



**TRATAMIENTO Terciario de Aguas Residuales no Domésticas
empleando a *Chlorella* sp. y conversión de la biomasa microbiana
por pirólisis lenta**

Diana Natalia Céspedes Bernal

Directora

Aura Marina Pedroza Rodríguez, Bacterióloga, M.Sc., Ph.D.
Laboratorio Microbiología Ambiental y suelos, Unidad de Investigación Agropecuarias
(UNIDIA) Departamento de Microbiología.
Pontificia Universidad Javeriana
Bogotá-Colombia

Co Directora

Claudia Marcela Rivera Hoyos, Bióloga, M.Sc., Ph.D.
Laboratorio Microbiología Ambiental y suelos
Pontificia Universidad Javeriana
Bogotá-Colombia

Asesor

Juan Felipe Mateus, Microbiólogo Industrial
Pontificia Universidad Javeriana
Bogotá-Colombia

Trabajo de Grado
Microbiología Industrial

Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Ciencias
Departamento de Microbiología
Carrera de Microbiología Industrial
Bogotá D.C. mayo de 2019

**TRATAMIENTO TERCIARIO DE AGUAS RESIDUALES NO DOMÉSTICAS
EMPLEANDO A *Chlorella* sp. Y CONVERSIÓN DE LA BIOMASA MICROBIANA
POR PIRÓLISIS LENTA**

Diana Natalia Céspedes Bernal

APROBADO

Concepción Puerta Bula, Bact, Ph.D.

**Decana académica Facultad de Ciencias
industrial**

Marcela Franco Correa, Ph.D.

Directora carrera microbiología

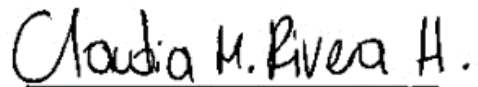
**TRATAMIENTO TERCIARIO DE AGUAS RESIDUALES NO DOMÉSTICAS
EMPLEANDO A *Chlorella* sp. Y CONVERSIÓN DE LA BIOMASA MICROBIANA
POR PIRÓLISIS LENTA**

Diana Natalia Céspedes Bernal

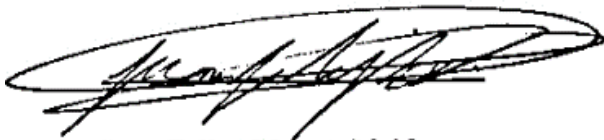
APROBADO



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



Claudia Marcela Rivera Hoyos
Bióloga M.Sc., Ph.D.
Co directora



Juan Felipe Mateus Mald
Microbiólogo industrial
Asesor



Laura Catalina Castillo
Carvajal.
Microbióloga Industrial.
M.Sc., Ph.D.
Universidad Anahúac. México
Jurado

NOTA DE ADVERTENCIA

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

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de Julio de 1946

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento

A mis padres José Adonay Céspedes y Diana María Bernal por el apoyo y entendimiento brindado a lo largo de mi crecimiento personal y profesional, y que, si no fuese por el esfuerzo realizado por ellos, mis estudios no hubiesen sido posibles.

A la Dra Aura Marina Pedroza por permitirme ser parte de este bonito proyecto, por el tiempo dedicado y las constantes palabras de motivación, por haberme orientado, apoyado y corregido en mi labor científica con un interés y entrega que sobrepasan mis expectativas; gracias por todo el apoyo, ánimo, tiempo y paciencia brindada en el desarrollo de esta tesis.

A la Dra Claudia Marcela Rivera Hoyos que, como mi codirectora de tesis siempre me ayudó y guió con todas las inquietudes necesarias para hacer posible este proyecto y por el apoyo y confianza brindada durante todo este proceso, muchas gracias.

Gracias a las personas que, de alguna manera u otra, han sido claves durante el desarrollo de este trabajo de grado y la amistad que se construyó: Juan Felipe Mateus, Mafé Alvarado, Jorge Rengel, Laura Herrera, Paula Salej y Leonardo Peña.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. PLANTEAMIENTO DEL INVESTIGACIÓN Y JUSTIFICACION....	5
3. MARCO TÉORICO	8
3.1 Aguas Residuales No Domésticas (ARnD/ TB)	8
3.2 Impacto ambiental	9
3.3 Normativa Colombiana para vertimientos	11
3.3.1 Resolución 3957 de 2009.....	11
3.3.2 Resolución 0631 de 2015.....	11
3.4 Normativa de nutrientes en aguas residuales.....	13
3.5 Tratamiento fúngico-bacteriano.....	13
3.6 Tratamiento terciario.....	15
3.7 Microalgas Mixotróficas.....	16
3.8 Remediación por microalgas.....	18
3.8.1 Bioacumulación.....	19
3.8.2 Biosorción.....	20
3.8.3 Biotransformación. Remoción de nutrientes	21
3.8.3.1 Nitrógeno y Fósforo.....	21
3.9 <i>Chlorella</i> sp.....	22
3.10 Biochar como alternativa de aprovechamiento para los subproductos generados en el tratamiento de aguas residuales.....	23
3.10.1 Pirólisis.....	25
3.10.2 Materia prima.....	26
3.10.2.1 Microalgas.....	27
3.10.2.2 Lodo secundario de plantas de tratamiento.....	28
3.10.2.3 Biomasa inmovilizada en soportes orgánicos.....	23
3.10.2.4 Corteza de pino.....	30
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	31

5. OBJETIVOS.....	31
5.1 Objetivo general.....	31
5.2 Objetivos específicos.....	31
6. METODOLOGÍA.....	32
6.1 Aislamiento de microalgas.....	32
6.2 Pruebas de tolerancia a diferentes concentraciones de ARnD/TB pos tratada...	34
6.3 Operación de la planta de tratamiento para la obtención del efluente como sustrato para el cultivo mixotrófico de las microalgas y tratamiento terciario de ARnD/ TB.....	35
6.3.1 Propagación y escalamiento del consorcio fúngico-bacteriano.....	36
6.3.2 Potencial enzimático y colonización fúngica.....	37
6.3.3 Montaje planta piloto.....	38
6.3.4 Técnicas analíticas para monitorear los parámetros relacionados con el ARnD/TB.....	39
6.3.4.1 Unidades de color (UC).....	39
6.3.4.2 PH.....	40
6.3.4.3 Sólidos totales/Peso seco.....	40
6.3.4.4 Sólidos suspendidos totales.....	41
6.3.4.5 Sólidos sedimentables.....	41
6.3.4.6 Determinación demanda química de oxígeno (DQO)	41
6.3.4.7 Demanda biológica de oxígeno (DBO ₅)	42
6.3.4.8 Determinación de carbono orgánico total (COT)	42
6.3.4.9 Nitratos (NO ₃ ⁻)	42
6.3.4.10 Nitritos (NO ₂ ⁻)	43
6.3.4.11 Ortofosfatos (HPO ₄ ⁻³)	43
6.4 Remoción con Microalgas o tratamiento terciario en reactor de 15 L.....	43
6.5 Bioconversión de residuos sólidos de la planta para la producción de biochar.....	45
6.5.1 Recuperación de biomasa algal.....	46
6.5.2 Preparación de mezcla para obtener el material crudo.....	47

6.5.3	Producción y caracterización del biochar.....	49
6.5.4	Caracterización física química del material crudo y biochar.....	50
6.5.4.1	Análisis próximo.....	50
6.5.4.2	Determinación de la fracción o carbono volátiles (FV/CV)	50
6.5.4.3	Determinación del contenido de cenizas (C).....	51
6.5.4.4	Determinación de carbono fijo.....	52
6.5.4.5	Determinación de rendimiento en biochar y rendimiento de carbono fijo.....	52
6.6	Microscopia Electronica de Barrido (SEM).....	53
7.	RESULTADOS.....	54
7.1	Aislamiento de microalgas.....	54
7.1.1	Recuento de microalgas.....	57
7.2	Pruebas de tolerancia a concentraciones ascendentes de ARnD/ TB.....	58
7.2.1	Caracterización del ARnD/ TB usada para las pruebas de tolerancia.....	58
7.3	Operación de la planta de tratamiento para la obtención de efluente pos tratado como sustrato para el cultivo mixotrófico de las microalgas y tratamiento terciario en reactor fototrófico.....	61
7.3.1	Potencial enzimático y colonización fúngica.....	61
7.3.2	Operación de la planta para la obtención del efluente.....	64
7.3.3	Primer ciclo de operación de la planta de tratamiento.....	65
7.3.4	Segundo ciclo tratamiento en planta.....	69
7.4	Tratamiento terciario en planta.....	71
7.4.1	Tratamiento terciario con ARnD/ TB estéril o cinética número uno.....	73
7.4.2	Tratamiento terciario con ARnD no estéril o cinética número dos.....	75
7.5	Biochar.....	78
7.5.1	Microscopia Electronica de Barrido.....	81
8.	DISCUSIÓN.....	82
8.1	Aislamiento de microalgas.....	82
8.2	Pruebas de tolerancia.....	85
8.3	Operación planta.....	88
8.4	Cinética con Microalgas o tratamiento terciario en reactor de 15 L.....	94

8.5	Biochar.....	99
9.	CONCLUSIONES.....	102
10.	RECOMENDACIONES.....	103
11.	REFERENCIAS.....	103

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Remediación de nutrientes.....	19
Figura 2. Morfología de <i>Chlorella vulgaris</i> y sus diferentes organelos.....	23
Figura 3. Mecanismos de interacción del biochar con contaminantes inorgánicos...	25
Figura 4. Estructura química del alginato.....	29
Figura 5. Aislamiento de microalgas.....	33
Figura 6. Secuencia de propagación del inoculo.....	37
Figura 7. Planta piloto a escala de Laboratorio.....	39
Figura 8. Cinética del tratamiento terciario con microalgas.....	45
Figura 9. Materia prima para la formulación del biochar.....	46
Figura 10. Recuperación de biomasa algal.....	47
Figura 11. Materia prima del biochar.....	48
Figura 12. Material crudo.....	49
Figura 13. Producción de biochar.....	50
Figura 14. Riqueza específica en función del tiempo.....	55
Figura 15. Morfotipos de microalgas más representativos encontrados en las 3 diferentes columnas de Winogradsky.....	56
Figura 16. Recuento en cámara de Neubauer de las microalgas presentes en las columnas de Winogradsky en función del tiempo de estabilización.....	57
Figura 17. Pruebas de tolerancia.....	60
Figura 18. Potencial enzimático.....	63
Figura 19. Curvas espectrales del efluente y el afluente de la planta piloto de tratamiento.....	66
Figura 20. Parámetros evaluados del primer ciclo en la planta de tratamiento piloto de la facultad de ciencias.....	68
Figura 21. Gráficas de barras de los parámetros iniciales y finales evaluados del segundo ciclo en la planta de tratamiento piloto de la facultad de ciencias.....	711
Figura 22. Curvas espectrales del tratamiento terciario en planta piloto.....	73
Figura 23. Primera cinética de microalgas realizada durante 15 días, con ARnD/TB estéril.....	74

Figura 24. Segunda cinética de microalgas realizada durante 15 días, con ARnD/ TB no estéril. DQO.....	77
Figura 25. Rendimiento en biochar y carbono fijo de los biochar.....	78
Figura 26. Microscopia electrónica de barrido.....	78

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Normativa Colombiana para vertimientos.....	12
Tabla 2. Valores máximos de nitrógeno en aguas residuales.....	13
Tabla 3. Regímenes de cultivo para microalgas y sus requerimientos.....	17
Tabla 4. Tipos de pirolisis y sus características.....	26
Tabla 5. Columnas de Winogradsky utilizadas, con distintos tiempos de estabilización.....	32
Tabla 6. Proporciones de ARnD/ TB y Agua destilada para las pruebas de crecimiento y tolerancia.....	35
Tabla 7. Condiciones seleccionadas para el tratamiento terciario de ARnD/ TB pos-tratada con microalgas durante 10 días.....	44
Tabla 8. Valores iniciales y finales de los parámetros evaluados en el agua residual utilizada para la prueba de tolerancia, y valores máximos permisibles de las resoluciones vigentes: 3957 de 2011 y 0631 de 2011.....	58
Tabla 9. Valores iniciales teóricos para las dosificaciones del efluente utilizado en las pruebas de tolerancia.....	59
Tabla 10. Valores iniciales y finales del ciclo 1 y 2 de los parámetros evaluados en el agua residual operada en planta, y valores máximos permisibles de las resoluciones vigentes: 3957 de 2011 y 0631 de 2015.....	64
Tabla 11. Recuento de hongos y bacterias (Log_{10}) iniciales y finales de la planta piloto.....	69
Tabla 12. Valores iniciales y finales de los parámetros evaluados en el agua residual de la primera y segunda cinética durante el tratamiento terciario operado en planta, y valores máximos permisibles de las resoluciones vigentes: 3957 de 2011 y 0631 de 2015.....	72
Tabla 13. Promedio de los recuentos iniciales y finales de las bacterias.....	75
Tabla 14. Caracterización de la materia prima del biochar.....	79
Tabla 15. Caracterización material crudo y biochar.....	80

TABLA DE ABREVIATURAS

Demanda química de oxígeno.....	DQO
Demanda biológica de oxígeno.....	DBO ₅
Aguas residuales no domesticas.....	ARnD
Aguas residuales no domésticas derivadas de tinciones biológicas.....	ARnD/ TB
Partes por millón.....	ppm
Cristal violeta.....	CV
Rojo Congo.....	CR
Protección del medio marino del Atlántico Nordeste.....	OSPAR
Planta de tratamiento de aguas residuales.....	PTAR
Secretaría Distrital de Ambiente	SDA
Hidrocarburos aromáticos policíclicos.....	HAP
Biochars de aguas residuales	BAR
Gases de efecto invernadero.....	GEI
Biochar de lignocelulosa.....	BLC
Tiempo de retención hidráulica.....	HTR
Agar extracto salvado de trigo.....	AEST
Volumen efectivo de trabajo.....	VE ^T
Unidades de color	UC
Sólidos suspendidos totales.....	SST
Sólidos totales.....	ST
Carbono orgánico total.....	COT
Materia orgánica.....	MO
Fracción volátil.....	FV
Carbono volátil.....	CV
Carbono fijo.....	CF
Microalgas totales.....	MAT
Microalgas clorófitas.....	MAC
Microalgas diatomeas.....	MAD

Manganeso peroxidasa.....	MnP
Lignina peroxidasa.....	LiP
Microscopia electrónica de barrido acoplada a energía dispersiva de rayos X...	SEM/EDS

RESUMEN

Las actividades de docencia de la Facultad de Ciencias de la Pontificia universidad Javeriana residuos derivados de tinciones biológicas, los cuales según la resolución 0631 del 2015 las clasifica como aguas residuales no domésticas (ARnD) provenientes de entidades prestadoras de servicio público y establece límites permitidos para su vertimiento. Esta agua posee altas concentraciones de color, DQO, DBO₅, sólidos, color, nitratos, nitritos, y fosfatos, lo que puede causar problemas como toxicidad aguda a diferentes niveles tróficos y eutrofización en los ecosistemas acuáticos. Actualmente, se utilizan tratamientos biológicos secundarios y terciarios como biomasa inmovilizada y libre para la remoción de contaminantes en aguas residuales, sin embargo, la disposición final de los residuos sólidos producidos genera una problemática ambiental, por lo tanto, la gestión de estos residuos de una manera eco-amigable y económicamente aceptable puede abordarse mediante la conversión pirolítica del lodo a biochar. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de *Chlorella* sp. como tratamiento terciario para aguas residuales no domésticas y realizar la bioconversión de la biomasa obtenida en el tratamiento secundario y terciario a biochar por pirolisis.

Las microalgas fueron recuperadas de diversas columnas de Winogradsky a tres diferentes tiempos de estabilización (3 meses, 9 meses y 12 meses), predominando las microalgas clorófitas sobre diatomeas, y géneros como *Chlorella* sp., *Chlorococcum* sp. y *Achnanbidium* sp fueron los que se persistieron. Posterior a esto, se realizaron pruebas de tolerancia de las algas al 100 % (v/v) del agua residual no domestica derivada de tinciones biológicas (ARnD/TB) postratada, en donde se evidencio el crecimiento y tolerancia de las microalgas a concentraciones ascendentes de DQO (400 mg/L) y se seleccionaron los morfotipos que pudieron crecer en mixotrofia y aquellos resistentes al agua residual, perteneciendo en su mayoría al género *Chlorella* sp. Paralelo a esto, se realizó el montaje, operación y monitoreo de la planta piloto de la Facultad de Ciencias, donde se determino que a pesar de lograr una remoción del 90.6 y 66.9 % de DQO (1040 y 585 mg/L finales) para el primer y segundo ciclo respectivamente, no se logra cumplir con los valores límites permitidos de la resolución 0631 del 2015 (150 mg/L), a su vez, se generó agua residual pos tratada que se utilizó para la cinéticas de la microalgas y un residuo sólido para la producción de biochar.

Las microalgas lograron la remoción de niveles de DQO del 90 % y 70 % (40 y 105 mg/L finales) para la primera y segunda cinética durante 15 días de tratamiento, sin embargo, no se logró una remoción de nitratos ni nitritos por lo contrario estos aumentaron y en la segunda cinética el valor de los nitritos corresponde a 2 mg/L superando el límite establecido por la EPA para no generar un riesgo ambiental (1 mg/L). Finalmente, se realizó una mezcla llenante para la producción de biochar a diferentes temperaturas de pirólisis (300, 500 y 700 °C), el cual posee un material lignocelulósico, como la corteza de pino, y residuos sólidos del tratamiento secundario y terciario en planta como biomasa fúngica-bacteriana, perlas de alginato y microalgas. Dentro de los resultados los porcentajes de carbono fijo (CF) fueron de 27.3, 25.9 y 24.8 %, de cenizas del 13.5 y 20 y 22.5 % y los valores de pH corresponden a 5, 6.4 y 7.7 respectivamente. Adicionalmente el % COT de B300 fue de 26 % el cual según la clasificación del biochar se encuentra en clase III al encontrarse entre valores de ≥ 10 % y < 30 %, y los de B500 y B700 están dentro de la clase II porque se encuentra entre valores de ≥ 30 % y < 60 %.

1. INTRODUCCIÓN

Con el aumento de la población humana, la eliminación de los residuos generados por los humanos plantea el uso de estrategias que resuelvan o minimicen los riesgos a nivel ambiental y salud pública. La salud humana está en peligro como consecuencia de la rápida contaminación de los suministros de agua por metales pesados, eutrofización, contaminantes orgánicos persistentes, aguas residuales y acidificación. Las aguas residuales son ricas en nutrientes orgánicos e inorgánicos, y con su alta demanda química de oxígeno (DQO) y su demanda biológica de oxígeno (DBO₅), representan una amenaza ambiental si no se tratan. En el agua residual se pueden encontrar compuestos nitrogenados, fosfatados, carbonos orgánicos, ácidos grasos volátiles, compuestos farmacéuticos, metales pesados y colorantes [Duarte et al., 2009; Yu et al., 2017a].

Los tratamientos aeróbicos y anaeróbicos convencionales son los métodos más utilizados para eliminar la DQO, la DBO₅, los clorofenoles y el color producido por diferentes compuestos azoicos, antraquinónicos y trifenilmetanos los cuales son usados comúnmente en la fabricación de textiles y en la acuicultura como agente biocida. También se utiliza en pruebas microbiológicas para identificar bacterias a través de tinción de Gram con colorantes como el cristal violeta y tinción de esporas de bacterias con verde de malaquita, los cuales son ampliamente utilizadas en las actividades de docencia de la Pontificia Universidad Javeriana. Dentro de las estrategias para la remoción de compuestos recalcitrantes y tóxicos en el agua, se han estudiado procesos de bioadsorción y biotransformación, una combinación de estos dos mecanismos resulta en una mayor eliminación y reducción de las eficiencias de toxicidad del compuesto inicial [Morales et al., 2017; Pedroza-Camacho et al., 2018].

Los procesos de tratamiento primario y secundario se han introducido en un número creciente de lugares, con el fin de eliminar los materiales de fácil sedimentación o eliminación por diferencia de densidades (tratamiento primario) y oxidar el material orgánico presente en las aguas residuales (tratamiento secundario). Sin embargo, aunque el resultado final es un efluente claro y aparentemente limpio que se descarga en cuerpos de agua naturales, este efluente secundario está cargado con nitrógeno y fósforo inorgánicos y causa eutrofización y más problemas a largo plazo debido a los compuestos orgánicos recalcitrantes y los metales pesados

que se descargan, alterando la sostenibilidad de la cadena trófica, provocando riesgos potenciales en la naturaleza y en la sociedad, debido a que originan serios problemas en la salud humana y animal [Abdel-Raouf et al., 2012].

En Colombia existen dos normativas que establecen los parámetros y sus valores máximos permisibles para los vertimientos, la resolución 0631 de 2015 que rige en todo el territorio nacional y la resolución 3957 de 2009 la cual solo aplica para los vertimientos generados en el Distrito Capital. 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 buscó adicionar a la planta de tratamiento un proceso unitario complementario para tratar de remover ese 15 % al emplear microalgas mixotróficas para la remoción de color y materia orgánica.

El tratamiento terciario es donde ocurre la eliminación de muchos compuestos inorgánicos disueltos, incluyendo N y P. Para las microalgas, el agua residual funciona como fuente de nutrientes reduciendo en gran medida los costos de producción. Su crecimiento en aguas residuales proporciona biomasa y biorremediación simultánea de aguas residuales. Algunas especies de microalgas verdes unicelulares son tolerantes a las condiciones de efluentes de aguas residuales, especialmente los de los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus*. Además, el cultivo especializado de microalgas puede estimular cambios en el metabolismo, pueden crecer bajo esquemas autótrofos, mixotróficos y heterótrofos. Entre estos tres mecanismos de crecimiento, el cultivo mixotrófico es particularmente atractivo porque las algas pueden crecer bajo metabolismos autótrofos y heterótrofos al usar la luz solar y carbonatos inorgánicos/ orgánicos presentes en el agua, siendo un modo potencial para el cultivo masivo de microalgas [Pittman et al., 2011; Hamed et al., 2014; Roostaei et al., 2018].

La biomasa algal y el lodo fúngico-bacteriano representa una fuente de energía renovable y un producto sólido orgánico o no orgánico biológico complejo derivado del tratamiento en planta. Los residuos sólidos son una de las fuentes más prometedoras de energía alternativa que puede resolver el problema de la crisis energética en el mundo hasta cierto punto debido a su disponibilidad. Además, el uso de biomasa también puede reducir el problema del calentamiento global y la contaminación. Las tecnologías de conversión de bioenergía son aquellas que se utilizan para extraer la energía de la biomasa, como la pirólisis lenta para la obtención de biochar, es decir, la biomasa se somete a un lento proceso de pirólisis (300 – 700 °C) con un tiempo de residencia de vapor de varios minutos a horas para la producción de carbón [Tripathi et al., 2016; Chang et al., 2015].

El aumento de la concentración de CO₂ en la atmósfera ha despertado el interés en la búsqueda de estrategias para mitigar el CO₂ producido, incluidas tecnologías de fijación tales como: reacciones químicas como el lavado de emisiones con soluciones alcalinas; y procesos biológicos, por medio de organismos autótrofos. Este último llevado a cabo por microalgas y cianobacterias, que son fijadores naturales de carbono, ya que pueden capturar CO₂ directamente del aire y convertirlo en biomasa [Zhang et al., 2017; Arbib et al., 2014]. Además, se han estudiado ampliamente por su potencial como biosorbente para la eliminación de contaminantes orgánicos e inorgánicos debido a su capacidad de biosorción atribuida por una gran cantidad de grupos funcionales presentes en la pared celular [Yu et al., 2017b].

2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN Y JUSTIFICACIÓN

El incontrolado desarrollo industrial y el aumento desmesurado de la población humana junto con sus intervenciones antropogénicas han generado diferentes tipos de contaminación ambiental, ya sea, en el agua, suelo o aire. Lo que da como consecuencia la alteración de ecosistemas y seres vivos. Es por esta razón que, para mitigar la contaminación en aguas, todas las empresas que realicen actividades industriales, comerciales o de servicio que generen vertimientos de aguas residuales no domésticas (ARnD) a los sistemas de alcantarillado público y a los cuerpos de aguas superficiales deben cumplir con los valores máximos permisibles de vertimiento puntual para los parámetros fisicoquímicos establecidos por la resolución

colombiana 0631 de 2015. La Pontificia Universidad Javeriana es generadora de aguas residuales domésticas y no domésticas provenientes de los laboratorios de docencia producto de las diferentes actividades desarrolladas por los estudiantes, como los residuos líquidos derivados de tinciones biológicas. Aproximadamente, se generan 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. Tanto para la Universidad, como para las industrias, cumplir con esta normativa implica gastos económicos en la medida en que realizan seguimiento a la generación de residuos químicos y verifican la entrega de estos residuos al gestor externo autorizado para su respectivo tratamiento y disposición final.

