades de color a estas longitudes es un indicador de la presencia de colorantes en el agua. En la **figura 22A** **presenta** los resultados iniciales y finales de absorbancia leída a estas longitudes de onda para el tratamiento 1, se pudo observar que las absorbancias disminuyeron en todas las longitudes de onda leídas (436, 522, y 621 nm) lo que indicaría que las algas disminuyeron el color del agua por procesos de biotransformación de colorantes o bioadsorción (**Solís et al., 2012**).

La **figura 23** presenta los resultados de los NO_3 (mg/L) NO_2 (mg/L) iniciales y finales en los diferentes tratamientos del diseño Plackett Burman, se puede observar que en todos los tratamientos los nitritos aumentan parecido a lo que ocurrió con los nitratos donde incrementó en casi todos los tratamientos a excepción del número 8 y 12. Este aumento podría ser debido a que el inóculo inicial de algas provino de la columna de Winogradsky donde existen bacterias nitrificantes las cuales pueden oxidar el amonio a nitrito y nitrato (**Dworkin, 2012**), debido a que en ningún momento de los experimentos se añadió un agente inhibidor de bacterias la posibilidad de que el inóculo estuvieran presentes es muy alta.

Con respecto a la ausencia de remoción de nitratos y nitratos por parte de la mayoría de tratamientos, esto podría ser debido a dos razones. Una de estas es que no se suplemento molibdeno el cual es un nutriente necesario para que las algas asimilen el nitrato, para esto primero necesita reducirlo a amonio, proceso en el que interviene la enzima nitrato reductasa (NR) la cual tiene como cofactor molibdeno. La ausencia de molibdeno podría impedir que las algas asimilen correctamente el nitrato, esto se vio reflejado en un estudio

elaborado por Wallen & Cartier en el año 1975, en el cual se comparó la asimilación de nitrato por parte de una microalga de agua dulce con y sin suplementación de molibdeno, donde se demostró que la asimilación fue 270 % mayor cuando se suplementó molibdeno (Wallen & Cartier, 1975). La segunda razón de por qué no disminuyeron los nitratos ni nitritos podría ser por la presencia de amonio la cual es la forma de nitrógeno más usual en el agua residual y la que es de preferencia por parte de las algas ya que al estar en el estado de oxidación de las biomoléculas no necesita modificaciones para incorporarlo en sus componentes celulares (Lee *et al.*, 2016), aunque no se midió la cantidad de amonio en el agua residual es posible que su concentración haya sido mayor a la de nitratos. La expresión del gen que expresa la enzima nitrato reductasa (NIA1), se induce en medio con nitratos y está fuertemente reprimida en medio con amonio (Loppes *et al.*, 1999), esta enzima como se mencionó anteriormente es esencial para la asimilación de nitratos por lo que si es reprimida las algas no podrían consumir los nitratos del medio, la represión por parte del amonio aparece como un proceso cuantitativo que no es estrictamente sensible a la concentración de amonio sino al balance de nitrato / amonio (N / A) (Llamas *et al.*, 2002). Adicionalmente a esto en el inóculo de Plackett Burman estaban presentes cianobacterias, las cuales son capaces de fijar nitrógeno del aire para producir amonio lo que causaría un aumento en la concentración de este en el medio (Bothe *et al.*, 2010).

Finalmente se puede observar en la **figura 23** que los únicos tratamientos capaces de remover NO_3 y NO_2 fueron el 8 y 12, estos dos tratamientos tienen en común que no se les añadió sales de Bold las cuales dentro de su composición hay 250 mg/L de NaNO_3 . La ausencia de estos nitratos en el medio obliga a las algas a obtener su fuente de nitrógeno del agua residual, lo que causaría la disminución de los nitratos en el medio.