Por otro lado, con respecto a la contaminación en el aire. Un último boletín (N° 13, 30 de marzo de 2017) de la Organización Meteorológica Mundial sobre los gases de efecto invernadero informa que el CO₂ es, con mucho, el principal gas de efecto invernadero de larga duración de la atmósfera. La concentración media mundial de CO₂ pasó de las 400,0 partes por millón (ppm) en 2015 a 403,3 ppm en 2016. Producto de intervenciones antropogénicas que conllevan a una alteración en el ciclo global del carbono y problemas de calentamiento global (fenómeno del niño). Además, a causa de un incremento de la población mundial del 98 %, la producción alimentaria en un 146 % y la producción per cápita de alimentos de un 24 % entre 1961 y 2000, los rendimientos de los cultivos se han más que duplicado y notablemente, el área de tierra cultivable en uso sólo se incrementó en un ocho por ciento. Así mismo, el uso de fertilizantes incremento, donde el uso fertilizante con nitrógeno se incrementó por un factor de siete, fertilizantes con fósforo por un factor de tres y el agua de riego por un factor de dos, generando una descompensación de nutrientes en suelos agrícolas ya sea por su exceso o deficiencia y, sumado a esto, la presencia de elementos traza y metales pesados en su composición [FAO, 2015]. Por estas razones es que el uso de un biochar a partir de microalgas mixotróficas, lodo fúngico-bacteriano y perlas de alginato con *Pichia pastoris* derivadas de la remediación de aguas residuales podría proporcionar un beneficio notable en el futuro al utilizar la biomasa para la generación de energía negativa de carbono y su posterior aplicación al medio ambiente, lo cual no solo disminuirá los niveles de CO₂ presente en la atmósfera, sino que también funciona como un adsorbente de contaminantes en aguas.

Actualmente, en la Facultad de Ciencias de la Universidad Javeriana existe una planta piloto con diferentes unidades de tratamiento para el manejo de los residuos generados en los laboratorios de docencia. Dispone de, pretratamiento (tanque de igualación), tratamiento primario (trampas de grasas), tratamiento secundario (reactor biológico), sedimentador y filtros de arena y carbón activado. Aunque la planta logra disminuir los diferentes parámetros fisicoquímicos como, DQO, DBO₅, unidades de color y sólidos suspendidos totales, los cuales definen el grado de contaminación del agua, todavía sigue sin cumplir con los valores máximos permisibles dispuestos en la resolución 0631 de 2015. Para la remoción de los compuestos de difícil degradación como lo son los nutrientes y el color remanentes, se podría implementar un proceso unitario acoplado a la planta piloto, como tratamiento terciario. Por ello, utilizar microalgas como tratamiento biológico de compuestos de difícil degradación (tratamiento terciario) bajo condiciones mixotróficas proporciona ventajas económicas debido al aprovechamiento de la biomasa algal producida para generar productos sostenibles que favorecen la disminución de contaminantes ambientales de importancia mundial.

El presente trabajo se enfocó en el aprovechamiento de microalgas aisladas de columnas de Winogradsky empleadas en la asignatura de Microbiología Ambiental. Con el objetivo de cultivarlas bajo condiciones mixotróficas y de seleccionar las que toleraran el agua residual no doméstica (ARnD) pos tratada en la planta piloto, para acoplar un tratamiento terciario que permitiera remover contaminantes remanentes de difícil degradación y nutrientes causantes de eutrofización en aguas, y de esta forma convertir un tratamiento convencional de aguas residuales en un proceso autosostenible. Finalmente, se buscó un aprovechamiento posterior de la biomasa producto del tratamiento secundario (biomasa libre e inmovilizada) y tratamiento terciario (microalgas), estos materiales formarían parte de una mezcla llenante para la formulación de un nuevo tipo de biochar que tenga las características de un material rico en nutrientes, pero sin embargo al ser pobre en carbono se le adicionara un material lignocelulósico como la corteza de pino que se caracteriza por ser rico en carbono. El biochar desempeñara un papel importante en la captura y almacenamiento de CO₂, en reducir la velocidad de descomposición de los nutrientes del suelo y aportarlos mejorando la calidad del suelo, además de favorecer la eliminación de metales pesados y, por último, pero no menos importante en su uso como un adsorbente de contaminantes en aguas residuales.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Aguas Residuales No Domésticas (ARnD/TB)

Los principales contaminantes que se encuentran en las aguas residuales textiles son sólidos suspendidos, demanda química de oxígeno altamente recalcitrante, colorantes que dan un color intenso y otras sustancias solubles. Entre los diversos contaminantes, los tintes son los únicos que pueden ser visibles a simple vista, incluso en concentraciones muy bajas. Dependiendo de su naturaleza, concentración y tiempo de exposición, los efectos de los tintes pueden ser agudos o crónicos. Pueden causar problemas como irritación de la piel, enfermedades respiratorias, trastornos mentales, vómitos y, en muchos casos, pueden ser cancerígenos y mutagénicos **[Mashkoor et al., 2018]**.

Las moléculas de los colorantes contienen dos componentes clave: los cromóforos, responsables de producir el color, y los auxocromos, que no solo pueden complementar el cromóforo, sino que también hacen que la molécula sea soluble en agua y proporcione una afinidad mejorada, de unión a las fibras. Estos pueden clasificarse de acuerdo con su estructura química en azo, trifenilmetano, heterocíclicos y poliméricos **[Gupta et al., 2009]**.

Los colorantes azo y trifenilmetano tienen un uso industrial generalizado, pero no son fácilmente biodegradables. Los tintes de trifenilmetano pertenecen al grupo más importante de colorantes sintéticos y se usan ampliamente en las industrias textiles, generalmente se les considera como compuestos xenobióticos, que son muy recalcitrantes para la biodegradación **[Shedbalkar et al., 2008]**. Dentro de este tipo de colorantes, se encuentran: el cristal violeta (CV), que es un tinte sintético triarilmetano con un tono púrpura intenso, se usa para teñir bacterias Gram positivas y se ha informado que es altamente tóxico y su permanencia en el medio ambiente es prolongada **[Mashkoor et al., 2018]**; y el verde de malaquita, que es un colorante diaminotriphenilmetano N-metilado el cual tiene varias aplicaciones, entre ellas, como colorante y para el tratamiento contra parásito protozoos de agua dulce. Particularmente, cuando el verde malaquita se libera a cuerpos acuáticos puede causar efectos perjudiciales en las gónadas de los peces, branquias y otros órganos intestinales. Igualmente, en los seres humanos, actúa como un agente que favorece la formación de tumores y puede causar enrojecimiento y dolor al entrar en

contacto con la piel [Beak et al., 2009]. Por último, la fucsina básica, un colorante triaminotrifenilmetano, es una mezcla de tres tintes Pararosaniline, Rosaniline, y Magenta II. Adicionalmente, es uno de los pocos tintes que es inflamable en la naturaleza. Es ampliamente utilizado como agente colorante para materiales textiles y de cuero. También se usa para teñir colágeno, músculo, mitocondrias y bacterias Gram negativas [Gupta, 2008].

Entre todos los otros tintes, los tintes azo pertenecen a la clase más grande de tintes sintéticos porque representan el 60–70 % del consumo total de los tintes. Los colorantes azoicos son compuestos aromáticos complejos con una mezcla estructural significativa y son un problema ambiental grave porque la escisión reductiva de los enlaces azo es responsable de la formación de aminas, que se clasifican como tóxicas y carcinógenas. Dentro de este grupo se encuentra el rojo Congo (CR), que es una sal de sodio de 3,3'-([1,1'-bifenil]-4,4'-diyl)bis(4-aminonaftalen-1-ácido sulfónico), es un colorante diazoico aniónico basado en el acoplamiento tetrazotizado de bencidina con dos moléculas de ácido naftiónico. Tiene una estructura química compleja, alta solubilidad en una solución acuosa y naturaleza altamente persistente una vez que se está descargando en el medio ambiente [Raval et al., 2016]. Se usa ampliamente en micología para la tinción de hongos.

Dentro de los laboratorios de docencia de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana, estos compuestos químicos se utilizan continuamente en las pruebas realizadas para la identificación y diagnóstico de muestras biológicas. Los colorantes utilizados en el proceso de tinción incluyen trifenilmetano y colorantes azoicos, mencionados anteriormente. Los mordientes y disolventes también se utilizan en diferentes técnicas, como el lugol en la tinción de Gram. Sin embargo, los residuos líquidos recogidos después de los procesos de tinción dan como resultado la formación de aguas residuales de alta toxicidad, presencia de microorganismos, baja transparencia y alto contenido de carbono orgánico [Fernández et al., 2015].

3.2 Impacto Ambiental

Los efluentes de los sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales son una combinación de materia orgánica natural, productos microbianos solubles y sustancias químicas dañinas. De

particular interés, son los productos químicos orgánicos recalcitrantes que son resistentes a la biodegradación y, por lo tanto, son difíciles de eliminar durante el tratamiento de aguas residuales típico. Algunos micro contaminantes asociados con el efluente de aguas residuales pueden causar impactos adversos a la salud acuática y humana si los compuestos están presentes en el agua reciclada [Shon et al., 2006]. Se ha correlacionado la exposición del efluente en los cuerpos de agua con alteraciones en los niveles de hormonas esteroideas sexuales en peces adultos y juveniles, así como enfermedades a largo plazo (reproductivas, endocrinas, inmunes, genotóxicas, nefrotóxicas) [Liney et al., 2006].

Dentro de los contaminantes presentes en aguas residuales se encuentran los clorofenoles (20–50 mgL⁻¹), si estos contaminantes se descargan accidental o intencionalmente en cuerpos de agua superficiales, pueden tener un impacto grave en el medio ambiente. Específicamente, las aguas residuales contaminadas consumen oxígeno disuelto, bloquean el paso de la luz solar e inhiben la fotosíntesis. Además, algunos compuestos clorados están bioacumulados y son tóxicos para varias especies [Rivera-Hoyos et al., 2018]. 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., 2017].

Una característica del efluente de una planta de tratamiento de agua residual es que a menudo afecta a las aguas receptoras en su contenido de nutrientes. Aunque se puede suponer que las plantas están reguladas (es decir, requieren un permiso de descarga) y, por lo tanto, no contribuyen significativamente a las cargas de contaminantes, esto no es necesariamente cierto para los nutrientes (Tabla 1). Muchos sistemas acuáticos tienen concentraciones muy bajas de nutrientes ambientales y, pequeños cambios en la carga de nutrientes pueden resultar en cambios dramáticos en la estructura de la comunidad. Según la Convención para la Protección del Medio Ambiente Marino del Atlántico del Nordeste (OSPAR), la eutrofización fue considerada como “el resultado del enriquecimiento excesivo de agua con nutrientes que puede causar un aumento en el crecimiento acelerado de algas en la columna de agua y formas más altas de plantas que viven en el fondo del mar”, un problema generalizado en todo el mundo que afecta la calidad de los recursos hídricos domésticos, industriales, agrícolas y recreativos. Los problemas asociados con la eutrofización incluyen aumento de la biomasa de algas, disminución de la transparencia

del agua, niveles bajos de oxígeno disuelto, aumento de la mortalidad de los peces e incidencias más frecuentes de fitoplancton tóxico [Carey et al., 2009; Ménesguen et al., 2018].

Por otro lado, las plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas (PTAR) se han considerado como fuente potencial de emisiones antropógenas de gases de efecto invernadero y, por lo tanto, una causa directa del cambio climático y la contaminación del aire. La principal fuente de CO₂ de las PTAR es el carbono orgánico presente en las aguas residuales que se oxida directamente a CO₂ o se incorpora a la biomasa mediante un proceso de purificación biológica. Dicha biomasa se convierte luego parcialmente en CH₄ y CO₂ en la fase de digestión anaeróbica de la línea de tratamiento de lodos, y, finalmente, el CH₄ producido se oxida en CO₂ a través de la combustión de biogás. Como propuesta, existen los procesos biológicos y eco-sostenibles, como el cultivo de microalgas, las cuales son consideradas como alternativas atractivas para el secuestro de gas CO₂. De hecho, las microalgas resultan 10–50 veces más eficientes en la conversión de CO₂ en comparación con las plantas terrestres y, además, pueden crecer en aguas residuales urbanas bajo condiciones mixotróficas [Iasimone et al., 2017].

3.3 Normativa Colombiana para vertimientos

En Colombia existen dos normativas para el vertimiento de aguas residuales al alcantarillado público, la resolución 3957 de 2009 y la resolución 0631 de 2015.

3.3.1 Resolución 3957 de 2009

Establece la norma técnica, para el control y manejo de los vertimientos realizados a la red de alcantarillado público en Bogotá D.C., dispuesto por la Secretaría Distrital de Ambiente (SDA). Fija las concentraciones o estándares máximos permitidos para su vertido (**Tabla 1**).

3.3.2 Resolución 0631 de 2015

Establece los parámetros y los valores límites máximos permisibles en los vertimientos puntuales a cuerpos de aguas superficiales y a los sistemas de alcantarillado público de aguas residuales domésticas, de actividades industriales, comerciales o de servicio, asimismo como de las aguas

residuales no domésticas provenientes de entidades prestadoras de servicio público, en la cual esta clasificada la Universidad. Esta resolución fue emitida por el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. En la **tabla 1** se muestran los valores máximos permitidos para el sector asociado a servicios, donde se encuentran las universidades, específicamente los residuos generados en los centros de investigación.

Tabla 1. Normativa Colombiana para vertimientos. 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.

Parámetro	Unidades	Resolución 3957 de 2009	Resolución 0631 de 2015
Sólidos totales	mg/L	No aplica	No aplica
Sólidos suspendidos totales	mg/L	600.00	50.00
Sólidos disueltos totales	mg/L	No aplica	No aplica
Sólidos sedimentables	mL/L	2.00	1.00
DQO	mg/L O ₂	1500.00	150.00
DBO ₅	mg/L O ₂	800.00	50.00
DBO ₅ /DQO	-	No Aplica	No Aplica
COT	mg/L	No aplica	No aplica
pH	-	5.00-9.00	6.00-9.00
Conductividad eléctrica	mS/cm	No aplica	No aplica
Unidades de color	UC	1000.00	No aplica
Nitratos [NO ₃ ⁻]	mg/ L	No aplica	Análisis y reporte
Nitritos [NO ₂ ⁻]	mg/ L	No aplica	Análisis y reporte

Ortofosfatos [PO ₄]	mg/ L	No aplica	Análisis y reporte
---------------------------------	-------	-----------	--------------------

3.4 Normativa de nutrientes en aguas residuales

La concentración de nitrato en aguas subterráneas y superficiales suele ser baja, pero puede llegar a ser alta por filtración o escorrentía de tierras agrícolas o debido a la contaminación por residuos humanos o animales como consecuencia de la oxidación del amoníaco y fuentes similares. Las condiciones anaerobias pueden favorecer la formación y persistencia del nitrito. Dentro de los valores límites máximos de contaminación establecidos por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos y la OMS se encuentra en la **tabla 2**, y el principal riesgo del nitrito es la metahemoglobinemia en lactantes, niños menores de 6 meses.

Tabla 2. Valores máximos de nitrógeno en aguas residuales.

Parámetro	US EPA mg/L	OMS mg/L
Nitratos [NO ₃ ⁻]	10	50
Nitritos [NO ₂ ⁻]	1	3 0.2 (exposición prolongada)

Por otro lado, según la FAO la concentración máxima en aguas residuales de fósforo total es de 25 mg/L y de nitrógeno total de 150 mg/L

3.5 Tratamiento fúngico-bacteriano

La decoloración microbiana es una alternativa amigable con el medio ambiente y rentable. Varios tipos de microorganismos, como hongos (*Penicillium decumbens*, *Aspergillus* sp., *Aspergillus niger*, *Flavodon flavus*), hongos de podredumbre blanca (*Phanerochaete* sp., *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Coriolus* sp.), levaduras (*Citeromyces* sp.) y bacterias (*Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., Bacterias acetogénicas) [Jiranuntipon et al., 2008] pueden llevar a cabo diferentes procesos que favorecen el tratamiento de aguas residuales provenientes de industrias textiles.

Los hongos de podredumbre blanca *Basidiomycetes* son conocidos por su eficiente descomposición de lignina, celulosa y hemicelulosa, y su transformación en dióxido de carbono. En la actualidad, más de 100 lacasas de hongos *Basidiomycetes* y *Ascomycetes* se han purificado y caracterizado. Los hongos ligninolíticos producen diversas enzimas extracelulares (lacasa EC 1.10.3.2, lignina peroxidasa EC 1.11.1.14 y manganeso peroxidasa EC 1.11.1.13), que degradan los compuestos de bajo peso molecular (quelantes) y las especies reactivas de oxígeno (radicales hidroxilos) y están involucrados en la degradación de la lignina (*biopulping*) y compuestos con estructuras similares, como clorofenoles, lignina modificada y tintes, entre otros. Varios autores han demostrado que los hongos ligninolíticos son una alternativa prometedora para el tratamiento de aguas residuales de la industria del papel [Rivera-Hoyos et al., 2018]. Las lacasas son ampliamente usadas para procesos industriales relacionados con la biorremediación; incluida la deslignificación de lignocelulósicos, eliminación de color y desintoxicación de tintes industriales, biorremediación de compuestos xenobióticos, pesticidas, explosivos, tratamiento de aguas residuales y tratamiento de otros contaminantes como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) [Rivera-Hoyos et al., 2013]. Además, dentro de las peroxidases se encuentran las lignino peroxidases, que mineralizan una gran variedad de compuestos aromáticos recalcitrantes y oxidan varios compuestos aromáticos y fenólicos policíclicos, y; las manganeso peroxidases que catalizan la oxidación de varios fenoles monoaromáticos y tintes aromáticos [Durán et al., 2000]. Por ejemplo, el tratamiento biológico con hongos de podredumbre blanca como *T. versicolor* implica múltiples reacciones bioquímicas y físicas que pueden llevarse a cabo simultáneamente, como la descomposición de los enlaces intermoleculares, la desmetilación, la hidroxilación, la decloración y la apertura del anillo aromático [Pedroza-Rodríguez y Rodríguez, 2013].

Con respecto a las bacterias, el mecanismo más simple de eliminación de color por células bacterianas es el de la adsorción del colorante sobre la biomasa, aunque no es adecuado para el tratamiento a largo plazo. Esto se debe a que, durante la adsorción, el colorante se concentra en la biomasa, que se saturará con el tiempo. La bioasociación entre el colorante y las células bacterianas tiende a ser el primer paso en la reducción biológica de los colorantes azoicos, que es una tecnología de tratamiento destructiva. El segundo paso llevado a cabo es la biodegradación por enzimas azorreductasas que sintetizan las bacterias para este compuesto que, en condiciones controladas, pueda dividir de forma reductora el grupo azo en presencia de

oxígeno. En contraste, la reducción bacteriana en condiciones anaeróbicas es relativamente inespecífica con respecto a los compuestos azoicos involucrados y, por lo tanto, es de mayor uso para la eliminación de color en las aguas residuales [Pearce et al., 2003]. Por otro lado, las bacterias al ser cruciales para el funcionamiento del ecosistema y jugar un papel vital en los ciclos del carbono, nitrógeno y azufre realizan denitrificación, nitrificación, reducción de azufre, entre otros. Los cuales son procesos dominantes en plantas de tratamiento de agua residual.

Entre las alternativas biológicas, el uso de los consorcios de hongos y bacterias puede utilizarse para aumentar la eficiencia de eliminación en las plantas de tratamiento de este tipo de aguas residuales. Entre estos sistemas, el uso de hongos ligninolíticos en asociación con bacterias heterótrofas, mesofílicas y aeróbicas representa una opción viable. El éxito de los consorcios se basa en interacciones sinérgicas. En primer lugar, los hongos transforman los colorantes y otros compuestos aromáticos en productos menos complejos que finalmente utilizan las bacterias. Las enzimas más importantes probadas dentro del grupo de investigación están asociadas a hongos, sin embargo, la acción combinada con enzimas bacterianas y proceso de adsorción a la pared celular mejoran sustancialmente la eliminación de contaminantes con variedad de estructuras químicas. No obstante, este efluente secundario está cargado con nitrógeno y fósforo inorgánicos y causa eutrofización y más problemas a largo plazo debido a los compuestos orgánicos refractarios y los metales pesados que se descargan [Pedroza-Camacho et al., 2018; Abdel-Raouf et al., 2012].

3.6 Tratamiento terciario

El proceso de tratamiento terciario tiene como objetivo eliminar todos los iones orgánicos y color residual. Puede lograrse biológica o químicamente. Los tratamientos avanzados como la precipitación química, la ozonización, la ósmosis inversa o la adsorción de carbono incluyen procesos diseñados para eliminar nutrientes particulares, como el fósforo o el nitrógeno, que pueden estimular la eutrofización. El proceso de tratamiento terciario biológico presenta mejores resultados en comparación con los procesos químicos que en general son demasiado costosos de implementar en la mayoría de los lugares y que pueden conducir a una contaminación secundaria. Es por esta razón que, los métodos naturales para el tratamiento de aguas residuales como el uso de sistemas acuícolas como sistemas de ingeniería en el tratamiento y reciclaje de

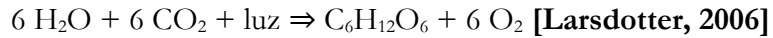
aguas residuales ha aumentado enormemente en los últimos años, están diseñados para lograr un tratamiento específico de las aguas residuales y pueden resolver simultáneamente los problemas ambientales y sanitarios y también pueden ser económicamente eficientes [Abdel-Raouf et al., 2012].

El potencial de las microalgas para la remediación de nitrógeno y fósforo inorgánicos a partir de aguas residuales está bien documentado y se considera un enfoque ambiental para la eliminación de nutrientes persistentes en aguas. Además de permitir bajas descargas de nutrientes, se han agregado una serie de beneficios adicionales, como: (a) el secuestro de CO₂ de la atmósfera durante la fotosíntesis; (b) oxigenar el efluente tratado; (c) a diferencia de los procesos de tratamiento biológico alternativo, una fuente de carbono inorgánico obligatoria es innecesaria para optimizar el tratamiento y (d) la eliminación de microcontaminantes orgánicos traza. Además, después del tratamiento, la biomasa de algas se puede procesar para la producción de productos de bajo valor dentro de la nutrición humana y animal, cosméticos y biocombustibles, incluido el biometano a través de la digestión anaeróbica de la biomasa residual. Sumado a esto, las microalgas son ubicuas en los entornos de aguas residuales [Whitton et al., 2015; Wang et al., 2009].

3.7 Microalgas mixotróficas

Las microalgas utilizan el carbono inorgánico de tres formas diferentes: CO₂ de la atmósfera, CO₂ en los gases de descarga de la industria y, CO₂ de carbonatos solubles como Na₂CO₃ y NaHCO₃. En condiciones de crecimiento natural, las microalgas fijan el CO₂ del aire, que contiene 360 ppmv de CO₂. Sin embargo, la mayoría de las microalgas pueden tolerar y utilizar niveles sustancialmente más altos de CO₂, típicamente hasta 150.000 ppm [Brennan et al., 2010].

En el proceso de asimilación de carbono inorgánico, la energía solar se convierte en energía química con oxígeno (O₂) como subproducto, y en un segundo paso, la energía química se utiliza para asimilar el dióxido de carbono (CO₂) y convertirlo en azúcares. La fórmula estequiométrica general para la fotosíntesis es:



Las especies de carbono inorgánico normalmente utilizadas por las microalgas son CO_2 y HCO_3^- , este último requiere que la enzima Anhidrasa carbónica (EC 4.2.1.1) lo convierta en CO_2 . Además de estas, algunas especies de algas también pueden utilizar fuentes de carbono orgánico, como ácidos orgánicos, azúcares, acetato o glicerol. Este metabolismo heterótrofo es probablemente significativo en reactores de aguas residuales no domésticas [Larsdotter, 2006].

Algunos estudios han indicado que aproximadamente el 25–50 % del carbono presente en las algas en los estanques de algas de alta velocidad se deriva de la utilización heterotrófica del carbono orgánico. Las fuentes de carbono orgánico pueden asimilarse químicamente o fotoheterotróficamente. En el primer caso, el sustrato orgánico se usa como fuente de energía (a través de la respiración) y como fuente de carbono, mientras que, en el segundo caso, la luz es la fuente de energía. En varias especies de algas, el modo de nutrición puede cambiarse de autotrofia a heterotrofia cuando se cambia la fuente de carbono por un metabolismo mixotrófico; este es el caso de, por ejemplo, las algas verdes *Chlorella* y *Scenedesmus* [Larsdotter, 2006].

Como se mencionó anteriormente, el régimen de crecimiento mixotrófico en microalgas contempla dos etapas (Tabla 3). En la primera etapa, se encuentra el metabolismo heterótrofo, que se refiere a la obtención de energía y carbono a partir de compuestos orgánicos disponibles en el medio ambiente. Cuando el carbono orgánico se agota a un cierto nivel, se induce la fotosíntesis y las algas comienzan a asimilar el CO_2 de forma fotoautotrófica, lo que indica el inicio de la segunda etapa. En la segunda etapa, se emplea la luz solar y el dióxido de carbono para formar energía y carbono celular. Si se integra con ciclos de luz y oscuridad, que permiten la autotrofia y la heterotrofia en sus condiciones óptimas, el contenido de biomasa y lípidos del cultivo mixotrófico incrementará significativamente [Lowrey et al., 2014; Zhan et al., 2017].

Tabla 3. Regímenes de cultivo para microalgas y sus requerimientos. Fuente: [Lowrey et al., 2014].

Modo de cultivo	Fuente de energía	Fuente de carbono	Escala del reactor
-----------------	-------------------	-------------------	--------------------

Fotótrofo	Luz	Inorgánico (CO ₂)	Estanque abierto o fotobiorreactor
Heterotrófico	Orgánico	Orgánico (glucosa, glicerol, acetato)	Biorreactor convencional
Mixotrófico	Luz y orgánico	Inorgánico (CO ₂) y orgánico	Fotobiorreactor cerrado

La mixotrofia combina las ventajas de la autotrofia y heterotrofia y supera las desventajas de autotrofia. En condiciones de cultivo mixotrófico, las microalgas no solo pueden crecer de forma heterótrofa con carbono orgánico, aumentando la tasa de crecimiento y mejorando la biomasa y la acumulación de lípidos, sino que también consumen carbono inorgánico (CO₂) y producen oxígeno a través de la fotosíntesis, lo que hace que la emisión general de CO₂ sea menor en modo de cultivo mixotrófico que en modo de cultivo heterotrófico. A diferencia de la heterotrofia, los pigmentos valiosos y los carotenoides fotosintéticos como el b-caroteno podrían conservarse en condiciones de iluminación, aunque la eficiencia de conversión de energía mixotrófica es menor debido a las pérdidas fotosintéticas [Zhan et al., 2017].