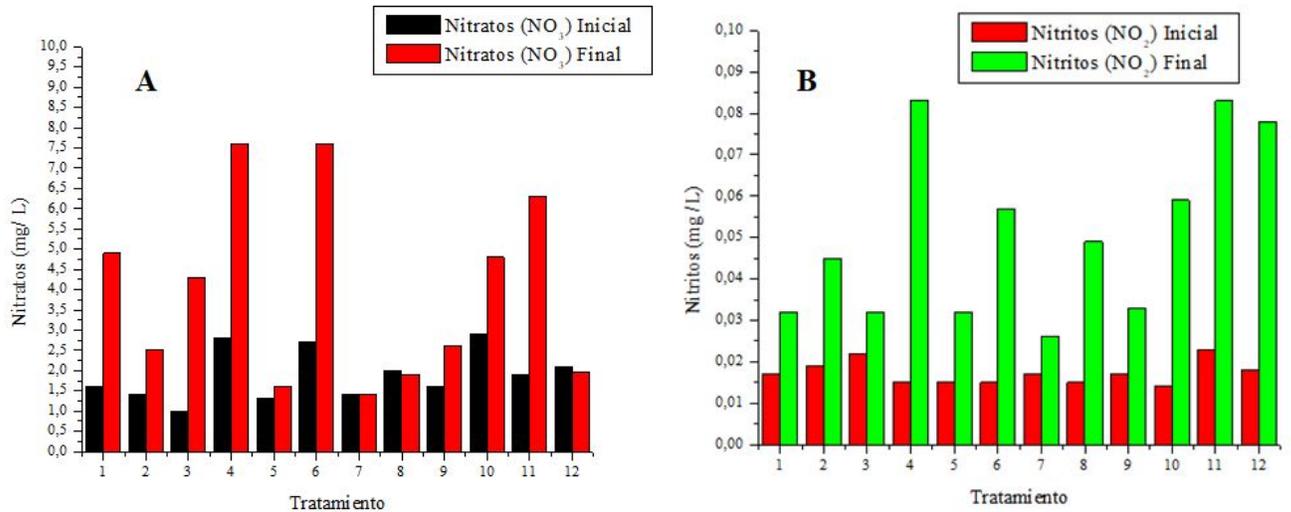


Figura 23. Nitratos y nitritos iniciales y finales de los 12 tratamientos experimentales del diseño Plackett Burman. A) Nitratos iniciales y finales de los 12 tratamientos B) Nitritos iniciales y finales de los 12 tratamientos

12. Conclusiones

- Se recuperaron e identificaron diferentes géneros de microalgas a partir de columnas de Winogradsky con diferentes tiempos de estabilización, se determinó que los géneros de microalgas van cambiando según el tiempo de estabilización de las columnas, entre los géneros de clorofitas recuperados estuvieron *Chlorococcus*, *Euglena*, *Westella* y en una mayor proporción *Chlorella*. Mientras que los géneros de Diatomeas recuperados fueron *Fragilaria*, *Navicula*, *Gomphonema* y *Achnantheidium*.
- Se seleccionaron microalgas con capacidad de resistir al agua residual al 100 % (v/v), se identificó que los morfotipos seleccionados pertenecieron en su mayoría al género *Chlorella sp* el cual se ha reportado que tiene altas tolerancias al agua residual.
- Se determinó que el tratamiento 1 el cual tuvo un pH de 7.0, 1000 mL/L de aireación, con solución de nutrientes del Bold CaCl₂ (25 mg / L), NaCl (25 mg/L), NaNO₃(250 mg/L), MgSO₄ (75 mg/L), KH₂PO₄ (105 mg/L), K₂HPO₄ (75 mg/L) , 4

% v/v de inóculo, 1000 lux y 10 días de proceso fue el que favoreció la remoción de DQO, color, producción de biomasa y recuento de células

- El uso de microalgas como un sistema complementario para remover color y DQO es altamente eficiente, presentando ventajas como la producción de biomasa la cual tiene un valor agregado. El efluente final derivado del tratamiento 1 alcanzó un porcentaje de remoción de DQO del 81 % obteniendo un valor de 80 mg/L el cual cumple con la resolución 0631 del 2015 el cual estipula que el valor máximo permitido es 150 mg/L. Sin embargo, no se logró remover nitratos ni nitritos del medio posiblemente por exceso de amonio en el medio y falta de molibdeno.

11. Recomendaciones

-Realizar las pruebas de tolerancia al agua residual en medios que permitan recuperan más biomasa en menor tiempo.

-Medir la cantidad de amonio presente en el agua residual previo a el tratamiento de la remoción de nitratos y nitros en el medio.

-Suplementar molibdeno para incrementar la asimilación de nitratos por parte de las algas-

12. Bibliografía

Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., & Ibraheem, I. B. M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19, 257–275.

Abinandan, S., & Shanthakumar, S. (2015). Challenges and opportunities in application of microalgae (Chlorophyta) for wastewater treatment: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 52, 123–132.

Agunbiade, M. O., Van Heerden, E., Pohl, C. H., & Ashafa, A. T. (2017). Flocculating performance of a bioflocculant produced by *Arthrobacter humicola* in sewage waste water treatment. *BMC Biotechnology*, 17, 1–9.

Alkhamis, Y., & Qin, J. G. (2013). Cultivation of *Isochrysis galbana* in Phototrophic, Heterotrophic, and Mixotrophic Conditions, 2013.