Las principales limitaciones para el cultivo mixotrófico son: [Lowrey et al., 2014]

1. La necesidad de luz, CO₂, y carbono orgánico.
2. Reducción de la eficiencia de conversión de energía en comparación con la heterotrofia, a pesar de la mejora de la economía de la energía en comparación con el crecimiento autótrofo.
3. La liberación neta de dióxido de carbono a pesar de su fijación fotosintética.
4. Susceptibilidad al estrés.

3.8 Remediación por microalgas

La remoción de nutrientes, como los nitratos, nitritos y ortofosfatos, mediado por microalgas ocurre a través de vías asimilativas o des asimilativas presentes en la **figura 1**. La remoción directa

de nitrógeno y fósforo en aguas se logra a través de vías bioquímicas interconectadas para la captación de los nutrientes para producción de energía y almacenamiento o la asimilación en ácidos nucleicos y proteínas para el crecimiento de la biomasa. Las proteínas, los lípidos y los carbohidratos son los principales componentes orgánicos de las células de microalgas, que representan más del 95 % del peso seco de algas [Whitton et al., 2015; Zhuang et al., 2018].

Las algas poseen la capacidad en los sistemas de tratamiento de aguas residuales de eliminar la materia orgánica, los nutrientes y microcontaminantes orgánicos. Estos últimos como los compuestos fenólicos, surfactantes, biocidas e hidrocarburos aromáticos policíclicos sugieren que los sistemas de tratamiento de aguas residuales basados en microalgas pueden eliminarlos por evaporación, fotodegradación, biodegradación y/o adsorción de microalgas [Matamoras et al., 2006].

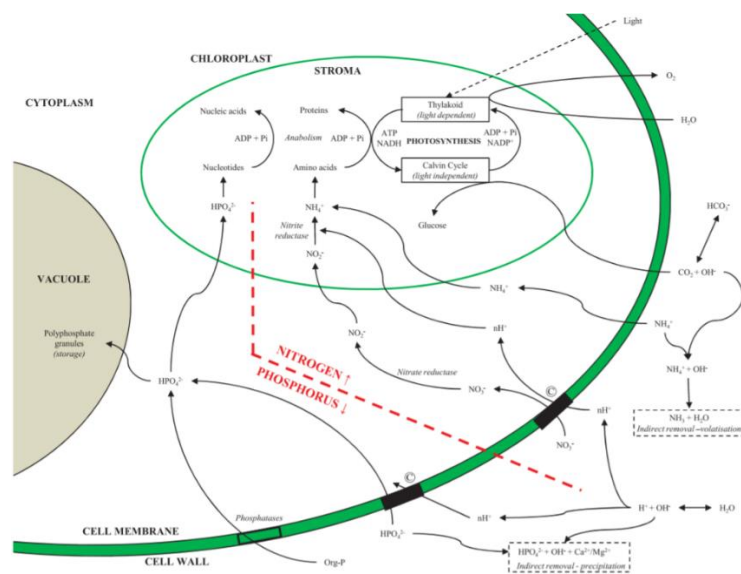


Figura 1. Remediación de nutrientes. Diagrama esquemático de una célula de microalgas que resume las vías bioquímicas de la remediación de nitrógeno y fósforo. Incluyendo mecanismos indirectos (resaltados dentro de un cuadro discontinuo). Fuente: [Whitton et al., 2015].

3.8.1 Bioacumulación

El proceso de bioacumulación se refiere a la acumulación de sustancias, como pesticidas u otros químicos orgánicos en un organismo y se define como la transferencia de contaminantes orgánicos o inorgánicos al interior de las células vivas. En este proceso, también se pueden

eliminar los nutrientes de los efluentes tratados (nitratos, fosfatos, sulfatos, compuestos orgánicos e inorgánicos de carbono). Por ejemplo, los estanques artificiales que contienen microorganismos fotosintéticos se pueden usar para tratar lixiviados mineros con el uso de la eutrofización controlada. La bioacumulación ocurre cuando un organismo absorbe una sustancia a una velocidad mayor que la que se pierde. Por lo tanto, cuanto más larga sea la vida media biológica de la sustancia, mayor será el riesgo de envenenamiento crónico, incluso si los niveles ambientales del compuesto contaminante no son muy altos. Además, el contenido de lípidos de muchas especies de algas proporciona un punto de entrada para la transferencia trófica de contaminantes orgánicos lipófilos, lo que podría facilitar el riesgo de envenenamiento [Priyadarshani et al., 2011].

3.8.2 Biosorción

La pared celular de *Chlorella* sp. es una vaina trilaminar compuesta por una capa más resistente de esporopollenina (un biopolímero altamente resistente) con una pared secundaria subyacente rica en manosa y polisacáridos similares a quitina dispuestos heterogéneamente. Debajo de la pared secundaria se encuentra la membrana bicapa de fosfolípidos (membrana plasmática), que contiene el citoplasma con los orgánulos intactos. Las células de *Chlorella* que crecen activamente en condiciones normales suelen ser ricas en proteínas (40-60 %) y en gran parte están compuestas de aminoácidos esenciales [Kim et al., 2016]. El proceso de biosorción utiliza la capacidad de los materiales biológicos de la pared celular para acumular metales pesados a partir de aguas residuales por vía metabólica o por vías de adsorción fisicoquímica.

Las altas capacidades de unión a metales, es debido a la presencia de polisacáridos, proteínas o lípidos en la superficie de sus paredes celulares que contienen algunos grupos funcionales como amino, hidroxilo, carboxilo y sulfato que puede actuar como sitios de unión para metales, además, de su biomasa que al tener una gran área de superficie aumenta la capacidad de adsorción. 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 [Priyadarshani et al., 2011; Solís et al., 2012; Khoubestani et al., 2014].

3.8.3 Biotransformación. Remoción de nutrientes

3.8.3.1 Nitrógeno y Fósforo

El nitrógeno inorgánico, es decir, nitrito (NO^{-2}), nitrato (NO^{-3}) y el amonio (NH_4^+) y el orgánico, se translocan a través de la membrana celular, con la siguiente prioridad: $\text{NH}_4^+ > \text{NO}^{-3} > \text{N-Org}$. Estas especies de nitrógeno oxidado se reducen posteriormente a NH_4^+ y se asimilan como aminoácidos para la formación de proteínas (**Figura 1**), prefiriéndose la absorción de NH_4^+ debido a la disminución de los requisitos de energía necesarios para la reducción y la asimilación, ya que el estado de oxidación del nitrógeno presente en los aminoácidos corresponde al mismo que en el amonio [Whitton et al., 2015].

Con respecto al fósforo, la forma preferida para ingresar a la célula es en como iones H_2PO_4^- y HPO_4^{2-} , que se transportan a través de la membrana celular mediante transporte energizado y se asimilan en nucleótidos luego de la fosforilación para la síntesis del ARN ribosomal (**Figura 1**). Por lo tanto, se requiere una fuente de nitrógeno para la síntesis de proteínas para permitir la asimilación del fósforo, donde una limitación de cualquiera de los nutrientes resulta en un bajo contenido de proteína celular y un crecimiento reducido de la biomasa. Además, en ambientes con alto contenido de fosfato, las microalgas pueden consumir el exceso de fosfato a través de una vía de captación para su almacenamiento como un gránulo de polifosfato insoluble en ácido (**Figura 1**) para uso futuro en momentos en que la concentración de fosfato externo pueda convertirse en limitante [Whitton et al., 2015].

La modificación del entorno fisicoquímico a través del pH facilita el método de eliminación indirecta. En el caso de NH_4^+ , a valores de pH superiores a 7, hay un cambio de equilibrio cinético para NH_4^+ y amoníaco (NH_3) hacia la producción de NH_3 (gas), que posteriormente se volatiliza y elimina de la solución. Se ha demostrado que el mecanismo de eliminación indirecta de amonio contribuye en gran medida a la remediación total de $\text{NH}_4\text{-N}$, con porcentajes de eliminación de 53–82 % para *Scenedesmus obliquus* a diferentes temperaturas. y regímenes de mezcla. A diferencia del amonio, el fosfato no puede existir en estado gaseoso y se precipita con iones metálicos (por ejemplo, Ca, Mg y Fe) dentro del efluente, a un pH elevado y altas concentraciones de oxígeno disuelto. Una vez que el pH aumenta más allá de 10.5, la

precipitación de fosfato disminuye debido a un cambio hacia la formación de carbonato de calcio como resultado del cambio relativo en la cinética de precipitación entre el calcio y el fosfato o carbonato [Whitton et al., 2015].

3.9 *Chlorella* sp.

Las microalgas representan una enorme biodiversidad a partir de la cual alrededor de 40.000 ya han sido descritas o analizadas. Una de las más notables es la microalga verde (clorofita) y eucariota, *Chlorella* sp., uno de los protistas fotosintéticos más populares y perteneciente a la siguiente clasificación científica: Dominio: Eukaryota, Reino: Protista, División: Chlorophyta, Clase: Trebouxiophyceae, Orden: Chlorella, Familia: Chlorella, Género: Chlorella. Martinus Willem Beijerinck, un investigador holandés, descubrió por primera vez a *Chlorella vulgaris* en 1890 como la primera microalga con un núcleo bien definido. El nombre *Chlorella* proviene de la palabra griega chloros (Χλωρός), que significa verde, y el sufijo latino se refiere a su tamaño microscópico. Es una microalga unicelular que crece en agua dulce y ha estado presente en la tierra desde el período precámbrico hace 2.500 millones de años y, desde entonces, su integridad genética se ha mantenido constante [Krienitz et al., 2015; Safi et al., 2014].

Morfológicamente es una célula microscópica esférica con 2–10 μm de diámetro (**Figura 2**). Su contenido total de proteínas representa el 42-58 % del peso seco de la biomasa, los lípidos en condiciones óptimas de crecimiento pueden alcanzar el 5 y hasta el 40 % del peso seco de la biomasa. Dentro de los carbohidratos presentes, el más abundante es el almidón, está compuesto de amilosa y amilopectina y junto con los azúcares sirve como almacenamiento de energía para las células; la celulosa es un polisacárido estructural con alta resistencia y está localizado sobre la pared celular de *Chlorella* como una barrera protectora fibrosa; por último, uno de los polisacáridos más importantes es el glucano β 1-3, debido a que posee múltiples beneficios para la salud y nutrición [Safi et al., 2014].

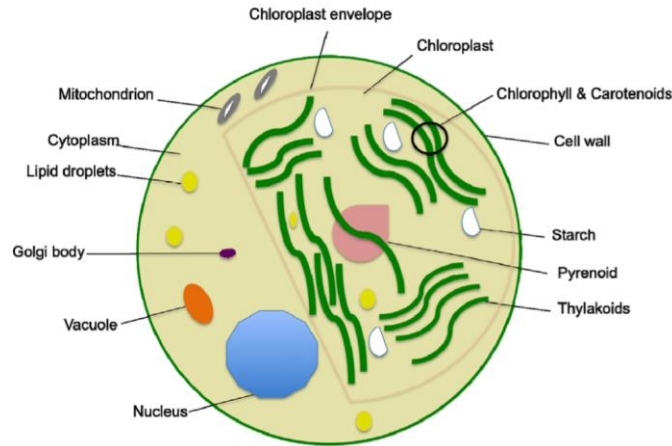


Figura 2. Morfología de *Chlorella vulgaris* y sus diferentes organelos. Fuente: [Safi et al., 2014].

Los cultivos de *Chlorella* son fáciles de manejar y exhiben rendimientos de crecimiento predecibles y su versatilidad en los sistemas de cultivo masivo de algas estableció a *Chlorella* como una de las candidatas preeminentes para diversas aplicaciones biotecnológicas [Krienitz et al., 2015].

3.10 Biochar como alternativa de aprovechamiento para los subproductos generados en el tratamiento de aguas residuales

El biochar es un subproducto sólido estable rico en carbono, producido a partir de la degradación termoquímica de materiales orgánicos en ausencia de aire o a bajas concentraciones (pirólisis). Es un material de carbono poroso, adecuado para la biorremediación a través de la absorción de nutrientes. Los residuos sólidos derivados de las aguas residuales son una fuente de biomasa emergente de interés para su conversión a biochar. [Lehmann et al., 2011; Liu et al., 2018; Ahmad et al., 2014].

Se han estudiado muchos tipos de residuos de biomasa, incluidos lodos de plantas de tratamientos de aguas residuales y biomasa lignocelulósica, los cuales presentan mejores propiedades, incluida la densidad de superficie de los grupos funcionales y los pasos de fácil preparación, sigue siendo un gran desafío para aplicar en el tratamiento de aguas [Zheng et al., 2017]. Los biochars obtenidos a partir de residuos sólidos y semisólidos generados en las plantas de tratamiento para aguas residuales (BAR) tienen una menor concentración de carbono (C) que

otros biochars derivados de biomasa y un porcentaje de humedad elevado (superior al 80 %). Esto no es sorprendente teniendo en cuenta que los lodos primarios, secundarios y terciarios, están compuestos de materiales orgánicos e inorgánicos, mientras que los biochars derivados de otros residuos sólidos, como la corteza de pino, se componen principalmente de lignina, celulosa y hemicelulosa (biochar de lignocelulosa BLC). Los biochars de aguas residuales (BAR), por otro lado, típicamente tienen concentraciones más altas de nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K), es decir, nutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas. La abundancia relativamente alta de N, P y K en este tipo de biochar indica se podría usar como enmienda para suelo en agriculturs, mientras que otros biochars (derivados de biomasa lignocelulósica) que tienen un mayor contenido de carbono podrían utilizarse más apropiadamente como un adsorbente. Los BAR también tienen una mayor concentración de micronutrientes, así como posibles tóxicos, incluidos los metales, por lo que es importante investigar si estos metales son un problema de lixiviación cuando se aplican a los suelos o si son potencialmente beneficiosos para el uso. biochar como catalizador para convertir bio-oil en py-gas [Liu et al., 2018]

En los últimos años se ha investigado ampliamente las microalgas como posibles bioadsorbentes para la eliminación de contaminantes orgánicos e inorgánicos [Gu et al., 2016]. El biochar es un producto que se puede producir a partir de cenizas de biomasa de microalgas después de la pirólisis. El uso de biomasa algal (después de un tratamiento previo apropiado) como adsorbente para la eliminación de contaminantes recalcitrantes, como los tintes y los metales pesados de las aguas residuales industriales, es un método fisicoquímico económico y eficiente que se puede realizar sin preocuparse por la iluminación y los nutrientes necesarios para el crecimiento algal, así como los compuestos inhibidores o tóxicos presentes en las aguas residuales que restringen el crecimiento de las células. Se considera como una de las posibles estrategias de valor agregado con el cultivo de microalgas en el tratamiento de aguas residuales [Yu et al., 2017a; Zheng et al., 2017].

Su capacidad de biosorción se atribuye a una gran cantidad de varios grupos funcionales contenidos en la pared celular, como hidroxilo, carboxilato, amino, fosfato y otros grupos cargados [Zheng et al., 2017]. La biomasa de microalgas utilizadas para tratamiento de aguas residuales contiene cantidades sustanciales de carbohidratos (14-45 %), lípidos (32 %) y proteínas (12-42 %) [He et al., 2013], y la composición química es muy diferente de la biomasa

lignocelulósica. Los grupos funcionales específicos ubicados principalmente en la pared celular de las microalgas pueden dotar al biochar de propiedades fisicoquímicas especiales, lo que lleva a una mejor eficiencia de adsorción de los contaminantes orgánicos [Zheng et al., 2017]. Los diversos mecanismos propuestos para la interacción del biochar con contaminantes orgánicos se resumen en la **figura 3**.

Las microalgas pueden actuar de forma sinérgica con otros materiales biosorbentes. Otros materiales biológicos reportados como biosorbentes e involucrados en la eliminación de estos contaminantes son desechos agrícolas, turba, algas, hongos, bacterias, levaduras y biomasa lignocelulósica [Hernández-García et al., 2019].

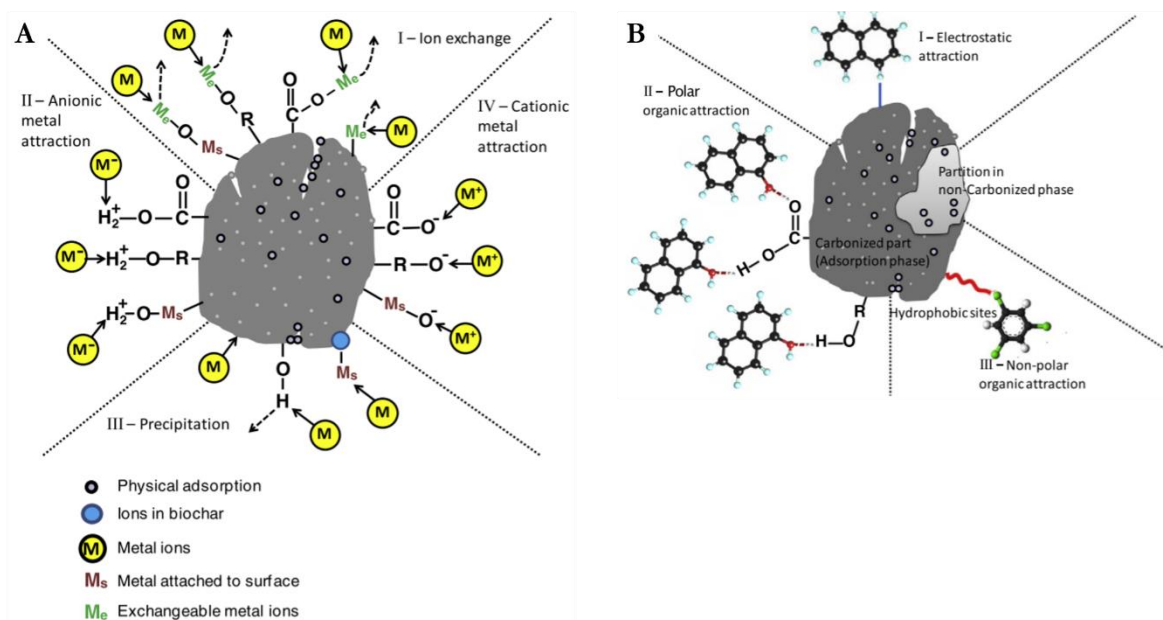


Figura 3. Mecanismos de interacción del biochar con contaminantes inorgánicos. Los círculos sobre el biochar muestran la adsorción física. I-intercambio de iones entre metal objetivo y metal intercambiable en biochar, II-atracción electrostática del metal aniónico, III-precipitación de metal objetivo, y IV-atracción electrostática del metal catiónico (A). Mecanismos de interacción del biochar con contaminantes orgánicos. Los círculos sobre el biochar muestran partición o adsorción. I-interacción electrostática entre biochar y contaminante orgánico, II-atracción electrostática entre biochar y contaminante orgánico polar, y III-atracción electrostática entre biochar y contaminante orgánico no polar. Fuente: [Ahmad et al., 2014].

3.10.1 Pirólisis

Los biochar pueden producirse utilizando diferentes condiciones de proceso (Tabla 4). Estas condiciones de producción pueden, en muchos casos, ajustarse, pero a menudo están limitadas

por la tecnología de pirólisis elegida, como la pirólisis lenta o rápida, la pirólisis de alta o baja temperatura o la gasificación. Las principales condiciones de producción que definen las propiedades del biochar incluyen: velocidad de calentamiento de la materia prima; temperatura final del proceso de carbonización y el tiempo mantenido a esta temperatura; presión del reactor; mecanismos de transferencia de calor y masa que tienen lugar dentro del recipiente del reactor; la cantidad de aire y vapor agregados al horno y la temperatura del biochar en el punto de adición (el vapor y el aire pueden cambiar las propiedades y la estructura de las superficies y también pueden causar gasificación si la temperatura es suficientemente alta). Por último, un biochar derivado de biomasa puede ser producido por descomposición termoquímica desde temperaturas de 200 °C hasta 900 °C en ausencia de oxígeno [Lehmann & Joseph, 2009].

Tabla 4. Tipos de pirolisis y sus características. Fuente: [Sohi et al, 2009; Ahmad et al 2014].

Proceso	Temperatura ° C	Tiempo residencia fase de vapor	% Líquido (bio-oil)	% Sólido (biochar)	% Gas (syngas)
Pirolisis rápida	300-1000	Corto (<2 s)	75 % (25 % Agua)	12	13
Pirolisis intermedia	500	Moderado (10-20 s)	50 % (50 % Agua)	25	25
Pirolisis lenta	400-500	Largo (5-30 min)	30 % (70 % Agua)	35	35
Gasificación	>800	Moderado (10-20 s)	5 % Alquitrán (5 % Agua)	10	85

3.10.2 Materia prima

El tratamiento de los efluentes de actividades industriales y domésticas genera grandes cantidades de lodos activados (primarios, secundarios y terciarios). Debido a consideraciones ambientales y económicas, la reducción y la reutilización de estos lodos es indispensable [Ratkovich et al 2013].

Adicionalmente, las principales diferencias en las propiedades de la materia prima que son relevantes para las propiedades del biochar como enmienda del suelo incluyen: porcentaje de lignina, celulosa, hemicelulosa y otros compuestos orgánicos menores; porcentaje y composición de sustancias inorgánicas; porcentaje de materiales distintos a la biomasa; densidad aparente y verdadera (y, por lo tanto, la porosidad y la distribución del tamaño de los poros); tamaño de partícula (promedio y distribución); resistencia a la compresión y a la tracción; y contenido de humedad [Lehmann & Joseph, 2009].

3.10.2.1 Microalgas

El crecimiento mixotrófico puede maximizar el uso de los recursos y eliminar los problemas asociados con las limitaciones de luz, logrando una mayor velocidad de crecimiento. Proporciona una aplicación económicamente viable de la biomasa microalgal producida para la combinación sinérgica de biorremediación ambiental y producción de enmiendas para el suelo.

La biomasa de algas tiene una composición típica ($C_{106}H_{181}O_{45}N_{16}P$), requieren una relación molecular de carbono, nitrógeno y fósforo en la materia orgánica marina, C: N: P = 106: 16: 1 proporción de C: N: P según la relación estequiométrica de Redfield. Sin embargo, la proporción de N: P en la biomasa de algas puede variar de alrededor de 4: 1 a casi 40: 1, dependiendo de las especies de algas y la disponibilidad de nutrientes en el cultivo de algas. Permitiendo velocidades de producción más rápidas, niveles de nutrientes reducidos en las aguas residuales tratadas, costos de recolección disminuidos y producción de lípidos incrementada [Brennan et al., 2010; Park et al., 2011].

El biochar de microalgas actúa como un sumidero a largo plazo para el dióxido de carbono atmosférico en el proceso de secuestro de carbono. Las emisiones de dióxido de carbono podrían reducirse hasta un 84 % y es muy posible producir un biocombustible con carbono negativo mediante el secuestro de biochar. Además de la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) y el secuestro de carbono, el biochar puede mejorar la fertilidad del suelo para una mayor producción de cultivos. Se ha demostrado que la enmienda de biochar puede mejorar la capacidad de retención de agua y el estado de los nutrientes de muchos suelos. También ayuda en la captación o eliminación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y

elementos tóxicos en el suelo para una mejor productividad de los cultivos. Probablemente debido a su capacidad como adsorbente, el biochar puede adsorber y eliminar ciertas sustancias tóxicas del suelo, aumentando la actividad de la biota del suelo. Tiene un pH más alto que puede equilibrar los suelos acidificados y tiende a tener un mayor contenido de nutrientes, incluidos minerales como el nitrógeno, la ceniza y los elementos inorgánicos. Se ha demostrado que el biochar obtenido por pirólisis lenta a partir de un residuo de algas basado en *Chlorella* sp. se demostró que biochar producido tiene un alto contenido de nitrógeno, así como otros elementos inorgánicos como el fósforo, hierro, calcio, potasio y magnesio [Yu et al., 2017a].

3.10.2.2 Lodo secundario de plantas de tratamiento

El uso de lodos activados es la principal alternativa al tratamiento de aguas residuales debido a su bajo costo y alta eficiencia. Sin embargo, los procesos de lodos activados pueden llevar a un problema de eliminación de residuos sólidos que aumenta con cantidades crecientes de aguas residuales que se tratan. A su vez, esto conduce a dificultades cada vez mayores en la gestión de los lodos y al cumplimiento de criterios cada vez más estrictos para la eliminación [Baily 2009].

Los lodos activados se componen de agua y de compuestos orgánicos e inorgánicos disueltos (fase continua) y de los fangos de lodo, componentes de aguas residuales en partículas y productos biológicos, es decir, sustancias poliméricas exocelulares (fase dispersa) [Ratkovich et al., 2013]. Se caracterizan por tener una alta proporción de materia orgánica biodegradable que tiene el potencial de convertirse en una fuente de energía renovable. Un método de tratamiento válido debe hacer el balance entre los beneficios ambientales y los costos económicos. En la Unión Europea y América, la eliminación de lodos aún daba prioridad su aplicación para uso agrícola [Baily 2009].