Ambiente, S. de medio. (2009). POMCA Secretaria Distrital de Ambiente. Retrieved from <http://ambientebogota.gov.co/fi/pomca>

Ana, C. V., Ma, M., De Silóniz, I., & Susana, S. (2010). Técnicas básicas de Microbiología Observación de bacterias. Reduca (Biología). Serie Microbiología, 3, 15–38.

Aravindhan, R., Rao, J. R., & Nair, B. U. (2007). Removal of basic yellow dye from aqueous solution by sorption on green alga *Caulerpa scalpelliformis*. *Journal of Hazardous Materials*, 142, 68–76.

Babaei, A., & Shayegan, J. (2018). Continuous Cultivation of Mixotrophic Microalgae in Membrane Bioreactor for Ammonium Removal, 4–5.

Babcsányi, I., Meite, F., & Imfeld, G. (2017). Biogeochemical gradients and microbial communities in Winogradsky columns established with polluted wetland sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, 93. doi:10.1093/femsec/fix089

Barea, J. L., & Cárdenas, J. (1975). The nitrate-reducing enzyme system of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Archives of Microbiology*, 105, 21–25.

Bibi R., A. Ditta, A. Hussain, S. Noureen, A. Khalid, I. A. (2016). Production of algal biomass using different dilutions of textile effluent wastewater. *Science Letters*, 4, 71–77.

Bilad, M. R., Arafat, H. A., & Vankelecom, I. F. J. (2014). Membrane technology in microalgae cultivation and harvesting: A review. *Biotechnology Advances*, 32, 1283–1300.

Blair, M. F., Kokabian, B., & Gude, V. G. (2014). Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2, 665–674.

Bondoc, K. G. V., Heuschele, J., Gillard, J., Vyverman, W., & Pohnert, G. (2016). Selective silicate-directed motility in diatoms. *Nature Communications*, 7, 1–7.

Bothe, H., Schmitz, O., Yates, M. G., & Newton, W. E. (2010). Nitrogen Fixation and Hydrogen Metabolism in Cyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74, 529–551.

Brahmbhatt, N. H., & Jasrai, R. T. (2016). The Role of Algae in Bioremediation of Textile Effluent. *International Journal of Engineering Research and General Science*, 4, 443–453.

- Camargo, A., Llamas, A., Schnell, R. A., Higuera, J. J., Gonzalez-Ballester, D., Lefebvre, P. A., Galvan, A. (2007). Nitrate Signaling by the Regulatory Gene NIT2 in *Chlamydomonas*. *The Plant Cell Online*, 19, 3491–3503.
- Canseco, A., Gusils, C., Ruiz, M., Canseco, A., & Gusils, C. (n.d.). Recuento en cámara de neubauer microscopía, 1–11.
- Cardoso, N. F., Lima, E. C., Royer, B., Bach, M. V., Dotto, G. L., Pinto, L. A. A., & Calvete, T. (2012). Comparison of *Spirulina platensis* microalgae and commercial activated carbon as adsorbents for the removal of Reactive Red 120 dye from aqueous effluents. *Journal of Hazardous Materials*, 241–242, 146–153.
- Chislock, M. F., Doster, E., Zitomer, R. A., & Wilson, A. E. (2013). Eutrophication: Causes, Consequences, and Controls in Aquatic Ecosystems | Learn Science at Scitable. *The Nature Education*. Retrieved from <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/eutrophication-causes-consequences-and-controls-in-aquatic-102364466>
- Choi, Y. Y., Baek, S. R., Kim, J. I., Choi, J. W., Hur, J., Lee, T. U., Lee, B. J. (2017). Characteristics and biodegradability of wastewater organic matter in municipal wastewater treatment plants collecting domestic wastewater and industrial discharge. *Water (Switzerland)*, 9. doi:10.3390/w9060409
- Conway, D., Van Garderen, E. A., Deryng, D., Dorling, S., Krueger, T., Landman, W., Dalin, C. (2015). Climate and southern Africa’s water-energy-food nexus. *Nature Climate Change*, 5, 837–846.
- de Sousa, M. L., de Moraes, P. B., Lopes, P. R. M., Montagnolli, R. N., de Angelis, D. de F., & Bidoia, E. D. (2012). Textile Dye Treated Photoelectrolytically and Monitored by Winogradsky Columns. *Environmental Engineering Science*, 29, 180–185.
- Delgadillo-Mirquez, L., Lopes, F., Taidi, B., & Pareau, D. (2016). Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture. *Biotechnology Reports*, 11, 18–26.
- Doungpen, D., Chayakorn, P., Jeeraporn, P., & Yuwadee, P. (2014). Effects of organic carbon source and light-dark period on growth and lipid accumulation of *Scenedesmus* sp. AARL G022. *Maejo Int. J. Sci. Technol.*, 8, 198–206.
- Ducret, A., Chabalier, M., & Dukan, S. (2014). Characterization and resuscitation of “non-culturable” cells of *Legionella pneumophila*. *BMC Microbiology*, 14. doi:10.1186/1471-2180-14-3