3.10.2.3 Biomasa inmovilizada en soportes orgánicos

La inmovilización microbiana para el tratamiento de aguas residuales ha recibido gran atención, especialmente para la eliminación de sustancias tóxicas y refractarias, como la quinolina, el 2,4-diclorofenol, el fenol y los cianuros de efluentes industriales y también aguas residuales de campos petroleros. La combinación de biorreactores y células inmovilizadas puede elevar la

eficiencia de degradación de la DQO a más del 85 %, con un rendimiento estable y menor sensibilidad a la carga de choque tóxico. El atrapamiento de células dentro de esferas de alginato de Ca^{2+} se ha convertido en la técnica más utilizada para inmovilizar células vivas [Zhao et al., 2016].

El alginato es un polisacárido aniónico e hidrófilo derivado de las paredes celulares de algas pardas y varias bacterias. Este copolímero lineal consiste en bloques homopoliméricos de residuos de β -D-manuronato (M) y α -L-guluronato (G) con enlaces 1,4. Los bloques pueden estar compuestos de residuos G consecutivos (bloques G), residuos M consecutivos (bloques M) y residuos M y G alternos (bloques MG) (Figura 3). Dependiendo de la fuente de alginato, la composición (es decir, la relación M/G) y la secuencia de bloques, pueden diferir [Wawrzyńska et al 2018].

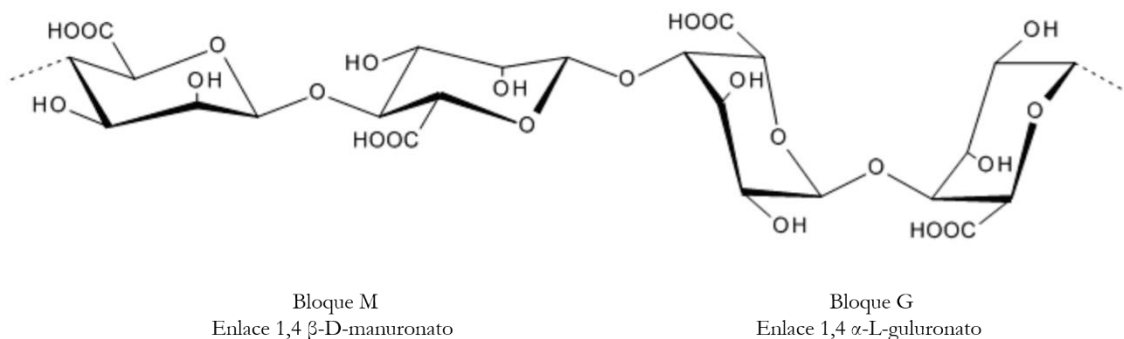


Figura 4. Estructura química del alginato. Fuente: [Wawrzyńska et al., 2018].

Las perlas de alginato tienen como objetivo imitar las funciones interactivas de la célula y los órganos de la matriz extracelular, así como crear entornos químicamente beneficiosos mediante ligandos que se unen específicamente a los receptores celulares [Wawrzyńska et al 2018].

Al final del tratamiento de aguas residuales las perlas de alginato se saturan, la disposición final de este residuo se convierte en otro lodo, material potencialmente aprovechable como materia prima para biochar.

3.10.2.4 Corteza de pino

Los residuos de madera incluyen aserrín, cortezas y virutas que pueden llegar a representar entre un 60 y un 73 % del producto terminado en la industria forestal, porcentaje que podría ser considerado como subproducto de la industria más que como residuo. La industria forestal produce anualmente grandes volúmenes de residuos de corteza. En general, no existe una aplicación comercial para esta porción de los residuos. El uso de la corteza como material industrial está limitado por sus estructuras físicas pobres, pero químicas complejas [Şensöz, 2013; Alvarado & Solano, 2002].

Los componentes principales de la corteza de pino consisten en sustancias poliméricas orgánicas como celulosa, hemicelulosa y lignina. La celulosa es el principal constituyente de la corteza de pino el cual corresponde al 46 % de su composición química. La celulosa consiste en unidades de azúcar de β -D-glucopiranosas, su estructura lineal se deriva de la deshidratación de la glucosa. La hemicelulosa corresponde al 24 %, y es un polímero de polisacáridos que posee un mayor grado de polimerización en comparación con la celulosa. Por último, la composición química de la lignina en la corteza es del 27 %, se caracteriza por ser una estructura molecular heterogénea, compleja y de gran tamaño, la lignina es una estructura altamente ramificada, amorfa y estrechamente asociada con los polímeros de celulosa y hemicelulosa [S & P, 2019]. Los grupos hidroxilo y carboxilato son los que le confiere la naturaleza hidrófila y pueden actuar como sitios de anclaje de metales como el hierro [Harikishore & Lee, 2014].

Dentro de las propiedades de la corteza de pino se encuentra que esta en un pH ácido si es un tipo de muestra fresca, pero a pH neutro si se encuentra compostada, el porcentaje de humedad es bajo-medio, el porcentaje de porosidad esta dentro de un rango de 80-85, la relación C/N de la muestra de corteza fresca es de 300 pero cuando esta compostada es de 20-30 [Martinez & Roca, 2011].

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Se puede emplear a *Chlorella* sp. como proceso unitario para tratamiento terciario de aguas residuales no domésticas y realizar la conversión térmica de los lodos generados en la planta de tratamiento de la Facultad de Ciencias?

5. OBJETIVOS

5.1 General

Evaluar la capacidad de *chlorella* sp. como tratamiento terciario para aguas residuales no domésticas y realizar la bioconversión de la biomasa microbiana obtenida en el tratamiento secundario y terciario a biochar por pirolisis lenta.

5.2 Específicos

- 5.2.1** Identificar mediante morfología microscópica las microalgas presentes en las columnas de Winogradsky con diferentes tiempos de estabilización y su capacidad para crecer en aguas residuales no domésticas pos tratadas en la Planta de tratamiento de la Facultad de Ciencias.
- 5.2.2** Evaluar la carga contaminante del afluente y el efluente del agua residual no doméstica proveniente de los laboratorios de docencia realizando montaje y operación de planta piloto con tratamiento primario y secundario (biomasa fúngica/bacteriana).
- 5.2.3** Analizar la cinética de las microalgas en agua residual no doméstica proveniente de la planta piloto como tratamiento terciario.
- 5.2.4** Producción y caracterización de un biochar a partir de lodos producidos en el tratamiento secundario y terciario de ARnD/ TB, empleando tratamiento térmico a diferentes temperaturas.

6. METODOLOGÍA

6.1 Aislamiento de microalgas

Para realizar el aislamiento de las microalgas se emplearon 9 columnas de Winogradsky (Columnas para estudio del ciclo de azufre para la asignatura de Microbiología Ambiental) que tienen diferentes tiempos de estabilización (**Tabla 5**). De cada tiempo de estabilización se tenían tres replicas que se asumieron como triplicados en función del tiempo.

Tabla 5. Columnas de Winogradsky utilizadas, con distintos tiempos de estabilización.

Código de columna	Tiempo de estabilización	Descripción reactor	Capacidad instalada 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: 2.6 L
4-6	9 meses	Recipientes de vidrio de 3.5 L	Volumen total del reactor 3.5 L Volumen efectivo: 2.6 L
7-9	3-4 meses	Probeta de vidrio de 1 L	Volumen total del reactor 0.9 L Volumen efectivo: 0.7 L

De cada una de las columnas se tomaron 20 mL de agua de la parte superficial, y con un hisopo de algodón estéril se tomó muestra de las paredes laterales superiores de las columnas en las que se observó la formación de biopelículas en la gama de colores verdes, zona que se encuentra en condiciones aeróbicas y la incidencia de la luz artificial es mayor (**Figura 5**).

Las muestras de agua fueron transferidas a un Erlenmeyer de 250 mL, los cuales contenían 80 mL de medio Bold suplementado con una solución traza. En estos se desprendió la mayor cantidad de biopelícula recuperada con el hisopo de algodón. Los recipientes se incubaron a 19 °C por 15 días en shaker a 120 rpm con ciclos de luz artificial/oscuridad de 12 horas. La

composición del medio Bold se describe a continuación: 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), adicionalmente para preparar el medio se debe añadir 3 mL de solución traza de metales por cada 1000 mL de medio Bold, la composición de la solución traza fue la siguiente: FeCl_3 (0.194 g/L), MnCl_2 (0.082 g/L), CoCl_2 (0.16 g/L), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.008 g/L) y ZnCl_2 (0.005 g/L) [Blair et al., 2014].

Con una pipeta Pasteur, se tomó muestra de los sólidos sedimentables y suspendidos, presentes en los Erlenmeyer tras 15 días de cultivo en agitación continua. para realizar 5 preparaciones en fresco por columna y realizar observaciones microscópicas con aumento de 40 y 100 X. Para cada preparación, se observaron 5 campos microscópicos, se identificaron las diferentes morfologías, clorófitas y/o diatomeas, se realizó la descripción morfológica preliminar para revisar contra bases de datos y establecer de forma preliminar el género al cual pertenecen (Vuuren et al., 2006; WEHR, 2007).

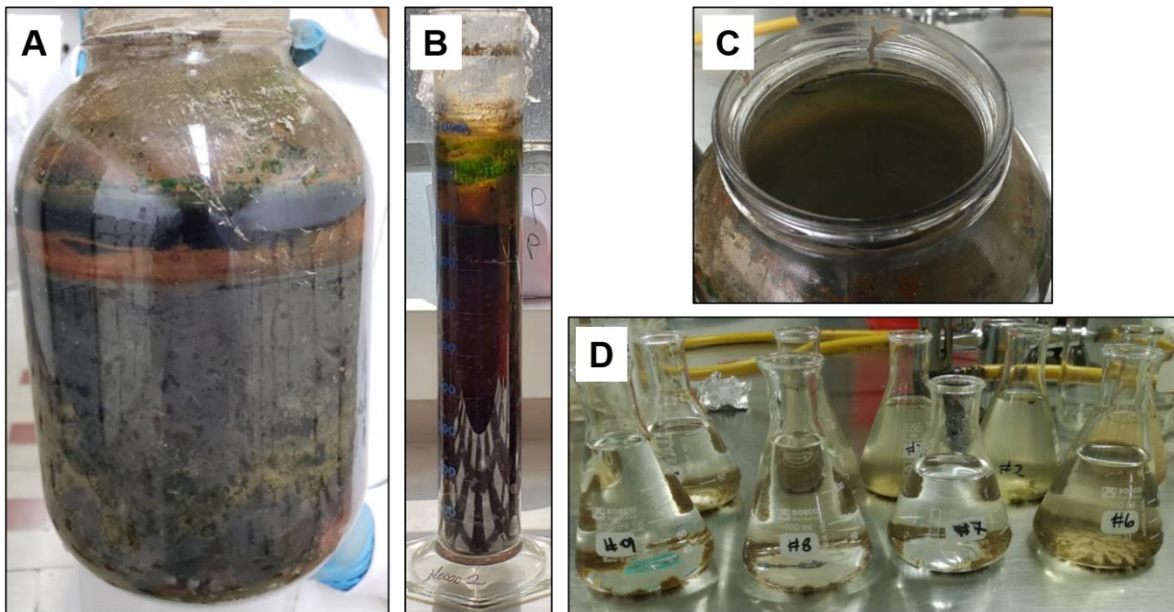


Figura 5. Aislamiento de microalgas. Columnas de Winogradsky empleadas (A-B). Paredes laterales superiores de las columnas donde se tomó las muestras (C). Erlenmeyer de 250 mL que contenía la biopelícula de microalgas de las 9 columnas de Winogradsky con diferentes tiempos de estabilización (D).

Para estimar el recuento de microalgas totales, clorófitas y/o diatomeas por columna y tiempo de estabilización se realizaron diluciones con solución salina al 0.85 % (m/v) en base 10 hasta

10⁻³ de las muestras pre cultivadas de cada columna y se realizaron montajes en fresco para cámara de Neubauer. Se determinó como variable de respuesta el número de microalgas totales, clorófitas y/o diatomeas por mL de muestra analizada. Cada recuento se realizó por triplicado y los resultados corresponden al promedio con su respectiva desviación estándar. Los recuentos en cámara se determinaron mediante la fórmula universal de cámara de Neubauer (**Ecuación 1**).

Ecuación 1.

$$\frac{\# \text{ Células contadas} * Fd}{0.1 \text{ mm} * 0.1 \text{ mm} * 1\text{mm} * \frac{\# \text{ cuadrantes contados}}{\# \text{ cuadrantes totales}}}$$

Donde Fd es: el factor de dilución.

Fuente: [LeGresley y McDermott, 2010]

Para determinar si existían diferencias significativas entre tiempos de estabilización y recuentos de clorófitas y no clorófitas se realizó una comparación de medias entre tiempos con un valor de alfa de 0.05 empleando el programa SAS para WINDOWS VERSION 9.0.

6.2 Pruebas de tolerancia a diferentes concentraciones de ARnD/TB pos tratada

El agua utilizada para la selección de microalgas mixotróficas con capacidad de tolerar y crecer diferentes concentraciones de esta, era agua residual no doméstica derivada de las tinciones biológicas del semestre 1810 (ARnD/TB) la cual fue tratada en la planta de tratamiento de la Facultad de Ciencias. Por lo tanto, la prueba de tolerancia se realizó con un efluente o agua postratada.

Se tomó directamente 1 mL del cultivo pre-enriquecido de todas las columnas y se realizaron diluciones decimales hasta 10⁻³ en solución salina (0.85 % m/v). Se sembró 0.1 mL en superficie de cada dilución en agar Bold suplementado con 10, 50 y 100 % (v/v) de ARnD/ TB pos tratada a pH de 7. Como control se utilizó agar Bold preparado con agua destilada (**Tabla 6**). Los tratamientos se incubaron por 8 días en oscuridad a 25 °C y el control a 18-20 °C con ciclos de

luz artificial/oscuridad de 12 horas (**Figura 5**). Posteriormente se realizó recuento de las microalgas que crecieron directamente en agar agua residual suplementadas con las sales Bold. La selección de las algas se realizó teniendo en cuenta las colonias que crecieron en las concentraciones del 100 % de ARnD postratada, que a su vez también crecieron en las concentraciones bajas del ARnD/ TB. Con el promedio de los datos expresados como Log10 de UFC/mL se realizó una comparación de medias entre concentraciones empleando el programa estadístico SAS 9.0 para Windows.

Tabla 6. Proporciones de ARnD/ TB y Agua destilada para las pruebas de crecimiento y tolerancia

Tratamiento y control	Proporción de ARnD/ TB % (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

6.3 Operación de la planta de tratamiento para la obtención del efluente como sustrato para el cultivo mixotrófico de las microalgas y tratamiento terciario de ARnD/ TB

La planta de tratamiento que se utilizó funcionó por lotes y constaba de cinco unidades de tratamiento: 1) tanque de homogenización y neutralización de 120 L; 2) trampa de grasas de 8 L con un tiempo de retención hidráulico (HTR) de 3 minutos; 3) reactor biológico (consorcio fúngico-bacteriano) aerobio, neumático y mesofílico de 20 L que fue aireado mediante 8 difusores porosos instalados en la profundidad del reactor, el tiempo de retención hidráulico fue de 9 días; 4) sedimentador secundario con capacidad de 15 L y tiempo de retención hidráulico de 40 minutos; y por último 5) dos unidades de filtración, el material filtrante corresponde a

arena cuarcítica y carbón activado (**Figura 7**). Todas las unidades de tratamiento mencionadas funcionaron sucesivamente para el tratamiento del ARnD/TB proveniente de las tinciones biológicas (ARnD/TB) realizadas en los laboratorios de docencia de la Pontificia Universidad Javeriana (Laboratorios 224P, 224G, 233 y 214 del edificio 50-51) [**Pedroza-Camacho et al., 2018**].

6.3.1 Propagación y escalamiento del consorcio fúngico-bacteriano

Se prepararon 24 cajas de agar extracto salvado de trigo (AEST), 20 mL por caja, cuya composición fue: glucosa 10 g/L, extracto de levadura 2 g/L, triptosa 5 g/L, sulfato de manganeso ($MnSO_4$) 0.07 g/L, sulfato de magnesio ($MgSO_4$) 0.07 g/L, fosfato de potasio (K_2HPO_4) 0.1 g/L, extracto líquido de salvado de trigo 87.5 g/L y de agar-agar 15 g/L si se requiere. Se tuvo en cuenta que, el salvado de trigo se presenta en forma sólida y adsorbe agua, por esta razón se añadieron 400 mL más de agua para lograr la cantidad líquida requerida para la preparación del medio [**Pedroza-Camacho et al., 2018**].

Los hongos utilizados fueron; *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum* y *Phanerochaete chrysosporium*, cada uno de ellos se sembró en 6 cajas de agar salvado de trigo y se incubaron a 32 °C por un periodo de 8 días. Trascendido ese tiempo, se realizó la propagación en líquido de los hongos para el montaje del reactor biológico que hace parte de la planta (**Figura 6**). Se transfirió el hongo junto con el agar, previamente fraccionado con una espátula estéril, a Erlenmeyer de 250 mL (una caja para dos Erlenmeyer) cada uno con 100 mL de caldo extracto Salvado de trigo. Se incubó por un periodo de 8 días a 32 °C y en agitación (130 rpm). Finalmente, para cada hongo se transfirió el contenido de los dos Erlenmeyer de 250 mL a un Erlenmeyer de 2 L, cada uno con 1.3 L de caldo extracto salvado de trigo. Se incubó a 32 °C a 130 rpm durante 8 días.

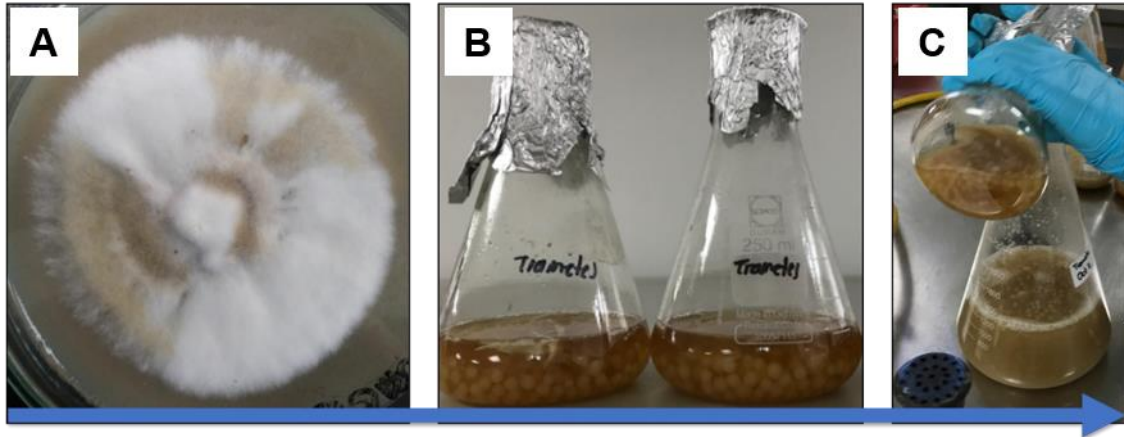


Figura 6. Secuencia de propagación del inoculo. (A) *Trametes versicolor* en agar salvado de trigo. (B) Crecimiento de *Trametes versicolor* en fiolas de 250 mL, se observa la formación de pellets. (C) *Trametes versicolor* transferido a fiolas de 2 L. Se incrementó el volumen del recipiente del cultivo con el fin de conseguir una velocidad de crecimiento adecuada, se encubaron a 32 °C durante 8 días.

Las bacterias involucradas en el consorcio fueron: *Pseudomonas azotoformans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter xiangfangensis* y *Pseudomonas* sp. Se reactivaron por siembra masiva en agar nutritivo, cuya composición fue la siguiente: pluripectona 5g/L, extracto de carne 3g/L, cloruro de sodio 8g/L y agar-agar 15g/ L. Se incubaron a 32 °C durante dos días. Posteriormente, a partir de la siembra masiva en agar nutritivo, se tomaron varias azadas y se suspendieron en solución salina al 0.85 % (m/v) bajo condiciones de esterilidad hasta alcanzar una suspensión aproximadamente de 6×10^8 células/mL (tubo 2 de McFarland) [Pedroza-Camacho et al., 2018].

Por último, la biomasa fúngica formada en el caldo extracto salvado de trigo de cada hongo se licuó durante 5 minutos con el fin de provocar el fraccionamiento de los pellets (Figura 6B) y favorecer la transferencia de O₂ en el biorreactor. Se mezcló el licuado de los tres hongos junto con las bacterias, el producto final de la homogenización se denominó consorcio fúngico/bacteriano o lodo fúngico/bacteriano y se utilizó para inocular la planta de tratamiento.

6.3.2 Potencial enzimático y colonización fúngica

Para verificar si los hongos producen otras enzimas extracelulares diferentes a las ligninasas que favorezcan la degradación de la materia orgánica no reflectaría presente en el agua residual, se realizaron pruebas semicuantitativas de crecimiento y actividad enzimática, en medios

inductores. Se cortaron disco de agar de 5 mm de diámetro con el hongo crecido en AEST y se sembraron en agar base tributirina al 1 % (m/v), agar celulosa al 1 % (m/v), agar leche al 1 % (m/v), agar almidón al 1 % (m/v) y agar salvado de trigo, este último utilizado como control de crecimiento fúngico. Se incubaron a 32 °C por 12 días y se realizaron mediciones de crecimiento micelial en mm. Para cada siembra se realizó una réplica.

El porcentaje de hidrolisis (zonas de aclaramiento o menor color que el medio inicial), se calculo restando el diámetro del disco de agar que se usó como inóculo y el valor obtenido corresponde a los halos de hidrolisis en el medio inductor en mm en función del tiempo. Para convertirlo en porcentaje de hidrolisis se asume que la caja tiene un diámetro máximo de 90 mm y este valor corresponden al 100 % de halo de hidrolisis. Los mm del halo que se van obteniendo en cada lectura se multiplican por 100 y se dividen en 90 mm (máxima posibilidad de hidrolisis), el valor obtenido corresponde al porcentaje de hidrolisis.

6.3.3 Montaje planta piloto

El ARnD/TB se pasó por todas las unidades de tratamiento de manera secuencial: Se deposito el ARnD/TB en el tanque de igualación, esta operación unitaria cumple el objetivo de homogenización y estabilización de cargas y características fisicoquímicas (pH, temperatura, DQO, DBO₅, nitrógeno y fósforo). Posteriormente, el agua pasó por una trampa de grasas, en la cual se retiraron las grasas y aceites por diferencia de densidades. Seguido a este, se transfirió el agua al reactor biológico aerobio, neumático y mesofílico de 20 L no esteril con un volumen efectivo de trabajo (VET) de 15 L, el volumen del consorcio fúngico bacteriano que se inóculo en el reactor fue del 10 % (v/v) del VET, es decir 1.5 L. Se realizó un muestreo después de un tiempo de retención hidráulica de 10 minutos del agua en el biorreactor, para determinar la carga contaminante inicial. Transcurridos 9 días en el reactor biológico, se pasó el agua junto con el lodo al sedimentador secundario con capacidad de 15 L durante una hora, la función del sedimentador fue clarificar y retirar del agua los sólidos sedimentables como la biomasa, la cual se recircula a la planta. Por último, el agua pasó por dos unidades de filtración compuestas por carbón activado y arena cuarcítica (**Figura 7**). Adicionalmente, se realizó un segundo ciclo donde se recirculó el lodo fúngico/bacteriano (2 L) y se trató un nuevo lote de ARnD proveniente de los laboratorios de docencia, la planta se operó por un periodo de 9 días.

Se evaluaron los siguientes parámetros en el reactor biológico: DBO_5 , UC, pH, DQO, sólidos suspendidos, sólidos sedimentables y sólidos totales. Estos parámetros se midieron cada 24 horas por un transcurso de 9 días en el ciclo 1, adicionalmente en la muestra inicial y en la muestra final se evaluaron recuentos de hongos y bacterias, COT y se realizaron 2 curvas espectrales correspondientes al afluente (entrada a la planta) y el efluente (salida de la planta). Las unidades de color medidas cada 24 horas, se evaluaron teniendo en cuenta tres unidades de onda distintas: 436 nm, 525 nm y 620 nm las cuales exigen en la resolución 0631 de 2015 para el análisis y reporte del color real según el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de Colombia; y a 465 nm el cual corresponde al pico absorción del ARnD/TB de Microbiología Ambiental. Por otro lado, en el segundo ciclo solo se midieron UC, pH, DQO, DBO_5 , sólidos suspendidos disueltos y sólidos totales en el afluente (inicial) y efluente (final).



Figura 7. Planta piloto a escala de Laboratorio. Operación unitaria: tanque de igualación (A). De izquierda a derecha, 2 operaciones unitarias: trampa de grasas y filtros de arena cuarcítica y carbón activado, y el reactor biológico que corresponde a un proceso unitario (B). Operación unitaria: sedimentador (C) [Pedroza-Camacho et al., 2018].

6.3.4 Técnicas analíticas para monitorear los parámetros relacionados con el ARnD/TB

6.3.4.1 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 2

[Livernoche et al., 1983]. Por otro lado, también se determinó el porcentaje de decoloración global durante los días de tratamiento en planta, de acuerdo con la ecuación 3.

Ecuación 2.

$$\text{Unidades de color} = \frac{\text{Absorbancia} * 500}{0.132}$$

Ecuación 3.

$$\% \text{ decoloración} = \frac{UC \text{ inicial} - UC \text{ final}}{UC \text{ inicial}} * 100$$

Adicionalmente, se determinó los espectros UV/Vis 250 - 750 nm para cada muestra, con el objetivo de evaluar los cambios en los espectros de absorción de compuestos coloreados en función del tiempo, utilizando un espectrofotómetro marca Genesis.