- Durán, N., & Esposito, E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: A review. *Applied Catalysis B: Environmental*, 28, 83–99.
- Dworkin, M. (2012). Sergei Winogradsky: A founder of modern microbiology and the first microbial ecologist. *FEMS Microbiology Reviews*, 36, 364–379.
- El-Kassas, H. Y., & Mohamed, L. A. (2014). Bioremediation of the textile waste effluent by *Chlorella vulgaris*. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 40, 301–308.
- Esteban, D. J., Hysa, B., & Bartow-McKenney, C. (2015). Temporal and spatial distribution of the microbial community of winogradsky columns. *PLoS ONE*, 10, 1–21.
- FAO. (2010). Algae-based bioenergy options. *Algae-Based Biofuels Applications and Co-Products*, 1–23.
- Fazal, T., Mushtaq, A., Rehman, F., Ullah Khan, A., Rashid, N., Farooq, W., Xu, J. (2018). Bioremediation of textile wastewater and successive biodiesel production using microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82, 3107–3126.
- Federation, W. E. (1999). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Part 1000 Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.
- Fernandez, E., & Galvan, A. (2008). Nitrate assimilation in *Chlamydomonas*. *Eukaryotic Cell*, 7, 555–559.
- Ferraz, F. M., Bruni, A. T., Povinelli, J., & Vieira, E. M. (2016). Leachate / domestic wastewater aerobic co-treatment : A pilot-scale study using multivariate analysis. *Journal of Environmental Management*, 166, 414–419.
- Ficara, E., Uslenghi, A., Basilico, D., & Mezzanotte, V. (2014). Growth of microalgal biomass on supernatant from biosolid dewatering. *Water Science and Technology*, 69, 896–902.
- Forgacs, E., Cserháti, T., & Oros, G. (2004). Removal of synthetic dyes from wastewaters: A review. *Environment International*, 30, 953–971.
- Franklin, A., Meza, E., Ing, V., & Uis, Q. (2006). Revisión En Internet Sobre Toxicidad De Yodo En, 1–5.
- García, J. C., Pedroza, A. M., & Daza, C. E. (2017). Magnetic Fenton and Photo-Fenton-Like Catalysts Supported on Carbon Nanotubes for Wastewater Treatment. *Water, Air, and Soil Pollution*, 228. doi:10.1007/s11270-017-3420-7

- Gim, G. H., Kim, J. K., Kim, H. S., Kathiravan, M. N., Yang, H., Jeong, S. H., & Kim, S. W. (2014). Comparison of biomass production and total lipid content of freshwater green microalgae cultivated under various culture conditions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37, 99–106.
- Gris, G., Paim, A. C., Farenzena, M., & Trierweiler, J. O. (2013). Laboratory apparatus to evaluate microalgae production. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 30, 487–497.
- Guldhe, A., Kumari, S., Ramanna, L., Ramsundar, P., Singh, P., Rawat, I., & Bux, F. (2017). Prospects, recent advancements and challenges of different wastewater streams for microalgal cultivation. *Journal of Environmental Management*, 203, 299–315.
- Hach Company. (2014). Nitrite test method, 584, 1–6.
- HACH. (2014). Chemical oxygen demand, dichromate method. Hach, DOC316.53., 10.
- Hach. (2014). Nitrate, MR, 584, 8.
- Hao, O. J., Kim, H., & Chiang, P. C. (2000). Decolorization of wastewater. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 30, 449–505.
- Heredia-arroyo, T., Wei, W., Ruan, R., & Hu, B. (2011). Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials, 5. doi:10.1016/j.biombioe.2011.02.036
- Hernández, I., Vásquez, J., & Álvarez, V. de P. (2016). Remoción biológica de nutrientes en aguas residuales urbanas con fotobiorreactores utilizando microalgas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 17, 3569–3580.
- Hoekema, S., Bijmans, M., Janssen, M., & Tramper, J. (2002). A pneumatically agitated at-panel photobioreactor with gas re-circulation : anaerobic photoheterotrophic cultivation of a purple non-sulfur bacterium, 27, 1331–1338.
- Hogg, S. (2013). *Essential Microbiology Second Edition*.
- Honda, R., Teraoka, Y., Noguchi, M., & Yang, S. (2017). Optimization of Hydraulic Retention Time and Biomass Concentration in Microalgae Biomass Production from Treated Sewage with a Membrane Photobioreactor. *Journal of Water and Environment Technology*, 15, 1–11.
- Hongyang, S., Yalei, Z., Chunmin, Z., Xuefei, Z., & Jinpeng, L. (2011). Cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* in soybean processing wastewater. *Bioresource Technology*, 102, 9884–9890.