6.3.4.2 pH

La determinación del pH se realizó mediante un electrodo de medición OAKTON-pH 510/*ion series Benchtop Meters*. El procedimiento consistió en centrifugar primero la muestra y luego insertar el electrodo directamente en el agua para la lectura del pH (Federation, 1999).

6.3.4.3 Sólidos totales/Peso seco

La determinación de los sólidos totales permite estimar los contenidos de materia disueltas y suspendidas presentes en un agua, pero el resultado está condicionado por la temperatura y la duración de la desecación. Su determinación se basa en una medición cuantitativa del incremento de peso que experimenta una cápsula previamente tarada tras la evaporación de una muestra y secado a temperatura constante a 103-105 °C, véase la **Ecuación 3** [APHA, 2005].

Ecuación 3.

$$\text{Sólidos totales} = \frac{A - B}{C}$$

Donde A: el peso de la muestra inicial. B: peso de la muestra después de su evaporación a 103-105 °C. Y C: es la cantidad de muestra analizada, en mL. El resultado se reporta ppm (mg/ L).

6.3.4.4 Sólidos suspendidos totales

La determinación de los sólidos suspendidos totales (SST) consiste en realizar una filtración por membrana con un volumen de 20mL de efluente, utilizando un filtro de microfibra de vidrio Whatman 934-AH, el cual debe ser pesado antes del proceso de filtración. Posterior al proceso, se recuperó el filtro y se colocó en una termobalanza Precisa EM 120-HR la cual por medio del programa STD permitió determinar la concentración de SST (mgL-1). La diferencia entre los sólidos totales y los disueltos totales puede emplearse como estimación de los sólidos suspendidos totales, **Ecuación 3 [APHA, 2005]**.

6.3.4.5 Sólidos sedimentables

Para la determinación de los sólidos sedimentables se tomó 1 L de agua residual y se colocó en un cono imhoff, que poseía un soporte metálico y se dejó sedimentar por una hora. Se realizó una lectura de sólidos sedimentables, midiendo los mililitros ocupados por fracción sedimentada. El dato se expresó en mL/L **[APHA, 2005]**.

6.3.4.6 Determinación demanda química de oxígeno (DQO)

Para esta determinación se empleó un kit comercial HACH basado en el método 8000 de HACH. Se tomaron 10 mL de agua residual y se transfirieron a un tubo falcon, el cual fue centrifugado por 15 min a 5000 rpm. Se adicionaron 0,2 mL de agua residual a un tubo HACH y se homogeneizó. La mezcla se colocó en un equipo de digestión por 2 horas a 120 °C. Al enfriarse se procedió a realizar la lectura en espectrofotómetro HACH para DQO, el blanco

consistió en agua destilada en lugar de agua residual. Al final se realiza una corrección de los tubos de alto rango, ya que se realizó una dilución 10^1 [HACH, 2014].

6.3.4.7 Demanda biológica de oxígeno (DBO₅)

Se empleó el sistema DBO₅ de VELP SCIENTIFICA para la determinación de este parámetro, el sistema consiste en el uso de botellas respirométricas las cuales contenían una solución de suplementos nutricionales (pH 7.2) compuesta por FeCl₃ · 6 H₂O, CaCl₂, MgSO₄ · 7H₂O y KH₂PO₄. Adicionalmente, se adicionó un inoculo iniciador y un volumen determinado de la muestra a analizar dependiendo del rango utilizado. Estas botellas poseían un tapón al que se le adicionaban 1.5-2 g de KOH, su función consiste en capturar todo el CO₂ producido por las bacterias como producto de la descomposición completa de la materia orgánica. Finalmente, el sistema se completa con un sensor que determina el oxígeno consumido por unidad de volumen de agua (mg/L) al cabo de 5 días de incubación en agitación a 25 °C.

6.3.4.8 Determinación de 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 marca HACH a 430 nm usando como blanco 1 tubo de COT con agua Milli Q en vez de agua residual [Method, 2016].

6.3.4.9 Nitratos (NO₃⁼)

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 NO₃-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 mezcló en vórtex por 1 minuto y se lo dejó reposar por 5 minutos, finalmente se llevó el tubo al espectrofotómetro en donde los resultados fueron medidos a 500 nm usando como

blanco agua residual con el sobre NitraVer, el blanco corresponde a 10 mL de agua destilada en lugar de agua residual [HACH, 2014].

6.3.4.10 Nitritos (NO_2^-)

Para la determinación de nitritos se utilizó un kit comercial NitriVer® 3 de HACH basado en el método 8507 con rango de diazotización de 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 mezcló en vórtex por 1 minuto y se lo dejó reposar por 20 minutos, finalmente se llevó el tubo al espectrofotómetro en donde los resultados fueron medidos a 507 nm, usando como blanco agua residual con el sobre NitriVer, el blanco corresponde a 10 mL de agua destilada en lugar de agua residual [HACH Company, 2014].

6.3.4.11 Ortofosfatos (HPO_4^{3-})

Para la determinación de ortofosfatos (mg/L) se utilizó el reactivo Test fosfatos de Merck Millipore por técnica colorimétrica de Murphy & Riley, en esta técnica los ortofosfatos en solución sulfúrica forman con los iones molibdato, ácido molibdofosfórico, que se determinó fotométricamente, a una longitud de onda de 357 nm con un límite de detección de 0.5 a 6 mg/L de la curva patrón para ortofosfatos [Mercado J, 2017]. Se realizó una dilución 1/20 para que entrara en el rango de la curva, luego se tomaron 2.5 mL del sobrenadante en tubos Hach (marca Hach©) y se adicionaron 0.6 mL del reactivo de fósforo mencionado anteriormente y se dejó reaccionar por 10 minutos. Las reacciones se realizaron por triplicado; y para el blanco se usaron 2.5 mL agua tipo I en lugar de la muestra y se midió su respectiva absorbancia. De las absorbancias obtenidas se determinó su concentración en mg/L con la ecuación de la recta de la curva patrón del reactivo a usar.

6.4 Remoción con microalgas o tratamiento terciario en reactor de 15 L

A partir de los resultados obtenidos en el *Plackett Burman* realizados por Rengel en el 2018 (**Tabla 7**), donde se seleccionaron las condiciones de operación para el tratamiento terciario con microalgas, se realizó la cinética en el reactor de 15 L.

Se utilizó un reactor biológico aerobio, neumático y mesófilo de 15 L que fue aireado por cinco puertos de entrada instalados en la profundidad del biorreactor. El volumen efectivo de trabajo fue de 8 L y la concentración de inóculo del 4 % (v/v) (320 mL). El puerto de muestreo se encontraba en la parte inferior del biorreactor. Se operó durante 15 días, con siete puntos de muestreo (día 0, día 3, día 6, día 9, día 10, día 12 y día 15) a 19 °C, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y 1000 mL/L de aireación. La intensidad lumínica fue de 1000 Lux y se midió con un luxómetro (**Figura 8B**).

Tabla 7. Condiciones seleccionadas para el tratamiento terciario de ARnD/ TB pos-tratada con microalgas durante 10 días. Fuente: [Rengel, 2018].

Tratamiento	pH	Aireación(ml/L)	Tiempo (Horas)	Nutrientes de Bold	% Inóculo (v/v)	Iluminación lux
1	7	1000	10	Si	4	1000

En el experimento las microalgas se enfrentaron a el ARnD/TB postratada, esterilizada en autoclave por 20 minutos a 121 °C, proveniente del segundo ciclo del consorcio fúngico/bacteriano de la planta piloto operada en el segundo objetivo, con una DQO de 717 mg/ L. Con el objetivo de obtener una DQO de 400 mg/ L, acorde con las características iniciales del ARnD del diseño experimental *Plackett Burman* reportado por Rengel en el 2018 (**Tabla 7**), se dosificó con agua destilada hasta obtener la concentración de DQO deseada. Antes de añadir el inóculo al biorreactor se extrajeron 320 mL que correspondieron a la hora cero sin algas (**Figura 8**).

El segundo experimento consistió en evaluar el ARnD/TB pos tratada, pero al emplear a *Pichia pastoris* modificada genéticamente para producir la lacasa recombinante POXA 1B [Rivera-Hoyos et al., 2018] inmovilizada en perlas de alginato. El cual fue obtenido en el trabajo

realizado por Hernández 2019. Este efluente no fue esterilizado de tal manera que permitió valorar el efecto de las poblaciones microbianas propias del efluente sobre la capacidad de remoción de las microalgas. Lo cual sería una condición real en una planta de tratamiento que integre el proceso terciario. Las microalgas deben interactuar con otras poblaciones y deben adaptarse a esta condición de campo. Las condiciones de operación en el reactor fototrófico fueron las mismas que para el experimento anterior. Se opero durante 15 días, con 7 punto de muestreo (día 0, día 3, día 6, día 9, día 10, día 12 y día 15) a temperatura ambiente, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y 1000 mL/L de aireación. La intensidad lumínica fue de 1000 Lux y se midió con un luxómetro (**Figura 8B**).

Los parámetros que se evaluaron en el reactor biológico fueron: pH, nitratos (NO_3^-), nitritos (NO_2^-) ortofosfatos, DQO, DBO_5 , sólidos suspendidos totales, peso seco o sólidos totales y recuento en cámara de Neubauer. Adicionalmente a la primera cinética se le midio ortofosfatos y a la segunda COT. Todos por triplicado, exceptuando nitratos, nitritos y pH.

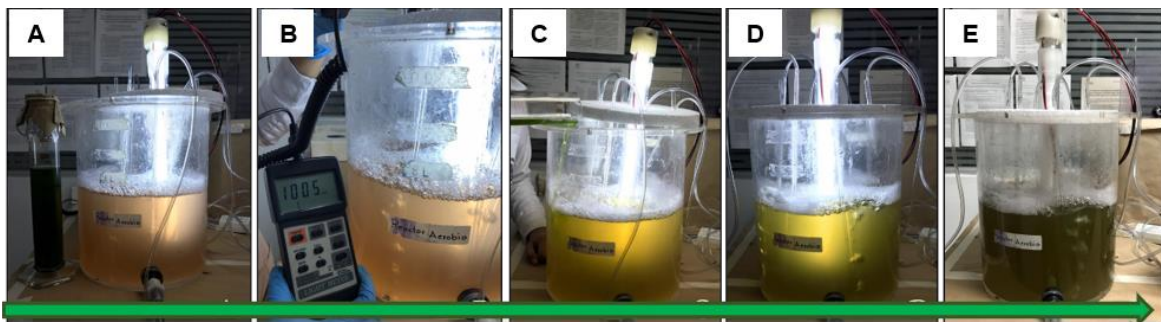


Figura 8. Cinética del tratamiento terciario con microalgas. De izquierda a derecha, biorreactor con ARnD/TB postratada (A). Intensidad lumínica del biorreactor (1005 Lux) medida con un luxómetro (B). Adición del inóculo al biorreactor (C). Biorreactor con microalgas, luz encendida (D). Biorreactor con microalgas, luz apagada (E).

6.5 Bioconversión de residuos sólidos de la planta para la producción de biochar

Con el fin de valorar los residuos sólidos, líquidos y semisólidos generados en la planta de tratamiento completa (lodos secundarios, perlas de alginato y microalgas). Se realizaron estudios de conversión térmica lenta (pirólisis) para la obtención de tres clases de biochar. Las materias

primas que se emplearon para formular la mezcla llenante cruda y producir el biochar, se agruparon en 3 materiales (**Figura 9A, 9B**): 1) lodo fúngico/bacteriano secundario de la planta de tratamiento (biomasa libre), compuestos por la biomasa fúngica de 4 hongos de podredumbre blanca y bacterias heterotróficas. 2) perlas de alginato con *Pichia pastoris* utilizadas para el tratamiento secundario en planta (biomasa inmovilizada). 3) biomasa algal producida en el tratamiento terciario en planta. Adicionalmente, para mejorar la textura de la mezcla llenante y para aumentar el aporte de carbono de tipo aromático se adicionó un cuarto material llenante que fue la corteza de pino, subproducto de la industria maderera o también llamada biomasa lignocelulosica (**Figura 9C**).

Cada residuo se caracterizó por separado y se evaluó el porcentaje de humedad, carbono orgánico total (COT), materia orgánica (MO) y pH, cada uno por triplicado.

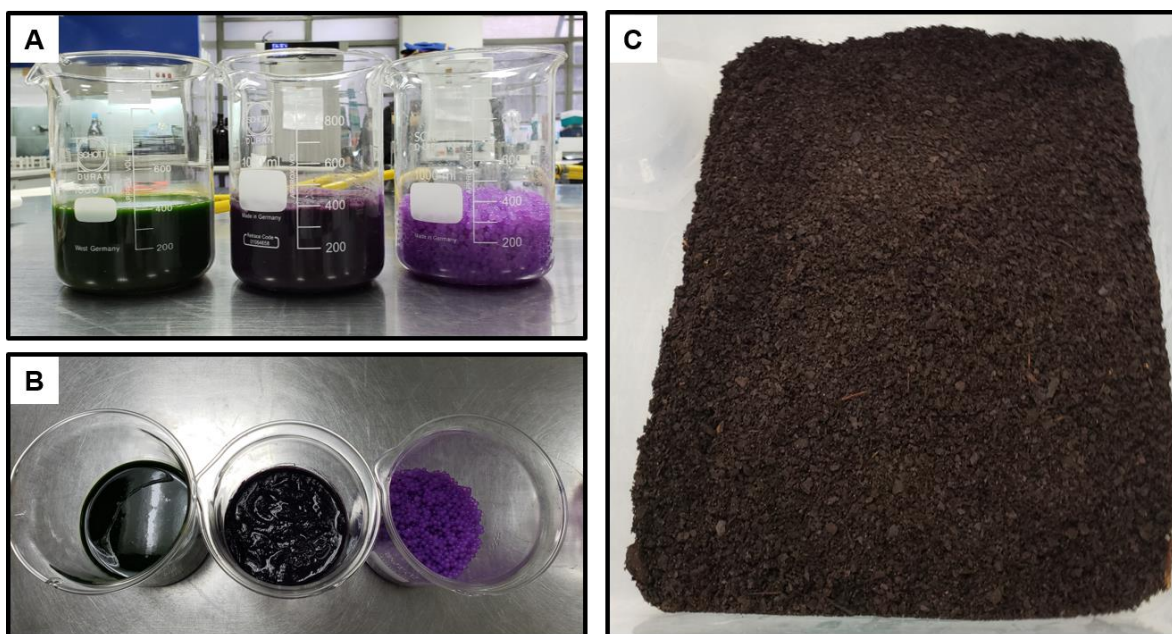


Figura 9. Materia prima para la formulación del biochar. Vista frontal de izquierda a derecha: biomasa algal, lodo fúngico/bacteriano, Perlas de alginato con *Pichia pastoris* (A). Vista superior de izquierda a derecha: biomasa algal, lodo fúngico/bacteriano, Perlas de alginato con *Pichia pastoris* (B). Corteza de pino (C).

6.5.1 Recuperación de biomasa algal

La biomasa de las microalgas se recolectó y se concentró de dos diferentes formas: La primera, en conos Imhoff se depositó 1 L de residuo líquido y se dejó sedimentar por 3 horas. Del

sedimento solamente se recuperaron 24 mL/L (**Figura 10**), sin embargo, quedó una gran cantidad de microalgas suspendidas en el agua, por lo que se realizó la segunda fase, donde se centrifugó el agua a 7000 rpm durante 10 minutos en frascos de 250 mL.

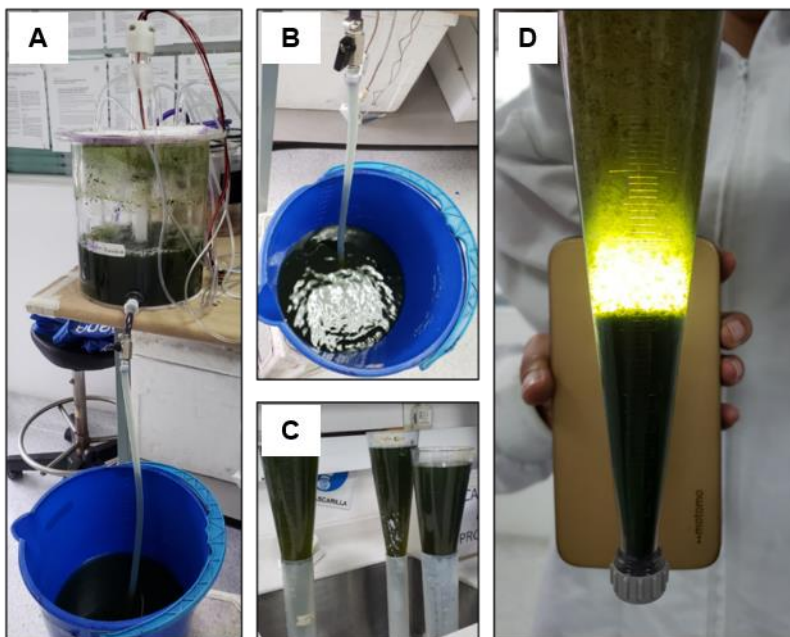


Figura 10. Recuperación de la biomasa algal. Biorreactor a escala piloto donde se obtuvo la materia prima de algas para el biochar (A). Biomasa algal (B). Conos Imhoff con el residuo líquido de la planta (C). Sólidos sedimentables recuperados y cantidad de microalgas en suspensión (D).

6.5.2 Preparación de mezcla para obtener el material crudo

Se mezclaron 500 mL de perlas de alginato, 200 mL de lodo fúngico/bacteriano y 900 mL de algas concentradas. La mezcla proveniente de los residuos de la planta de tratamiento se colocó en bandejas de aluminio para secarlas en el horno a 90 °C durante 12 horas.

Después del secado se procedió a caracterizar la mezcla, donde los parámetros evaluados fueron: porcentaje de humedad, COT, MO, fracción volátil (FV), cenizas y carbono fijo (CF). De cada parámetro solo se realizó una réplica.

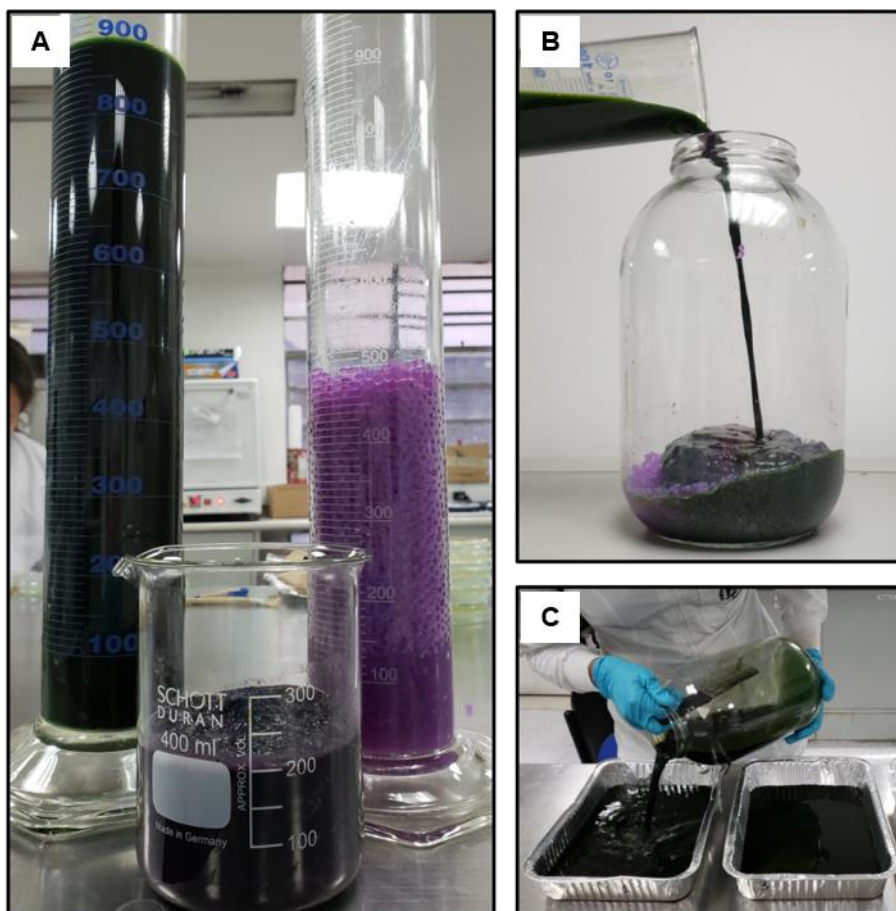


Figura 11. Materia prima del biochar. Algas, perlas de alginato y lodo fúngico-bacteriano (A). Mezcla de los diferentes materiales (B). Adición de la mezcla en bandejas de aluminio para secarlas en el horno (C).

Después de secar parcialmente la mezcla en el horno durante 12 horas a 90 °C para disminuir la humedad y concentrar la muestra, se recolectó en una probeta y se obtuvo un volumen final de 1 L. Esta mezcla se combinó junto con la corteza de pino en una relación 1:6 y se secó en el horno a 90 °C durante 24 horas.

A la mezcla de los residuos sólidos y la corteza de pino se le realizó caracterización antes y después de secarla en el horno. Los parámetros evaluados fueron: porcentaje de humedad, COT, MO, fracción volátil (FV), cenizas, carbono fijo (CF), pH y conductividad. Cada uno por triplicado.

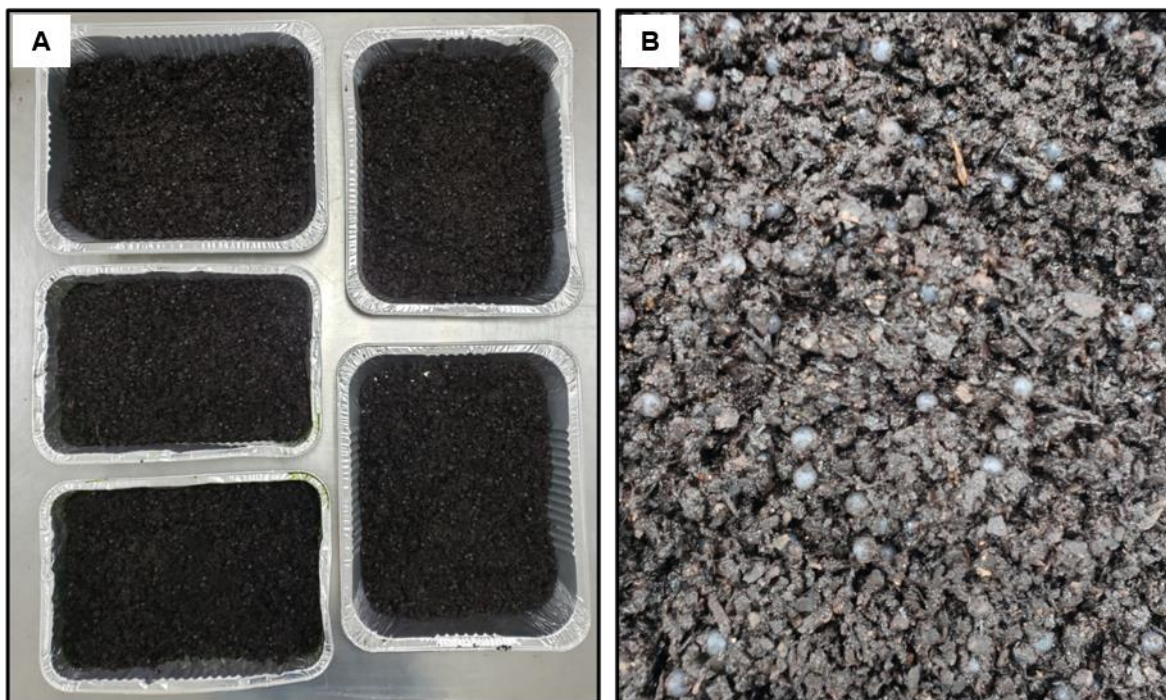


Figura 12. Material crudo. Bandejas de aluminio con la mezcla de corteza junto con el material crudo húmedo antes de secarlo en el horno (A). Composición de la mezcla utilizada para la formulación del biochar (B).

6.5.3 Producción y caracterización del Biochar

Se realizó un pretratamiento almacenando las muestras en campanas con sobres de Thermo Scientific™ Oxoid AnaeroGen durante 12 horas, con el objetivo de reducir el oxígeno [Moreno et al., 2019]

La mezcla obtenida anteriormente se utilizó para la producción y caracterización de biochar, denominados B300, B500 y B700, de acuerdo con las temperaturas de tratamiento térmico empleadas. Los parámetros evaluados en cada biochar fueron: productividad, porcentaje de humedad, COT, MO, fracción volátil (FV), cenizas, carbono fijo (CF), pH y conductividad, cada uno por triplicado (Figura 13).