Hu, B., Min, M., Zhou, W., Li, Y., Mohr, M., Cheng, Y., ... Ruan, R. (2012). Influence of exogenous CO₂ on biomass and lipid accumulation of microalgae *Auxenochlorella protothecoides* cultivated in concentrated municipal wastewater. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166, 1661–1673.

José, L., & Patricia, S. (2009). Fotosíntesis 1., 1–28.

Juneja, A., Ceballos, R. M., & Murthy, G. S. (2013). Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: A review. *Energies*, 6, 4607–4638.

Kale, A., & Karthick, B. (2015). The Diatoms, 919–930.

Khandare, R. V., & Govindwar, S. P. (2015). Phytoremediation of textile dyes and effluents: Current scenario and future prospects. *Biotechnology Advances*, 33, 1697–1714.

Kim, S., Park, J. eun, Cho, Y. B., & Hwang, S. J. (2013). Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Bioresource Technology*, 144, 8–13.

Kim, T. H., Lee, Y., Han, S. H., & Hwang, S. J. (2013). The effects of wavelength and wavelength mixing ratios on microalgae growth and nitrogen, phosphorus removal using *Scenedesmus sp.* for wastewater treatment. *Bioresource Technology*, 130, 75–80.

Koller, M., Muhr, A., & Brauneegg, G. (2014). Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research*, 6, 52–63.

Kosourov, S., Seibert, M., & Ghirardi, M. L. (2003). Effects of extracellular pH on the metabolic pathways in sulfur-deprived H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* under different growth conditions. *Plant Cell Physiology*, 44, 145–155.

Kroth, P. G. (2015). The biodiversity of carbon assimilation. *Journal of Plant Physiology*, 172, 76–81.

Larkum, Anthony W.D.; Douglas, Susan E.; Raven, J. A. (2003). *Photosynthesis in Algae*. *Journal of Phycology*. doi:10.1111/j.1529-8817.2004.40601.x

Lee, J., Lee, J., Shukla, S. K., Park, J., & Lee, T. K. (2016). Effect of algal inoculation on COD and nitrogen removal, and indigenous bacterial dynamics in municipal wastewater. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 900–908.

Lehninger. (2004). *Lehninger Principles of Biochemistry* W.H.Freeman2004.pdf, 4th editio, 85–174.

- Lewis, L., & McCourt, R. (2004). Green algae and the origin of land plants 1. *American Journal of Botany*, *91*, 1535–1556.
- Li, T., Zheng, Y., Yu, L., & Chen, S. (2014). Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production. *Biomass and Bioenergy*, *66*, 204–213.
- Li, Y. R., Tsai, W. T., Hsu, Y. C., Xie, M. Z., & Chen, J. J. (2014). Comparison of autotrophic and mixotrophic cultivation of green microalgal for biodiesel production. *Energy Procedia*, *52*, 371–376.
- López-Jácome, L., Hernández, M., Colín- Castro, A., Ortega, S., Cerón, G., & Franco, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación En Discapacidades*, *3*, 10–18.
- Lopez ruiz, A., Verbelen, J. P., Bocanegra, J. A., & Diez, J. (1991). Immunocytochemical Localization Of Nitrite Reductase In Green-Algae. *Plant Physiology*, *96*, 699–704.
- Marbelia, L., Bilad, M. R., Passaris, I., Discart, V., Vandamme, D., Beuckels, A., Vankelecom, I. F. J. (2014). Membrane photobioreactors for integrated microalgae cultivation and nutrient remediation of membrane bioreactors effluent. *Bioresource Technology*, *163*, 228–235.
- Masojídek, J., Torzillo, G., & Koblížek, M. (2013). Photosynthesis in Microalgae. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, 21–36.
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *14*, 217–232.
- McDonald, S. M., Plant, J. N., & Worden, A. Z. (2010). The mixed lineage nature of nitrogen transport and assimilation in marine eukaryotic phytoplankton: A case study of *Micromonas*. *Molecular Biology and Evolution*, *27*, 2268–2283.
- Method, D. (2016). Organic Carbon , Total, 1–6.
- Morales-Álvarez, E. D., Rivera-Hoyos, C. M., Cardozo-Bernal, Á. M., Poutou-Piñales, R. A., Pedroza-Rodríguez, A. M., Díaz-Rincón, D. J., Cuervo-Patiño, C. L. (2017). Plackett-Burman Design for rGILCC1 Laccase Activity Enhancement in *Pichia pastoris* : Concentrated Enzyme Kinetic Characterization. *Enzyme Research*, *2017*, 1–10.
- Morales-Álvarez, E. D., Rivera-Hoyos, C. M., Poveda-Cuevas, S. A., Reyes-Guzmán, E. A., Pedroza-Rodríguez, A. M., Reyes-Montaña, E. A., & Poutou-Piñales, R. A. (2017). Correction to: Malachite Green and Crystal Violet Decolorization by *Ganoderma lucidum*