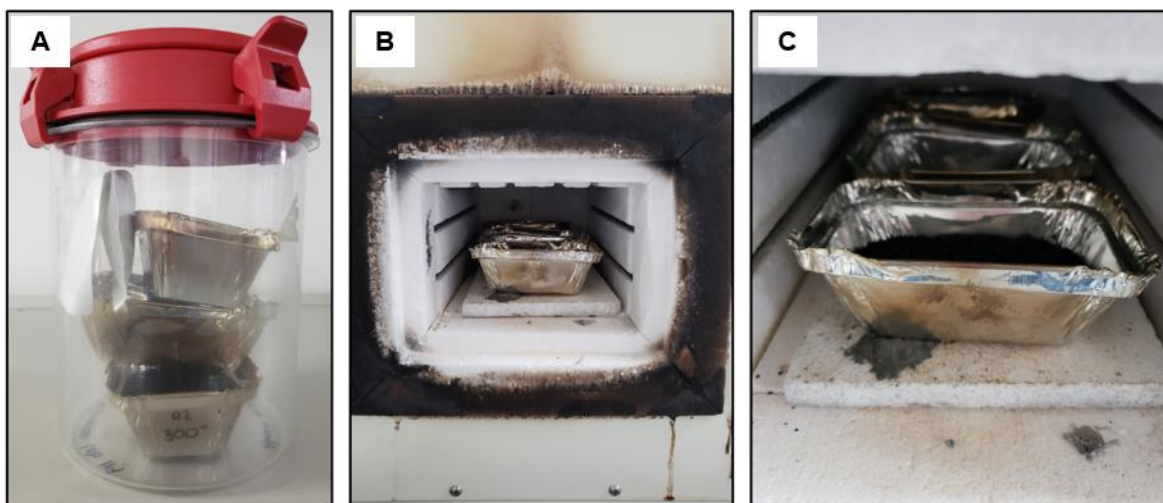


Figura 13. Producción del biochar. Muestras en campanas de anaerobiosis con sobres Thermo Scientific™ Oxoid AnaeroGen antes de realizar pirólisis en la mufla (A). Muestras en la mufla (B-C).

6.5.4 Caracterización física y química del material crudo y biochar

6.5.4.1 Análisis próximo

El pH y el porcentaje de humedad se determinaron siguiendo la metodología reportada en la Norma Técnica Colombiana 5167 del 2011. El carbono orgánico total (TOC) y contenido de materia orgánica (MO) se determinaron siguiendo los protocolos reportados en ASHTO T 267-86 2004.

6.5.4.2 Determinación de la fracción o carbono volátiles (FV/CV)

La determinación de la FV o CV se realizó por el método gravimétrico, se pesó un crisol vacío y se adicionaron 4 g de muestra previamente seca a 152 °C por 10 ± 5 minutos o hasta obtener el peso constante. A continuación, se introdujo el material en la mufla (Labtech™) ajustada a una temperatura de 950 °C. Una vez se alcanza la temperatura, el proceso de volatilización tiene una duración de 5 minutos. Posteriormente se dejó enfriar el residuo y se determinó el peso final después de 5 minutos a 950° C. El cálculo de CV se realizó aplicando la **ecuación 4** se realizaron

3 réplicas y los resultados se expresaron como el promedio, con su respectiva desviación estándar [Moreno et al., 2019; ASHTO 2007].

Ecuación 4.

$$FV (\%) = \frac{B - C}{B} * 100$$

Donde FV (%) es: el porcentaje de la fracción o carbono volátiles. B es: el peso de la muestra seca inicial (155°C) y C es: el peso de las muestras después de secar la muestra a 950 °C por 5 minutos.

6.5.4.3 Determinación del contenido de cenizas (C)

La determinación del porcentaje de cenizas se realizó por el método gravimétrico, se pesó un crisol vacío y se adicionaron 1 o 4 g de muestra proveniente de la determinación de CV. A continuación, se introdujo en la mufla (Labtech TM) ajustada a una temperatura de 650° C. Una vez se alcanza la temperatura, el proceso de obtención de cenizas se lleva a cabo durante 4 horas. Al finalizar, se dejó enfriar la muestra y se determinó el peso final después de 4 horas a 650° C. El cálculo de cenizas se realizó aplicando la **ecuación 5**, se analizaron 3 réplicas y los resultados se expresaron como el promedio, con su respectiva desviación estándar [Moreno et al., 2019; ASHTO 2007].

Ecuación 5.

$$Cenizas (\%) = \frac{D}{B} * 100$$

Donde Cenizas (%) es: el porcentaje de cenizas, D es: el gr del residuo después de calcinar 650 °C por 4 h y B es: el peso de muestra secada a 152 °C por 2 h.

6.5.4.4 Determinación de Carbono fijo

Para determinar el carbono fijo se realizó una sumatoria del porcentaje de la fracción volátil más el porcentaje de las cenizas. Posteriormente al 100 % se le restó el resultado obtenido, **ecuación 6** [Moreno et al., 2019; ASHTO 2007].

Ecuación 6.

$$100 - (fV + \% C)$$

6.5.4.5 Determinación de rendimiento en biochar y rendimiento de carbono fijo

Para determinar el rendimiento en biochar (cantidad de biochar obtenido a partir del aserrín crudo) bajo las condiciones de producción evaluadas se utilizó la **ecuación 7** y para calcular el rendimiento en carbono fijo se utilizó la **ecuación 8** [Yang et al., 2017].

Ecuación 7.

$$\gamma_{Biochar}(\%) = \frac{M_2}{M_1} * 100$$

Donden $Y_{biochar}$ es rendimiento en biochar. M_2 es peso seco del biochar al finalizar el tratamiento térmico. M_1 es peso inicial del aserrín crudo y seco.

Ecuación 8.

$$\gamma_{CF}(\%) = \frac{\gamma_{Biochar} * CF}{100 - \% \text{ Cenizas en aserrín}}$$

Donden Y_{CF} es rendimiento en carbono fijo. $Y_{biochar}$ es rendimiento en biochar. CF es carbono fijo (%). % cenizas es porcentaje de cenizas en el aserrín crudo.

6.6 Microscopia Electronica de Barrido (SEM)

La topografía superficial, la forma, tamaño y el análisis por componentes asociados con el aserrín y biochar, se observó a través de SEM marca Jeol™ JSM 6490LV con potencia entre 20 kV - 30kV, señal SEI y magnificaciones entre 150X, 1000X y 2000. Antes de la observación, las muestras fueron recubiertas con una capa de oro en condiciones de vacío en un metalizador Denton Vacuum Desk IV. Con el mismo equipo se realizó una (EDS) para conocer la composición atómica del material (Bhowmick *et al.*, 2018; Moreno *et al.*, 2019). Este servicio fue contratado en la Universidad de los Andes (Bogotá, D.C., Colombia).

7. Resultados

7.1 Aislamiento de microalgas

La columna de Winogradsky funciona como un ecosistema en miniatura para estudiar las comunidades microbianas involucradas en los ciclos biogeoquímicos del Carbono, Nitrógeno, Azufre e incluso fósforo, así como la transformación de contaminantes y materia orgánica [Pagaling et al., 2017]. Dentro de la estratificación microbiana presente en la columna, las microalgas representan a los organismos fotosintéticamente activos en la superficie de la columna que utilizan la luz como energía lumínica para fijar el CO₂ como fuente de carbono. El gradiente redox desde la superficie hacia el interior de la columna se establece a medida que las microalgas producen oxígeno en el agua que las recubre y los microorganismos aeróbicos, como *Thiobacillus* sp. y *Beggiatoa* sp., lo consumen gradualmente [Babcsányi et al, 2017].

Se observaron 13 géneros diferentes en las 3 columnas con distintos tiempos de estabilización (triplicados). La mayor riqueza de géneros se observó en las columnas más jóvenes (4 meses), observando los géneros de: *Nitzschia* sp., *Pinnularia* sp. y *Achnanthydium* sp., dentro del grupo de diatomeas y *Chlorococcum* sp., *Chlorella* sp., *Coelastrum* sp., *Trachelomonas* sp. y *Euglena* sp., pertenecientes al grupo de las clorófitas. Las microalgas observadas en las columnas con 4 meses de estabilización corresponden al 61.5 % de las microalgas totales, 23 % de diatomeas y 38.5 % de clorófitas. (Figura 14, Figura 15G, 15H y 15I).

En las columnas con 9 meses de estabilización, los géneros observados del grupo de diatomeas fueron: *Pinnularia* sp., *Nitzschia* sp. y *Achnanthydium* sp., *Frustulia* sp.; y dentro del grupo de clorófitas se encontró a: *Chlorella* sp., *Coelastrum* sp., *Chlorococcum* sp., *Trebouxia* sp. La riqueza varió ligeramente al recuperar los géneros de *Trebouxia* sp. y *Frustalia* sp, que no se observaron a los 4 meses. Por otro lado, las microalgas *Trachelomonas* sp. y *Euglena* sp, no se observaron en estas columnas. Esto determinó que el porcentaje de algas observadas también fuera del 61.5 % a los 9 meses, 30.8 % de diatomeas y clorófitas (Figura 14, Figura 15D, 15E, 15F)

Por último, en las columnas de 12 meses de estabilización la riqueza disminuyó porque solamente los géneros de *Chlorella* sp., *Chlorococcum* sp., y *Achnanthydium* sp. se mantuvieron. Sin embargo,

géneros como: *Stichococcus* sp., *Navicula* sp. y *Diadesmis* sp., estas dos últimas diatomeas, solamente se evidenciaron en estas columnas (Figura 15A, 15B y 15C). De modo que, el porcentaje de microalgas observadas fue de 46.2 % a los 12 meses de estabilización, 23.1 de diatomeas y clorófitas.

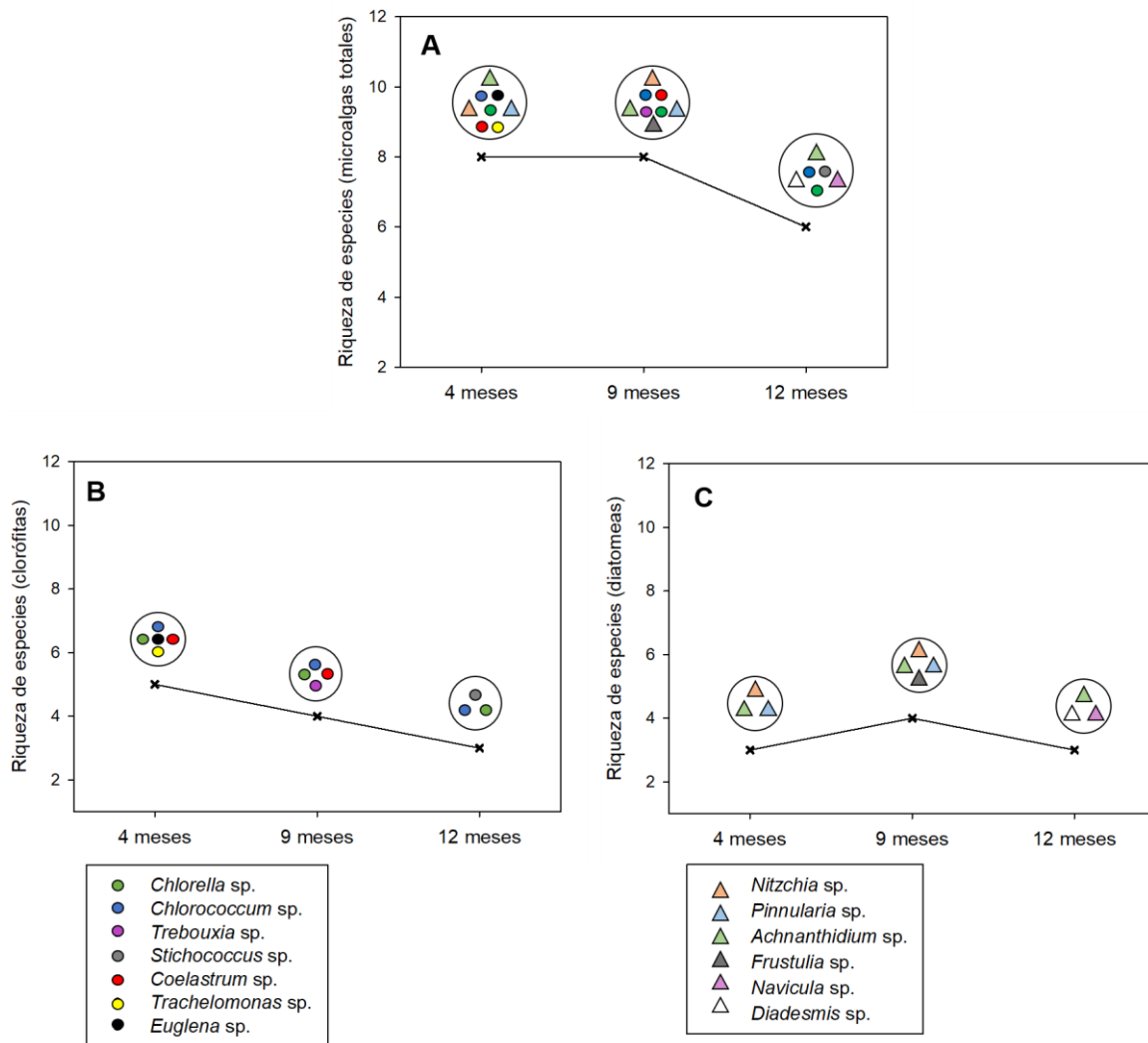


Figura 14. Riqueza específica en función del tiempo. Microalgas totales (A). Microalgas clorófitas (B). Microalgas diatomeas (C). Los triángulos representan a las microalgas diatomeas y los círculos a las clorófitas.

De las diferentes columnas que pertenecen al mismo grupo con respecto al tiempo de estabilización; se evidencia que los géneros de *Chlorella* sp., *Chlorococcum* sp. y *Achnanthydium* sp. permanecen a lo largo del tiempo. Además, se encontró mayor cantidad de géneros del grupo de

las clorófitas que de diatomeas, 7 de 13 géneros totales (**Figura 14A**). Finalmente, en términos de riqueza de especies, no hubo mayor variación en el tiempo, sin embargo, sí se observó un cambio en la composición de especies conforme avanzó el tiempo de estabilización de las columnas (**Figura 14**).

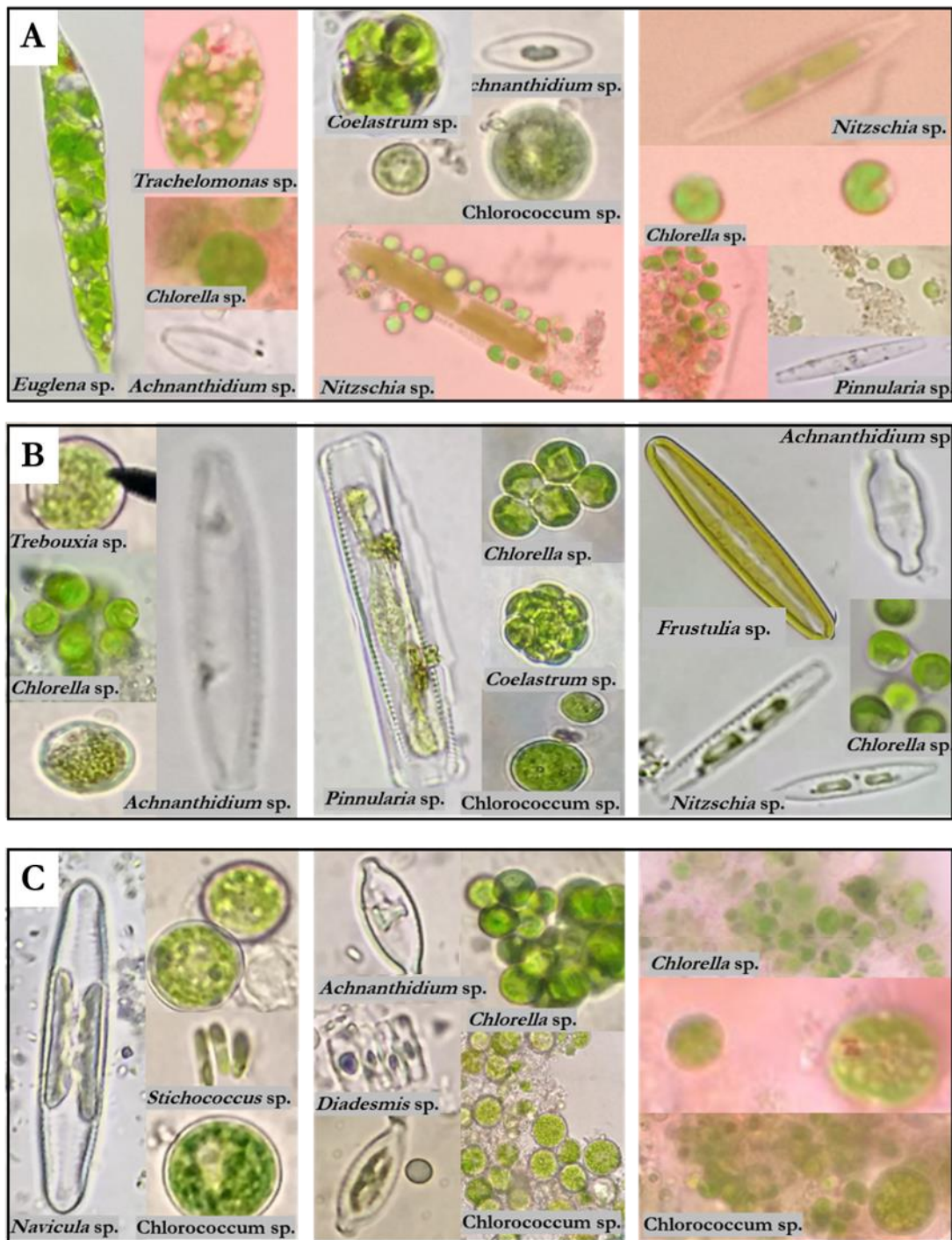


Figura 15. Morfotipos de microalgas más representativos encontrados en las 3 diferentes columnas de Winogradsky. Las de 3-4 meses de estabilización (A). Las de 9 meses de estabilización (B). Las de 12 meses de estabilización (C).

7.1.1 Recuento de microalgas

Los recuentos de microalgas totales (MAT), colorófitas (MAC) y diatomeas (MAD), variaron en función del tiempo de estabilización. Determinando que se observaran diferencias significativas entre tiempos ($p < 0.0001$). Siendo las columnas con 12 meses de estabilización en las que se obtuvieron los recuentos más altos con valores de 2.3×10^7 MAT/mL, 2.3×10^7 MAC/mL y 6.6×10^5 MAD/mL (**Figura 16**). Por otro lado, el recuento de las columnas de 4 y 9 meses de estabilización osciló entre: 2.0×10^5 - 3.1×10^5 MAT/ mL, 1.2×10^5 MAC/ mL y 7.7×10^4 - 1.9×10^5 MAD/ mL.

Adicionalmente, se evidenció que prevaleció el grupo de las MAC sobre las MAD en las columnas con 3 y 12 meses de estabilización, al presentar unos porcentajes de 60.91 % y 96.99 % respectivamente. Sin embargo, en las de 9 meses predominan las MAD con un porcentaje de 61 %. Comportamiento que se puede evidenciar en la **figura 16**.

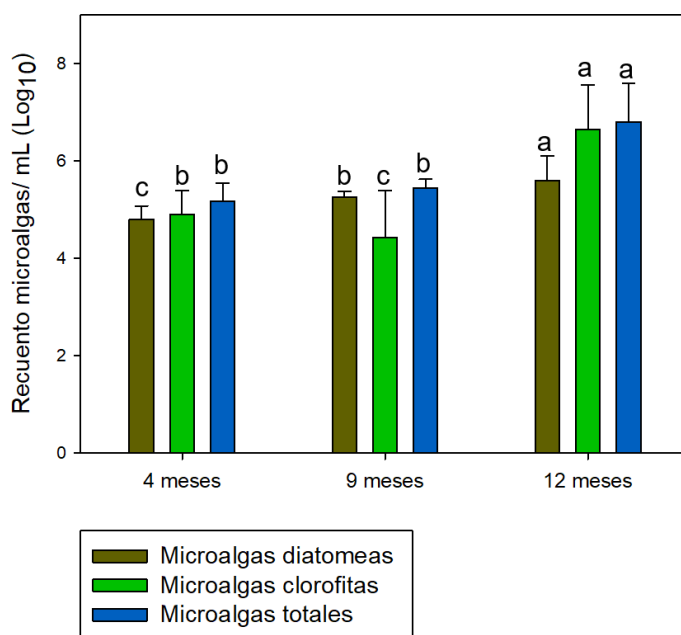


Figura 16. Recuento en cámara de Neubauer de las microalgas presentes en las columnas de Winogradsky en función del tiempo de estabilización. Promedio de tres réplicas con su respectiva desviación estándar. Las letras identifican las diferencias significativas entre recuentos en función del tiempo de estabilización. Siendo la letra **a** la que corresponde a los recuentos más altos.

7.2 Pruebas de tolerancia a concentraciones ascendentes de ARnD/TB

Para conocer cuáles de las microalgas podían crecer y tolerar concentraciones ascendentes del ARnD/TB postratada por el consorcio fúngico/bacteriano, se realizaron pruebas de tolerancia a 15 días. El efluente utilizado es el producto de tratar el ARnD/TB en la planta piloto del laboratorio de Microbiología Ambiental y suelos.

7.2.1 Caracterización del ARnD/ TB usada para las pruebas de tolerancia

Para establecer cuáles eran las características asociadas con concentración del efluente tratado en la planta que a su vez serían los valores de partida para las pruebas de tolerancias. Se realizó la caracterización física y química del efluente (**Tabla 8**). De acuerdo con los resultados las concentraciones iniciales de DQO, DBO₅, COT, unidades de color y pH, que debían tolerar las algas al cultivarlas con el ARnD/TB al 100 % fueron: 473.29 mg/L, 184 mg/L, 119 mg/L, 215.36 UC y 8.0, para DQO, DBO₅, COT, unidades de color y pH, respectivamente. Algunos de los valores obtenidos estuvieron por encima del valor máximo permisible para vertimiento, lo que justifica la implementación de un tratamiento terciario con las microalgas que tengan la mayor tolerancia a este efluente. De tal manera que puedan crecer y remover parte de los contaminantes residuales.

Tabla 8. Valores iniciales y finales de los parámetros evaluados en el agua residual utilizada para la prueba de tolerancia, y valores máximos permisibles de las resoluciones vigentes: 3957 de 2011 y 0631 de 2011.

Parámetro	Unidades	Afluente	Efluente	Resolución	Resolución
				3957 de 2009	0631 de 2015
Sólidos totales	mg/L	9430	1195.8	No aplica	No aplica

Sólidos suspendidos totales	mg/L	1755	445.4	600	50
Sólidos disueltos totales	mg/L	1295	1079.6	No aplica	No aplica
Sólidos sedimentables	mL/ L	300	0.30	2	1.0
DQO	mg/L O ₂	3388	473.3	1500	150
DBO ₅	mg/L O ₂	1773	184	800	50
DBO ₅ /DQO	-	0.52	0.388	No Aplica	No Aplica
COT	mg/L	215.00	119	No aplica	No aplica
pH	-	6.3	8.02	5.00-9.00	6.0-9.0
Conductividad eléctrica	mS/cm	1.2	1.15	No aplica	No aplica
Unidades de color	UC	1244	215.4	1000	No aplica

Al realizar la dosificación del efluente las concentraciones iniciales teóricas de DQO, DBO₅, COT y UC, disminuyeron en función de la dosificación (10 %, 50 % y 100 % v/v) y su efecto sobre el crecimiento de las microalgas fue diferente (**Tabla 9**).

Tabla 9. Valores iniciales teóricos para las dosificaciones del efluente utilizado en las pruebas de tolerancia.

Dosificación % (v/v)	DQO (mg/L)	DBO ₅ (mg/L)	COT (mg/L)	UC
10	47,33	18,4	11.9	21.53
50	236.5	92	59.5	107.6
100	473.3	184	119	215.3

En cuanto a la tolerancia a concentraciones ascendentes del efluente se observaron diferencias significativas entre ellas ($p < 0.0001$); demostrando que las microalgas provenientes de las

columnas con menor tiempo de estabilización o las más jóvenes fueron las menos tolerantes a las tres concentraciones evaluadas (**Figura 17**). Ya que los recuentos no fueron superiores a 1×10^2 UFC/mL o 2.0 unidades logarítmicas/mL. A su vez para estas microalgas no se observaron diferencias entre el control y las tres concentraciones ($p > 0.0001$) (letras de color rojo en la gráfica). Las microalgas provenientes de las columnas con 9 meses de estabilización presentaron tolerancia media a las concentraciones evaluadas conformando el grupo heterogéneo b (T=b) (letras de color negro en la gráfica). Para estas los recuentos entre del control y efluente al 10 % (v/v) fueron de 5.2 Log₁₀ de UFC/mL sin que se evidenciaran diferencias entre las dos ($p > 0.0001$). A las concentraciones de 50 % (v/v) y 100 % (v/v) de efluente los recuentos fueron de 4.9 y 4.6 Log₁₀ de UFC/mL, siendo significativamente más bajos que para el control y 10 % de efluente ($p < 0.0001$). Por último, las algas que provenían de las columnas más estabilizadas (12 meses) fueron las que presentaron los recuentos más altos para el control y la concentración del 10 % (6.1 y 5.9 Log₁₀ de UFC/mL) ($p < 0.0001$). A concentraciones del 50 % y 100 %, los recuentos fueron de 5.0 y 4.9 Log₁₀ UFC/mL, respectivamente.