and *Pleurotus ostreatus* Supernatant and by rGILCC1 and rPOXA 1B Concentrates: Molecular Docking Analysis (Appl Biochem Biotechnol, 10.1007/s12010-017-2560-y). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 183, 1540–1541.

Mori, Y., Kataoka, T., Okamura, T., & Kondo, R. (2013). Dominance of green sulfur bacteria in the chemocline of the meromictic Lake Suigetsu, Japan, as revealed by dissimilatory sulfite reductase gene analysis. *Archives of Microbiology*, 195, 303–312.

Morsy, F. M. (2011). Acetate versus sulfur deprivation role in creating anaerobiosis in light for hydrogen production by *chlamydomonas reinhardtii* and *spirulina platensis*: Two different organisms and two different mechanisms. *Photochemistry and Photobiology*, 87, 137–142.

Myers, J. (1947). Oxidative assimilation in relation to photosynthesis in *Chlorella*. *The Journal of General Physiology*, 30, 217–227.

Nühsman, T. (1921). Die systematische Sterilisierung der Antrotomiewunde mittels der Dakinlösung nach den Carrel'schen Wundverfahren. *Archiv Für Ohren-, Nasen- Und Kehlkopfheilkunde*, 107, 173–241.

Ogbonna, J. C., & Tanaka, H. (2000). Light requirement and photosynthetic cell cultivation – Development of processes for efficient light utilization in photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 12, 207–218.

Ong, S.-T., Keng, P.-S., Lee, W.-N., Ha, S.-T., & Hung, Y.-T. (2011). Dye Waste Treatment. *Journal of Water*, 3, 157–176.

Osundeko, O., Davies, H., & Pittman, J. K. (2013). Oxidative stress-tolerant microalgae strains are highly efficient for biofuel feedstock production on wastewater. *Biomass and Bioenergy*, 56, 284–294.

Otto, B., & Schlosser, D. (2014). First laccase in green algae: purification and characterization of an extracellular phenol oxidase from *Tetracystis aerea*. *Planta*, 240, 1225–1236.

Pallerla, S., & Chambers, R. P. (1997). Characterization of a Ca-alginate-immobilized *Trametes versicolor* bioreactor for decolorization and AOX reduction of paper mill effluents. *Bioresource Technology*, 60, 1–8.

Park, K. C., Whitney, C., McNichol, J. C., Dickinson, K. E., MacQuarrie, S., Skrupski, B. P., McGinn, P. J. (2012). Mixotrophic and photoautotrophic cultivation of 14 microalgae isolates from Saskatchewan, Canada: Potential applications for wastewater remediation for biofuel production. *Journal of Applied Phycology*, 24, 339–348.

- Pathak, V. V., Kothari, R., Chopra, A. K., & Singh, D. P. (2015). Experimental and kinetic studies for phycoremediation and dye removal by *Chlorella pyrenoidosa* from textile wastewater. *Journal of Environmental Management*, 163, 270–277.
- Patty, C. H. L., Visser, L. J. J., Ariese, F., Buma, W. J., Sparks, W. B., van Spanning, R. J. M., Snik, F. (2017). Circular spectropolarimetric sensing of chiral photosystems in decaying leaves. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 189, 303–311.
- Pedroza-Camacho, L. D., Lores-Acosta, J. C., Rojas-Enríquez, J. F., Mateus-Maldonado, J. F., Puentes, C. S., Ramírez-Rodríguez, J., Pedroza-Rodríguez, A. M. (2018). Effect of Domestic Wastewater as Co-Substrate on Biological Stain Wastewater Treatment Using Fungal/Bacterial Consortia in Pilot Plant and Greenhouse Reuse. *Journal of Water Resource and Protection*, 10, 369–369.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, 45, 11–36.
- Posten, C. (2009). Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae, 165–177.
- Qiu, R., Gao, S., Lopez, P. A., & Ogden, K. L. (2017). Effects of pH on cell growth, lipid production and CO₂ addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Algal Research*, 28, 192–199.
- Rai, M. P., Gautam, T., & Sharma, N. (2015). Effect of Salinity, pH, Light Intensity on Growth and Lipid Production of Microalgae for Bioenergy Application. *OnLine Journal of Biological Sciences*, 15, 260–267.
- Raso, S., van Genugten, B., Vermuë, M., & Wijffels, R. H. (2012). Effect of oxygen concentration on the growth of *Nannochloropsis sp.* at low light intensity. *Journal of Applied Phycology*, 24, 863–871.
- Raven, J. A., & Waite, A. M. (2004). The evolution of silicification in diatoms : inescapable sinking and sinking as, 45–61.
- Restrepo Gallego, M. (2007). Artículo de revisión: Sustitución de colorantes en alimentos, 4, 35–39.
- Rier, S. T., Kuehn, K. A., & Francoeur, S. N. (2007). Algal regulation of extracellular enzyme activity in stream microbial communities associated with inert substrata and detritus. *Journal of the North American Benthological Society*, 26, 439–449.

- Salama, E. S., Kurade, M. B., Abou-Shanab, R. A. I., El-Dalatony, M. M., Yang, I. S., Min, B., & Jeon, B. H. (2017). Recent progress in microalgal biomass production coupled with wastewater treatment for biofuel generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *79*, 1189–1211.
- Sánchez, E., Vargas, M., Mora, M., Ortega, J. M., Serrano, A., Freer, E., & Sittenfeld, A. (2004). Descripción ultraestructural de *Euglena pailasensis* (Euglenozoa) del Volcán Rincón de la Vieja, Guanacaste, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, *52*, 31–40.
- Sanz-Luque, E., Chamizo-Ampudia, A., Llamas, A., Galvan, A., & Fernandez, E. (2015). Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae. *Frontiers in Plant Science*, *6*. doi:10.3389/fpls.2015.00899
- Sharma, A. K., Sahoo, P. K., Singhal, S., & Patel, A. (2016). Impact of various media and organic carbon sources on biofuel production potential from *Chlorella spp.* *3 Biotech*, *6*. doi:10.1007/s13205-016-0434-6
- Shi, W., Wang, L., Rousseau, D. P. L., & Lens, P. N. L. (2010). in algae and duckweed-based wastewater treatment systems, 824–833.
- Silaban, A., Bai, R., Gutierrez-Wing, M. T., Negulescu, I. I., & Rusch, K. A. (2014). Effect of organic carbon, C:N ratio and light on the growth and lipid productivity of microalgae/cyanobacteria coculture. *Engineering in Life Sciences*, *14*, 47–56.
- Singh, K. P., Gupta, S., Singh, A. K., & Sinha, S. (2011). Optimizing adsorption of crystal violet dye from water by magnetic nanocomposite using response surface modeling approach. *Journal of Hazardous Materials*, *186*, 1462–1473.
- Solís, M., Solís, A., Pérez, H. I., Manjarrez, N., & Flores, M. (2012). Microbial decolouration of azo dyes: A review. *Process Biochemistry*, *47*, 1723–1748.
- Sostenible, M. de ambiente y desarrollo. (2012). Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible. Parámetros y Valores Límites En Vertimientos Puntuales a Aguas, 2015, 2013.
- Stephens, E., Ross, I. L., Mussgnug, J. H., Wagner, L. D., Borowitzka, M. A., Posten, C., Hankamer, B. (2010). Future prospects of microalgal biofuel production systems. *Trends in Plant Science*, *15*, 554–564.
- Su, N., Wu, Q., Shen, Z., Xia, K., & Cui, J. (2014). Effects of light quality on the chloroplastic ultrastructure and photosynthetic characteristics of cucumber seedlings. *Plant Growth Regulation*, *73*, 227–235.
- Tang, E. P. Y. (1995). The allometry of algal growth rates, *17*, 1325–1335.