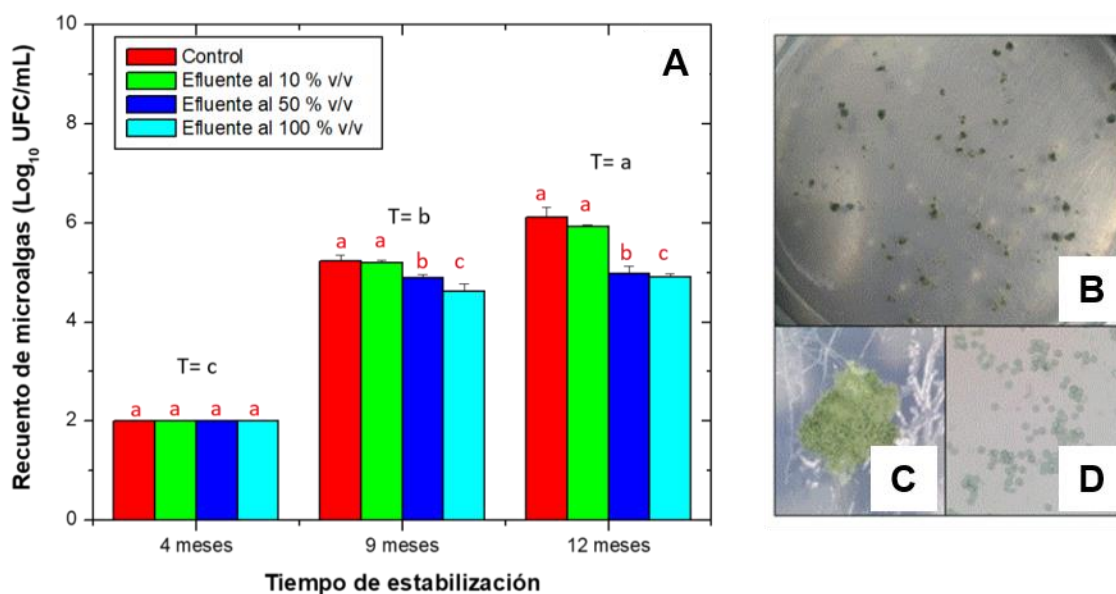


Figura 17. Pruebas de tolerancia. Recuentos en placa de todos los tratamientos (50, 10 y 100 % v/v) con respecto al tiempo de estabilización (A). Siembra en superficie en medio ARnD/ TB al 100 % de las algas presentes en cada columna (B). Colonias aterciopeladas, verdes y amorfas; correspondiente a las que toleraron la concentración más alta de ARnD (C). Microscopia de las colonias aisladas, *Chlorella* sp. (D).

Los resultados indicaron que a medida que se estabilizan las columnas, las microalgas crecieron y presentaron mayor tolerancia a concentraciones ascendentes de DQO (236.5 y 473.3 mg/L, para 50 % y 100 % de efluente), DBO₅ (92 y 184 mg/L, para 50 % y 100 % de efluente), COT (59.5 y 119 mg/L, para 50 % y 100 % de efluente) y UC (107.6 y 215.2, para 50 % y 100 % de efluente) (**Tabla 9**). La respuesta positiva o tolerancia a concentraciones del 50 y 100 % se podría relacionar con que las microalgas fueron aisladas de las columnas de Winogradsky, y en estos micro ecosistemas las concentraciones de materia orgánica son altas, lo que pudo generar que las microalgas ya estuvieran adaptadas a estas concentraciones. Las cargas altas de materia orgánica se comprobaron al realizar la cuantificación de de DQO y COT a partir de las columnas más antiguas y de las nuevas, con tres meses de estabilización. Para las cuatro muestras analizadas los valores fueron de 150, 130, 390 y 270 mg/L para DQO. En relación con el carbono orgánico total los valores fueron de 35.2, 21.6, 67.8 y 43.2 mg /L.

7.3 Operación de la planta de tratamiento para la obtención de efluente pos tratado como sustrato para el cultivo mixotrófico de las microalgas y tratamiento terciario en reactor fototrófico

En estudios previos realizados por Hernandez-Saenz, 2017 y Rojas en el 2018, los autores determinaron que los hongos y bacterias que conforman el consorcio fúngico/bacteriano, producen ligninasas (las bacterias solamente producen MnP y LiP) e hidrolizan polímeros de alto peso molecular, pero con menor grado de complejidad que los colorantes. Para verificar que los hongos continuaran produciendo estas enzimas se realizó un experimento de verificación, antes de iniciar la operación de la planta piloto para la obtención del efluente a usar para el tratamiento terciario con microalgas. Los resultados de estas pruebas se presentan a continuación.

7.3.1 Potencial enzimático y colonización fúngica

Los hongos de pudrición blanca producen enzimas extracelulares de importancia en el tratamiento secundario en planta, estas se evidenciaron semi cuantitativamente por el crecimiento en diferentes sustratos inductores en medios agarizados. El agar de extracto salvado de trigo es el que tiene la composición nutricional más alta, contiene: vitaminas, minerales, proteínas, carbohidratos, entre otros. Adicionalmente, dentro de los carbohidratos se encuentra

fibra vegetal como la hemicelulosa, celulosa y lignina. En este medio, *Phanerochaete crysosporium* creció 9 veces más rápido que *Pleurotus ostreatus* en el tercer día de incubación con valores de 46 mm y 5 mm respectivamente. Y junto con *Ganoderma lucidum* colonizaron toda la caja en el día 12 (**Figura 18A**).

En el agar leche al 1 % (m/v), el sustrato inductor es la caseína, una proteína que es degradada por proteasas y exoenzimas produciendo halos de hidrolisis. En este medio el único hongo que hidrolizo la caseína fue *Trametes versicolor* con un porcentaje de hidrolisis del 73.3 % asociado a la presencia de halos de hidrólisis. Sin embargo, este hongo no colonizo toda la caja durante los 12 días de incubación, como sí ocurrió con *Phanerochaete crysosporium*, los valores fueron de 55 y 90 mm respectivamente (**Figrua 18B**).

Para conocer aquellos hongos lignocelulósicos con capacidad de hidrolizar la celulosa por la secreción de un sistema complejo de enzimas extracelulares, se utilizó agar celulosa al 1 % (m/v). En este medio *Trametes versicolor* colonizó toda la caja (90 mm) en el sexto día de incubación en comparación con los tres, obteniendo que a los mismos seis días el crecimiento no fue superior a 31 mm del diámetro total de la caja. No se observaron halos de hidrólisis (**Figura 18C**).

Otro medio utilizado, fue agar de almidón al 1 % (m/v), el cual es un carbohidrato compuesto de polímeros de glucosa y su degradación se lleva a cabo por enzimas de tipo amilasa. De todos los hongos en el doceavo día de incubación los únicos que lograron colonizar toda la caja fueron *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor*, pero *Phanerochaete crysosporium* junto con *Ganoderma lucidum* presentaron valores de crecimiento del 68 y 78 mm respectivamente (**Figura 18D**).

Por último, en el medio tributirina se evidenció la producción de enzimas extracelulares de tipo lipasa. En este medio no hubo crecimiento superior al 50 % del diámetro total de la caja (45 mm) de ningún hongo, y el hongo que colonizo mayor superficie en la caja fue *Pleurotus ostreatus* con un valor de 32 mm (**Figura 18E**).

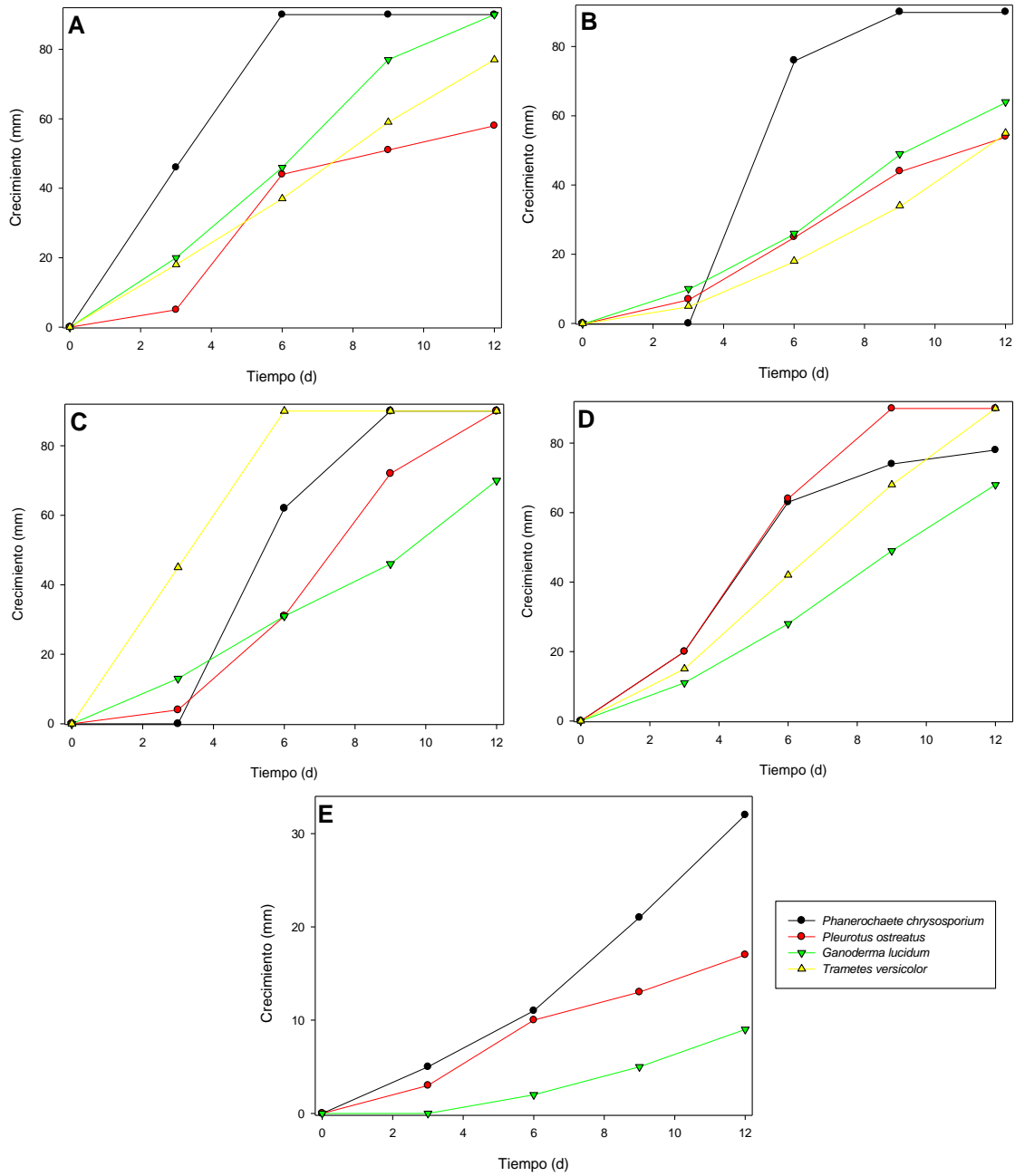


Figura 18. Potencial enzimático. Determinación semi cuantitativa durante 12 días de enzimas extracelulares producidas por los hongos utilizados como inóculo en la planta piloto, por la oxidación de diferentes sustratos presentes en medios agarizados. Crecimiento en agar extracto salvado de trigo (A), agar leche (B), agar celulosa (C), agar almidón (D) y agar base tributirina (E). Se incubaron a 32 °C por 12 días.

7.3.2 Operación de la planta para la obtención del efluente

Se realizaron dos ciclos de operación en la planta, en el primero el ARnD/TB fue tratada durante 9 días, con un lote nuevo de lodo fúngico/bacteriano y se realizaron muestreos cada 24 horas. Para el segundo ciclo se recirculo el 20 % (v/v) del lodo fúngico/bacteriano al reactor biológico y se adicionó un nuevo lote de ARnD. El proceso también duró 9 días, pero solamente se tomaron muestras iniciales y finales. En la **tabla 10** se presentan los resultados de entrada y salida para los dos ciclos.

Tabla 10. Valores iniciales y finales del ciclo 1 y 2 de los parámetros evaluados en el agua residual operada en planta, y valores máximos permisibles de las resoluciones vigentes: 3957 de 2011 y 0631 de 2015.

Parámetro	Unidad	Afluente Ciclo 1	Efluente Ciclo 1	Afluente Ciclo 2	Efluente Ciclo 2	Resolución 3957 de 2009	Resolución 0631 de 2015
Sólidos totales	mg/L	3900	1400	1700	1000	No aplica	No aplica
Sólidos sedimentables	ml/L	150	0.5	-	-	2	1
Sólidos suspendidos	mg/L	630	110	370	110	600	50
Sólidos disueltos	mg/L	4249	1070	-	-	No aplica	No aplica
DBO ₅	mg/L	6513.3	583.3	1536	197	1500	50
DQO	mg/L	11050	1040	1750	585	800	150
DBO ₅ /DQO	-	0.59	0,56	0.88	0.33	No aplica	No aplica
Carbono orgánico Total	mg/L	496	246	-	-	No aplica	No aplica
pH	-	5.42	7.44	5.97	7.56	5-9	6-9

Nitratos (NO ₃ ⁻)	mg/ L	3.0	2.2	3.0	2.5	No aplica	Análisis y reporte
Nitritos (NO ₂ ⁻)	mg/ L	0.166	0.144	0.106	0.167	No aplica	Análisis y reporte
436 nm		965.9	825.8	1507.6	858.3		Análisis y reporte
525 nm		3439.4	678	2700.8	886.4		Análisis y reporte
620 nm		1121.2	265.15	1659.1	412.9		Análisis y reporte
Unidad de color	UC					No aplica	
465 nm*		1367.4	704.5	1590.9	867.4	No aplica	No aplica
550 nm**		3753.8	447	2700.8	591		No aplica

*Longitud de onda en que la mayoría de los lotes trabajados en el laboratorio de ambiental han demostrado el pico de absorción más alto. **Pico de adsorción más alto de los lotes utilizados en este trabajo (**Figura 19**).

7.3.3 Primer ciclo de operación de la planta de tratamiento

Los cambios en el color fueron analizados de dos formas. La primera usando la longitud de onda de máxima absorción obtenidas en las curvas espectrales que no está estipulada en la legislación colombiana (465 nm), pero sí permite establecer el porcentaje de decoloración para este tipo de afluentes e irá cambiando entre lotes. La segunda leyendo las absorbancias de las muestras a 3 longitudes de onda diferentes (436, 525, 620 nm), las cuales fueron establecidas por la resolución 0631. La resolución no tiene límite de vertimiento, pero deben declararse los valores iniciales y finales.

El color real del agua era morado oscuro, que reflejaba un alto grado de contaminación causada por colorantes químicos que pueden ser de la familia de los azoicos, trifenilmetánicos y antraquinoides, entre otros [Morales et al., 2016; Pedroza et al., 2018]. En las curvas espectrales se puede identificar de forma semi cuantitativa que colorantes podrían estar presentes en el ARnD/TB de acuerdo con la longitud de onda que genera el mayor pico de absorción, el

máximo de absorción de diferentes colorantes trabajados en los laboratorios son: Fucsina básica que se lee a 545 nm, fucsina fenicada (Zn) a 546 nm, eosina Y a 516 nm, sudan III a 507 nm, cristal violeta a 588-590 nm, azul metileno a 657 nm, azul de lactofenol a 600 nm, rojo metilo a 410-521 nm, azul cresil brillante a 624 nm y rojo Congo a 493 nm. En el ARnD/TB del ciclo 1 (**Figura 19A**) la mayor absorción se presentó en el rango de luz visible a 550 nm que equivale a 3753.8 UC, transcurridos los 9 días de tratamiento, las UC de salida fueron de 447 UC que equivalen a 88.1 % de remoción.

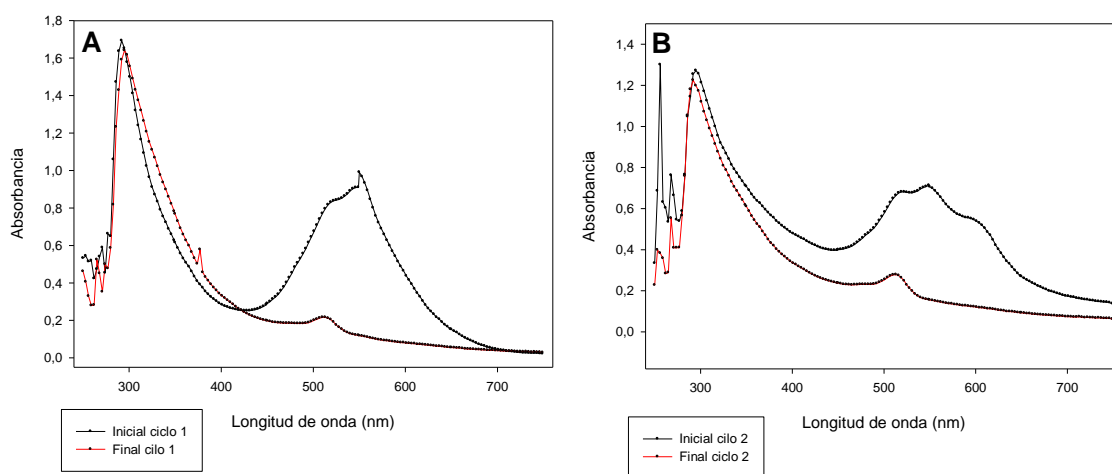


Figura 19. Curvas espectrales del efluente y el afluente de la planta piloto de tratamiento. Ciclo 1 (A). Ciclo 2 (B).

En relación con las cuatro absorbancias adicionales (465 nm, 436 nm, 525 nm y 620 nm), se evidenció tanto una disminución de color como la posible transformación de las estructuras químicas en la mezcla de colorantes. La transformación ocurrió en el segundo y quinto día; es posible que los compuestos más complejos y con estructuras aromáticas que se leen a 620 nm disminuyeron y, se pudieron formar intermediarios más sencillos y alifáticos que se leen a 436 nm, aumentando el pico de absorción (**Figura 20A**).

La longitud de onda con mayores unidades de color (3439.4 UC) fue a 525 nm en la cual se logra un porcentaje de remoción del 80 % de las UC iniciales. A 465 nm se obtuvo 48.5 % de remoción de las UC. La longitud de onda con menor porcentaje de remoción fue a 436 nm (965.6 UC iniciales) con tan solo la disminución del 14.5 % de las UC. Por último, a 620 nm se obtiene un porcentaje de remoción del 76.3 % y la menor cantidad de unidades de color finales (265.1 UC)

en el noveno día después de pasar por los filtros de arena cuarcítica y carbón activado. En el séptimo y quinto día las unidades de color de las cuatro longitudes de onda aumentaron ligeramente, pero nuevamente disminuyen. Esto pudo relacionarse con posibles fenómenos de desorción por cambios de pH dentro del reactor. Ya que se observa una tendencia ascendente para esta variable de respuesta.

Dentro de los parámetros evaluados, aquellos que miden la cantidad de oxígeno requerido para la oxidación biológica y/o química de la materia orgánica son: la DBO₅ y la DQO, para ambas variables la remoción fue alta con porcentajes de 91 % (583.3 mg/L finales) y 90.6 % (1040 mg/L finales) respectivamente (**Figura 20B**). Aunque se obtuvieron eficiencias superiores al 90 %, aún siguen sin cumplir con la normativa para su vertimiento puntual según resolución 0631, pero si cumplen para la resolución 3947 de la SDA (**Tabla 10**). La relación DBO₅/DQO presentan valores mayores a 0.5 durante los 9 días de tratamiento en planta, donde en el séptimo día se evidencia el pico más alto con una relación de 0.9. Estos resultados indican que la biodegradabilidad del agua está aumentando por la transformación mediada por los microorganismos. Es decir, se forman estructuras más sencillas que los compuestos iniciales. Adicionalmente, se midió el COT inicial y final con un porcentaje de remoción del 49.6 % este parámetro mide únicamente la cantidad de carbono unido a compuestos orgánicos.

Otros parámetros que se midieron fueron los sólidos totales (ST) y sólidos suspendidos totales (SST), **figura 20C**. Ambos disminuyeron en función del tiempo, pero al 8 día se presentó un incremento. Sin embargo, esta variación fue controlada al pasar por las unidades de filtración dado que los valores obtenidos disminuyeron cuatro veces más, obteniéndose una eficiencia de remoción del 64.1 % para los ST y 82.5 % para los SST.

Por otra parte, los nitratos y nitritos (**Figura 20D**) son uno de los parámetros más importantes y de los cuales la normativa no contempla un valor límite permitido sino solo su análisis y reporte, pero si se encuentran en grandes concentraciones en el efluente genera riesgo ambiental debido al enriquecimiento en nutriente de un sistema acuático, véase la **tabla 2**. En el tratamiento secundario; los nitratos iniciales fueron de 3 mg/L y disminuyeron hasta 2.2 mg/L, lo que representa un 26 % de remoción. Para los nitritos también se observó disminución ya que de 0.166 mg/L en el afluente, la concentración final fue de 0.144 mg/L, lo que representa un 13.3

% de remoción. A partir del tercer día se empezó a evidenciar la disminución de ambos parámetros, y en sexto y noveno día el aumento de la concentración de nitrito estuvo acompañado por una disminución de nitrato presentes en el ARnD. Ambos parámetros logran entrar dentro de los parámetros establecidos por la EPA, ya que establecen un límite de nitratos con 10 mg/L y para los nitritos 1 mg/L.

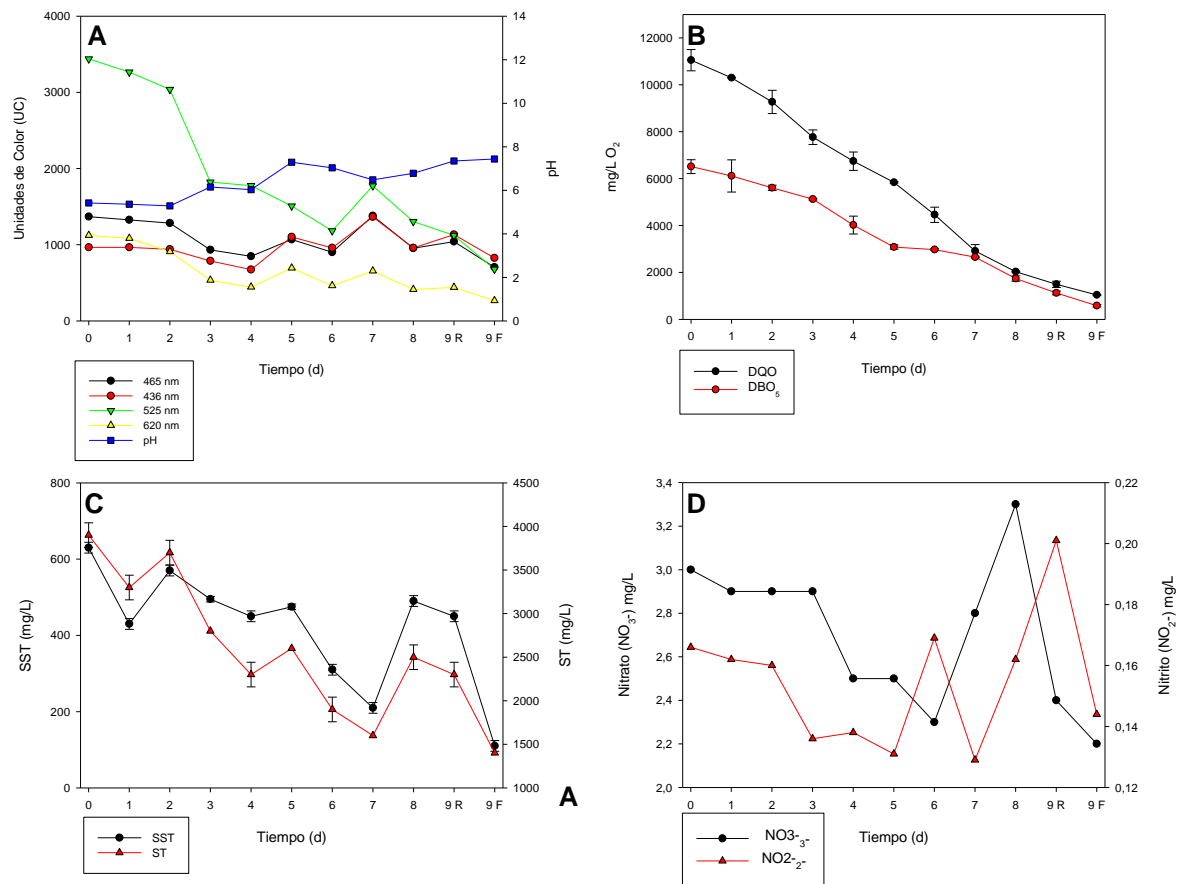


Figura 20. Parámetros evaluados del primer ciclo en la planta de tratamiento piloto de la facultad de ciencias. pH y Unidades de color en función del tiempo (A). Demanda biológica de oxígeno (DBO₅) y demanda química de oxígeno (DQO), promedio de dos réplicas cada parámetro (B). Sólidos suspendidos totales y sólidos totales en función del tiempo, con el promedio de dos réplicas cada uno (C). Nitratos y nitritos en función del tiempo (D). Donde 9R es: muestra tomada el noveno día de tratamiento en planta tomada desde el biorreactor; y 9F es: muestra tomada el noveno día de tratamiento en planta después de pasar por sedimentador y filtros de arena cuarcítica y carbón activado. Promedio de tres réplicas.

Por último, para este ciclo, al tratarse de un tratamiento que implica un consorcio biológico tanto de hongos como de bacterias, se realizaron recuentos de ambos grupos de microorganismo al

iniciar y finalizar el tratamiento con el fin de evaluar el nivel de adaptación, persistencia y proliferación de estos; el valor promedio obtenido a partir de las cinco réplicas realizadas se muestra en la **Tabla 11**. Se evidencia una clara diferencia en términos de Log_{10} donde tanto hongos como bacterias en el efluente superan las cantidades iniciales.

Tabla 11. Recuento de hongos y bacterias (Log_{10}) iniciales y finales de la planta piloto. Primer ciclo, con su respectiva desviación estándar y coeficiente de variación. *Los hongos iniciales no crecieron en la dilución más concentrada, se informa el recuento de acuerdo con el límite de detección (UFC/mL).