- Taylor, J., Gerber, A., & C, V. G. (2006). *A guide for the identification of microscopic algae in South African freshwaters*.
- Tomei, M. C., Soria Pascual, J., & Mosca Angelucci, D. (2016). Analysing performance of real textile wastewater bio-decolourization under different reaction environments. *Journal of Cleaner Production*, *129*, 468–477.
- United Nations Development Program. (1999). Danube Pollution Reduction Program: Causes and Effects of Eutrophication Summary Report.
- Urria, Pérez; Carril, E. (2009). Fotosíntesis: Aspectos Básicos. *Reduca (Biología)*, *2*, 1–47.
- Van Acoleyen, K., & Verschelde, H. (2002). Dynamical mass generation by source inversion: Calculating the mass gap of the Gross-Neveu model. *Physical Review D - Particles, Fields, Gravitation and Cosmology*, *65*, 6.
- Van der Zee, F. P., & Cervantes, F. J. (2009). Impact and application of electron shuttles on the redox (bio)transformation of contaminants: A review. *Biotechnology Advances*, *27*, 256–277.
- Venkata Subhash, G., Rohit, M. V., Devi, M. P., Swamy, Y. V., & Venkata Mohan, S. (2014). Temperature induced stress influence on biodiesel productivity during mixotrophic microalgae cultivation with wastewater. *Bioresource Technology*, *169*, 789–793.
- Verma, A., Wei, X., & Kusiak, A. (2013). Engineering Applications of Artificial Intelligence Predicting the total suspended solids in wastewater : A data-mining approach. *Engineering Applications of Artificial Intelligence*, *26*, 1366–1372.
- Vijayaraghavan, K., & Balasubramanian, R. (2013). A comparative evaluation of sorbents for the treatment of complex metal-bearing laboratory wastewaters. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *1*, 473–479.
- Vijayaraghavan, K., & Balasubramanian, R. (2015). Is biosorption suitable for decontamination of metal-bearing wastewaters? A critical review on the state-of-the-art of biosorption processes and future directions. *Journal of Environmental Management*, *160*, 283–296.
- Wallen, D. G., & Cartier, L. D. (1975). Molybdenum Dependence, Nitrate Uptake and Photosynthesis of Freshwater Plankton Algae. *Journal of Phycology*.
- Wanyonyi, W. C., Onyari, J. M., Shiundu, P. M., & Mula, F. J. (2017). Biodegradation and Detoxification of Malachite Green Dye Using Novel Enzymes from *Bacillus cereus* Strain KM201428: Kinetic and Metabolite Analysis. *Energy Procedia*, *119*, 38–51.

WEHR, J. D. (2007). Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology by Barsanti, L. & Gualtieri, P. *Journal of Phycology*, 43, 412–414.

Wehr, J. D., & Sheath, R. G. (2015). *Habitats of Freshwater Algae*. doi:10.1016/B978-0-12-385876-4.00002-5

Wesenberg, D., Kyriakides, I., & Agathos, S. N. (2003). White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents, 22, 161–187.

Whitton, R., Le Mével, A., Pidou, M., Ometto, F., Villa, R., & Jefferson, B. (2016). Influence of microalgal N and P composition on wastewater nutrient remediation. *Water Research*, 91, 371–378.

Wong, Y. (2017). Growth Medium Screening for *Chlorella vulgaris* Growth and Lipid Production. *Journal of Aquaculture & Marine Biology*, 6, 1–10.

Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., & Ying-xue, S. (2010). Bioresource Technology Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus sp.* *Bioresource Technology*, 101, 5494–5500.

Xu, H., Miao, X., & Wu, Q. (2006). High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, 126, 499–507.

Xu, H., Zheng, Z., & Mao, G. (2010). Enhanced photocatalytic discoloration of acid fuchsine wastewater by TiO₂/schorl composite catalyst, 175, 658–665.

Yagub, M. T., Sen, T. K., Afroze, S., & Ang, H. M. (2014). Dye and its removal from aqueous solution by adsorption: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 209, 172–184.

Yang, X., Wu, X., Hao, H., & He, Z. (2008). Mechanisms and assessment of water eutrophication. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 9, 197–209.

Zahid, M., Grampp, G., Mansha, A., Bhatti, I. A., & Asim, S. (2013). Absorption and fluorescence emission attributes of a fluorescent dye: 2,3,5,6-tetracyano-p-hydroquinone. *Journal of Fluorescence*, 23, 829–837.

Zappi, M. E. (2015). *Algal Biorefineries* (Vol. 2). doi:10.1007/978-3-319-20200-6

Zhuo, R., Yuan, P., Yang, Y., Zhang, S., Ma, F., & Zhang, X. (2016). Induction of laccase by metal ions and aromatic compounds in *Pleurotus ostreatus* HAUCC 162 and

decolorization of different synthetic dyes by the extracellular laccase. *Biochemical Engineering Journal*. doi:10.1016/j.bej.2016.09.016