		Recuento	Desviación	Coficiente
		(Log_{10})	estándar	de variación
Iniciales	Bacterias	7.23	0.26	3.65
	Hongos	4.67 ($<10^{4.5}$ *)	0.52	11.07
Finales	Bacterias	8.39	0.47	5.55
	Hongos	3.33	0.45	13.57

7.3.4 Segundo ciclo tratamiento en planta

Para el segundo ciclo se utilizó un segundo lote de ARnD que tenía concentraciones iniciales menores que las detectadas para el ciclo uno y como lodo activado se recirculo el 20 % de la biomasa fúngica/bacteriana del ciclo uno y que provenía del sedimentador secundario (lodo que está adaptado a las condiciones y a la carga contaminante del agua). Por otro lado, para este ciclo sólo de tomaron muestras iniciales y finales, por lo tanto, se representan por figuras de barras.

Cada lote de ARnD utilizado se consideran variable en sus características debido a la variación en cantidad y tipo de colorante contenido. Sin embargo, en ambos lotes (ciclo 1 y 2) se evidenció que la longitud de onda de máxima absorción fue a 549-550 nm (**Figura 19B**). El porcentaje remoción del segundo lote al noveno día fue del 78 % con 590.9 UC en el efluente.

Las unidades de color evaluadas a 465 nm, 436 nm, 525 nm y 620 nm, se obtuvo un porcentaje de decoloración de 45.48, 36.43, 67.18 y 75.11 % respectivamente a los nueve días (**Figura 21A**). Sin embargo, en este ciclo en comparación con el primero hubo menor eficiencia en la remoción del color presentes en las diferentes longitudes de ondas evaluadas. Lo que podría relacionarse

con saturación del lodo o cierto grado de inactivación de las enzimas por la presencia de intermediarios. Este comportamiento también se encuentra altamente relacionado con los valores de pH, ya que tiende a favorecer procesos de adsorción y actividad enzimática por parte de los hongos. El pH inicio ácido, 5.97, y aumento en el noveno día a pH básico, 7.56, mismo comportamiento que ocurrió en el primer ciclo operado (**Figura 21A**).

La DBO₅ y DQO presentaron porcentajes de remoción de 87.2 y 66.9 % (197.2 y 585 mg/L respectivamente), porcentajes que fueron 1.3 más bajos que en el primer ciclo. Por otro lado, el índice de tratabilidad inicio en 0.88 y finalizo en 0.34 (**Figura 21B**).

Los SST y ST disminuyeron después de 9 días de operación en planta, 41.2 y 70.3 respectivamente, esta disminución en gran medida es atribuida a las dos unidades de tratamientos finales, sedimentador y filtros de arena cuarcítica (**Figura 21C**).

Finalmente, los nitratos disminuyeron de 3 mg/ L a 2.5 mg/ L, con un porcentaje de remoción del 16.7 %, pero los nitritos aumentaron de 0.106 mg/ L a 0.167 mg/ L. Lo que está relacionado directamente con procesos de desnitrificación llevado a cabo por los microorganismos presentes en el lodo fúngico bacteriano (**Figura 21D**).

Cabe resaltar que en el segundo ciclo operado en planta no se le realizaron recuentos de hongos ni bacterias iniciales y finales.

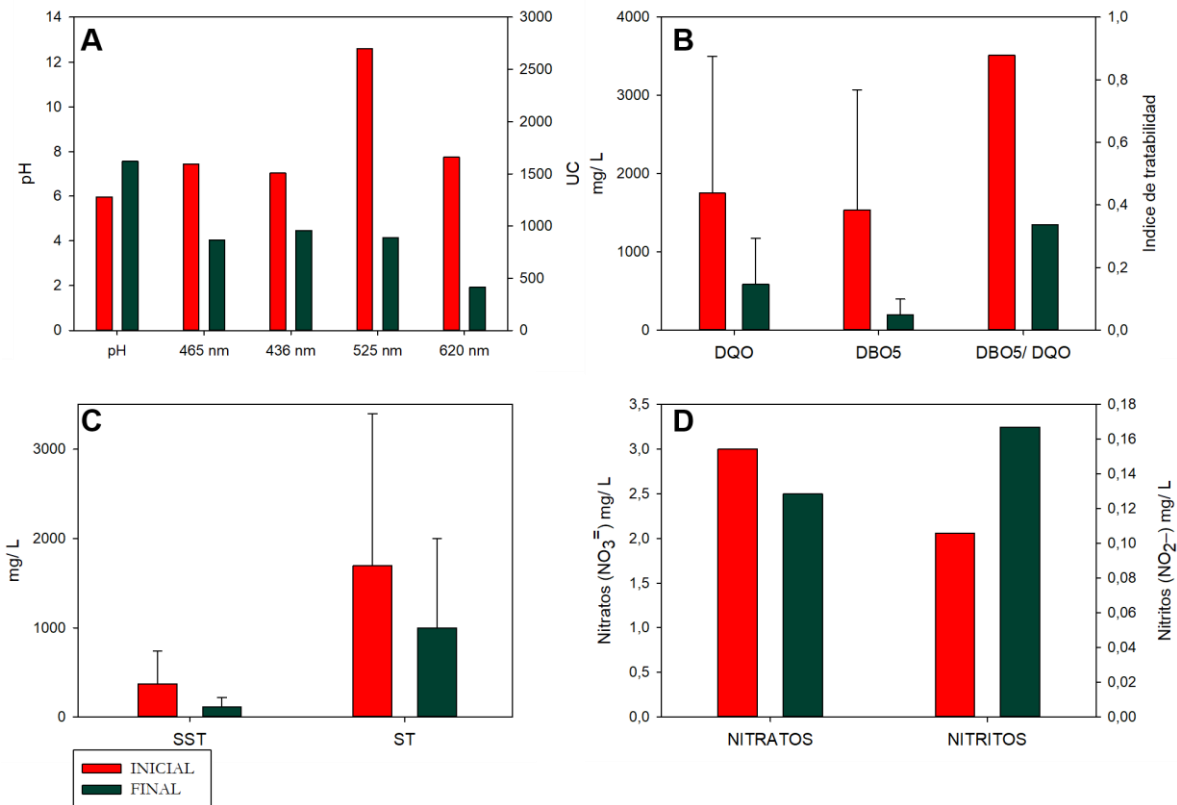


Figura 21. Gráficas de barras de los parámetros iniciales y finales evaluados del segundo ciclo en la planta de tratamiento piloto de la facultad de ciencias. pH y unidades de color (UC) a 465, 436, 525 y 620 nm (A). Demanda biológica de oxígeno (DBO₅), demanda química de oxígeno (DQO) y relación de tratabilidad, DBO₅/DQO (B). Sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos totales (ST) evaluados en la planta piloto (C). Nitratos y nitritos (D). Promedio de tres replicas.

7.4 Tratamiento terciario en planta

Para conectar el tratamiento terciario a la planta y estudiar el desempeño de las algas bajo condiciones de mixotrofia. Se utilizaron dos tipos de efluentes, el obtenido en el ciclo dos por la acción del consorcio fúngica/bacteriano y el producido por una modificación de la planta de tratamiento. Que consistió en emplear como lodo biológico células de *Pichia pastoris* inmovilizadas en alginato de sodio y que producen lacasa recombinante de *P. ostreatus* [Hernández et al., 2019]. El agua pos-tratada obtenida del segundo ciclo del tratamiento, se utilizó para realizar la primera cinética de remoción en reactor fototrófico bajo condiciones estériles. Para la segunda cinética se empleó el segundo tipo de efluente pero no se realizó bajo condiciones estériles. En la tabla **tabla 12** se presentan los valores de entrada y salida para cada cinética y posteriormente se presentará con más detalle lo que ocurrió en cada una.

Tabla 12. Valores iniciales y finales del primer tratamiento y el control de los parámetros evaluados en el agua residual durante el tratamiento terciario operado en planta, y valores máximos permisibles de las resoluciones vigentes: 3957 de 2011 y 0631 de 2015.

Parámetro	Unidad	Afluente Cinética uno	Efluente Cinética uno	Afluente Cinética dos	Efluente Cinética dos	Resolución 3957 de 2009	Resolución 0631 de 2015
Peso seco							
Microalgas	mg/L	1266.7	1600	900	1600	No aplica	No aplica
Recuento en cámara microalgas	Microalgas/mL	9.67 x10 ⁵	6.2 x10 ⁶	2.06 x10 ⁶	2.93 x10 ⁷	No aplica	No aplica
Sólidos suspendidos	mg/L	32.3	249.95	66.7	266.67	600	50
DQO	mg/L	416.67	40	300	105	800	150
COT	mg/ L	-	-	10	8.8	No aplica	No aplica
pH	-	7.1	7.6	7.06	7.03	5-9	6-9
Nitratos (NO ₃ ⁼)	mg/ L	0.9	3.5	4.25	6.6	No aplica	Análisis y reporte
Nitritos (NO ₂ ⁻)	mg/ L	0.048	1.103	0.0605	2	No aplica	Análisis y reporte
Ortofosfatos (PO ₄ ³⁻)	mg/ L	15.727	14.940	-	-	No aplica	Análisis y reporte
436 nm		450.8	284.1	189.4	185.6		Análisis y reporte
525 nm		375	185.6	132.6	85.1		Análisis y reporte

Unidad es de color	620 nm UC	147.7	87.1	90.9	60.6	No aplica	Análisis y reporte
	465 nm*	380.4	234.8	159.1	136.4	No aplica	
	515 nm**	477.3	200.8	-	-	No aplica	
	449 nm**	-	-	409.1	162.9	No aplica	

*Longitud de onda en que la mayoría de los lotes trabajados en el laboratorio de ambiental han demostrado el pico de absorción más alto. **Pico de adsorción más alto de los lotes utilizados en este trabajo (Figura 22).

7.4.1 Tratamiento terciario con ARnD/ TB estéril o cinética numero uno

Para cada cinética se realizó un barrido UV/VIS desde 250 nm hasta 750 nm, en el rango de luz visible, se encontro que en la cinética habian compuestos que absorbieron a 515 nm (500 UC). Esta señal disminuyó desde el día tres y se mantuvo relativamente constante hasta el día 15, para obtener un 59.85 % de remoción en el efluente (Figura 22A). Adicionalmente, en el día 6 se observó un pico de absorción a 698 nm.

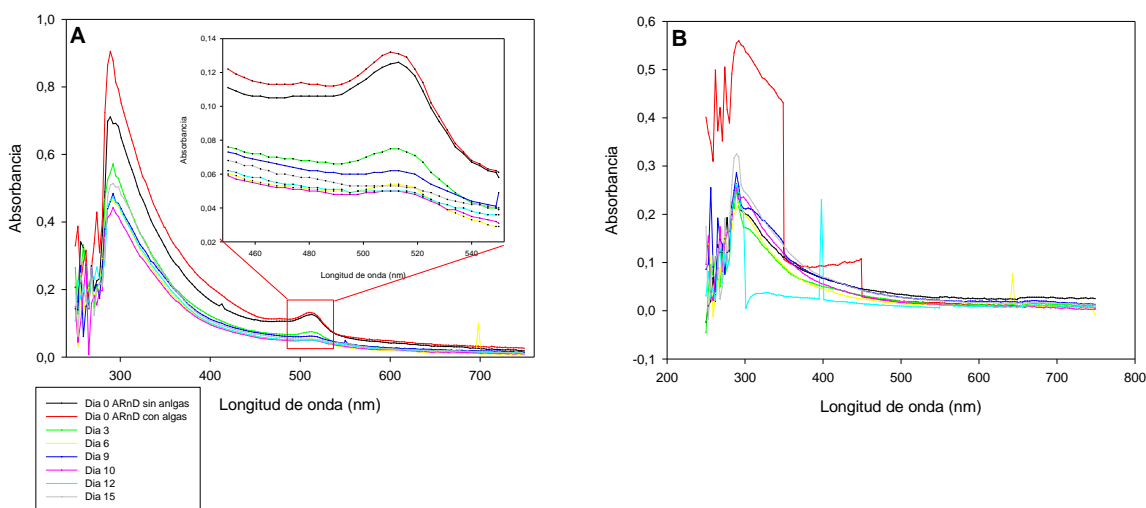


Figura 22. Curvas espectrales del tratamiento terciario en planta piloto. Cinética uno (A). Cinética dos (B).

En la cinética se observó que la concentración de DQO disminuyó en función del tiempo para obtener un 90 % de remoción a los 15 días (416.7 mg/L iniciales) (Figura 23A) cumpliendo con

la resolución 0631 del 2015 (**Tabla 12**), también se evidencio que en el día 0, después de adicionar el inóculo algal, se evidencio una remoción de la DQO del 10 %. Por otro lado, se conoce que los valores son más elevados siguiendo esta prioridad: $DQO > DBO_5 > COT$ aunque no se hayan medido estos últimos dos parámetros se sabe que su valor es menor. Debido a que la DQO mide todos los compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en el agua residual susceptibles a ser oxidados, teniendo en cuenta esto, la DBO_5 solo mide el oxígeno requerido por los organismos en sus procesos metabólicos al consumir la materia orgánica presente en las aguas residuales, representando un 50-60 % de la DQO y; el COT la cantidad de carbono unido a compuestos de tipo orgánico, representa un 10-30 % de DBO_5 . Es decir, teóricamente la DBO_5 presenta valores finales de 22 mg/L y el COT de 4.4 mg/L.

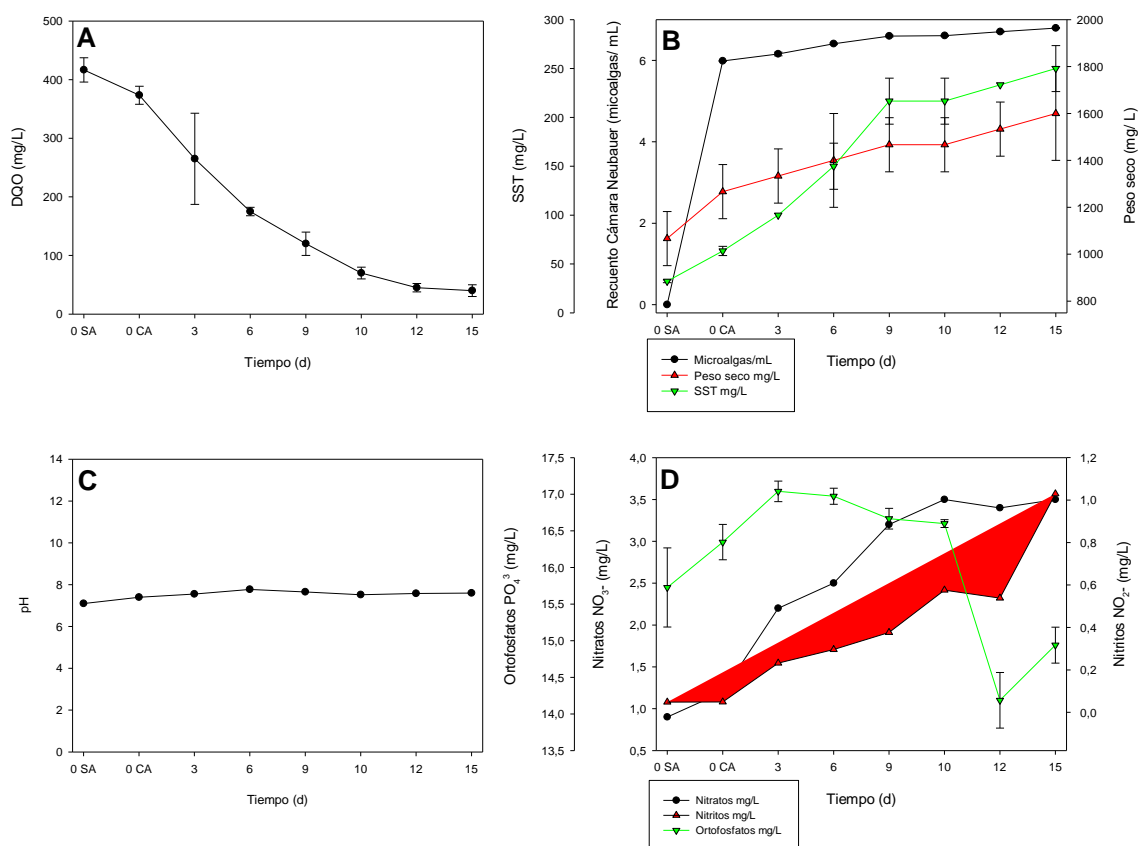


Figura 23. Primera cinética de microalgas realizada durante 15 días, con ARnD/ TB estéril. DQO en función del tiempo (A). Recuento de microalgas en cámara de Neubauer, peso seco de microalgas y sólidos suspendidos totales en función del tiempo (B). pH en función del tiempo (C). Nutrientes evaluados en el ARnD/ TB, nitratos (NO_3^-), nitritos (NO_2^-) y ortofosfatos (PO_4^{3-}) en función del tiempo (D). Donde 0SA es: muestra

tomada en el día 0 sin el inóculo de las algas; y OCA e: muestra tomada el día 0 con el inóculo de las algas. Promedio de tres replicas Promedio de tres replicas.

Otro parámetro químico fue el pH, se mantuvo neutro dentro de un rango de 7.1 y 7.6 (**Figura 23C**), pH optimo para el crecimiento algal.

Finalmente, dentro de los nutrientes monitoreados los nitratos y nitritos aumentaron su concentración inicial (0.9 y 0.048 mg/ L) 3.8 y 21.46 veces respectivamente. Sin embargo, los ortofosfatos si disminuyeron pero solo hubo un 5.01 % de remoción (15.727 mg/L) después de 15 días de tratamiento terciario con microalgas (**Figura 23D**).

Para estimar el crecimiento de las microalgas en el reactor fototrófico se realizaron recuentos y determinación de peso seco total. Para la cinética el recuento de microalgas aumento 6.4 veces durante 15 días de tratamiento y las bacterias 4.05 veces, ya que los valores iniciales fueron de 9.7×10^5 y 6.2×10^6 . Estos resultados indicaron que las microalgas podrían interactuar con otros microorganismos y posiblemente por este motivo no se ve afectada la eficiencia de remoción. Por el contrario se podría potencializar. En relación con el peso seco total los valores iniciales y finales fueron 1266.7 y 1600 mg/ L, demostrando un incremento en el peso que se relaciona directamente con el recuento y crecimiento (**Tabla 13 y Figura 23B**).

Tabla 13. Promedio de los recuentos iniciales y finales de las bacterias presentes en ambas cinéticas, con su respectiva desviación estándar y coeficiente de variación.

		Promedio (Log ₁₀)	Desviación	Coeficiente de variación
Cinética 1	Inicial	3.03	0.065	2.15
	Final	3.7	0.021	0.58
Cinética 2	Inicial	6.02	0.006	0.097
	Final	7.1	0.12	1.8

7.4.2 Tratamiento terciario con ARnD no estéril o cinética numero dos

En cinética número dos, se quiso evaluar las interacciones microbianas entre las microalgas y las bacterias propias del agua o por *Pichia pastoris* utilizada en el tratamiento secundario. Esto con el fin de conocer si se favorecería la remoción de contaminantes y nutrientes del agua.

La cinética dos donde se evidenció que el mayor pico de absorción fue a 449 nm (409.1 UC) en el día 0 pero después de añadirle el inóculo algal, se determinó que a los 12 días la disminución fue del 60.2 % (**Figura 22B**). Por otro lado, únicamente en el día 6 y 12 se observan picos de absorción diferentes, que se leen a 643 nm y a 398 nm.

Se observó que la concentración de la DQO disminuye un 65 % en el día 15, sin embargo, al decimo día disminuye hasta un 70 % (92 mg/L finales) (**Figura 24A**). Cumpliendo con los valores límites establecidos en la resolución 0631 del 2015, el cual establece que debe ser menor a 150 mg/L (**Tabla 12**). Otro parámetro que está estrechamente relacionado es el COT que logra un porcentaje de remoción del 12 % (10 mg/L iniciales) después de 15 días en el reactor fototrofo, sin embargo, presenta el mismo comportamiento de la DQO, el mayor porcentaje de remoción de este parámetro es en el decimo día con un 42 % de remoción, su concentración final fue de 5.8 mg/L (**Figura 24A**).

Muchos de los diferentes procesos que llevan a cabo las microalgas para la disminución de los parámetros que definen el nivel de contaminación en aguas están conectados con el pH. Este fue constante y no se evidenciaron grandes variaciones ya que se mantuvo de 7.06-7.5 (**Figura 24C**).

Dentro de los nutrientes monitoreados, solo se evaluaron los nitratos y nitritos con concentraciones iniciales de 4.3 y 0.06 mg/L respectivamente y estos aumentaron 1.54 y 33.06 veces respectivamente, durante 15 días de tratamiento (**Figura 24D**). Sin embargo, en el tercer día se evidencia una disminución de nitratos que eventualmente generó un aumento de nitritos en la muestra, como respuesta a procesos de denitrificación.

En la cinética dos el recuento de microalgas y bacterias aumentó 15.72 y 11.9 veces respectivamente después de 15 días en los que la planta se monitoreó (**Tabla 13, Figura 24B**).

Adicionalmente predominó la cantidad de microalgas sobre las bacterias después de 15 días de tratamiento, pero por una mínima diferencia, 2.97×10^7 microalgas/ mL y 1.25×10^7 UFC/ mL respectivamente (Tabla 13 y Figura 24B).

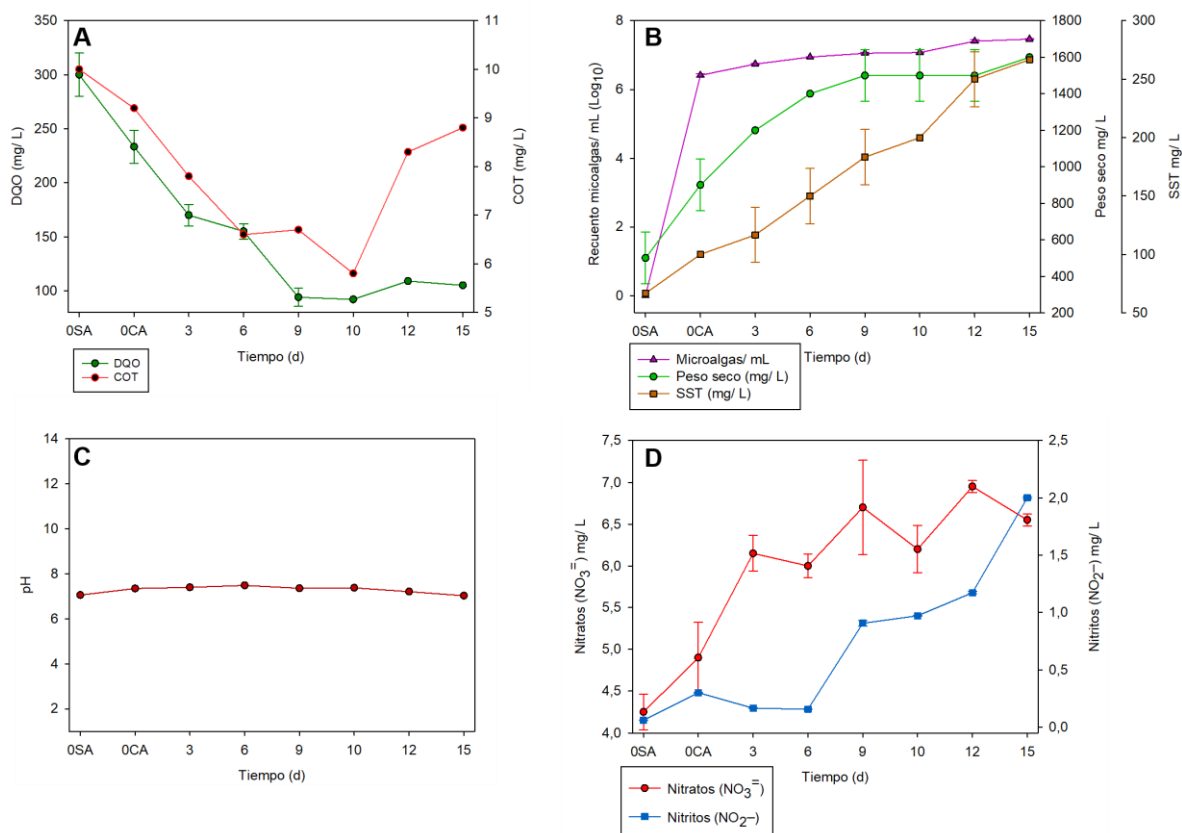


Figura 24. Segunda cinética de microalgas realizada durante 15 días, con ARnD/ TB no estéril. DQO en función del tiempo (A). Recuento de microalgas en cámara de Neubauer, peso seco de microalgas y SST en función del tiempo (B). pH en función del tiempo (C). Nutrientes evaluados en el ARnD, nitratos (NO₃⁻) y nitritos (NO₂⁻) en función del tiempo (D). Donde 0SA es: muestra tomada en el día 0 sin el inóculo de las algas; y 0CA es: muestra tomada el día 0 con el inóculo de las algas. Promedio de tres replicas.

Al comparar la cinética uno y dos se encontró que hubo mayor efectividad relacionada en la remoción de parámetros como la DQO al día 15 en la cinética uno que en la dos. Pero en ninguno hubo una remoción de nitratos y nitritos, y la remoción de ortofosfatos fue baja.

Finalmente, los valores finales de nitratos si alcanzan a entrar dentro de los límites establecidos por la EPA (10 mg/ L) para ambas cinéticas (3.5 y 6.6 mg/L respectivamente), sin embargo, los nitritos de la segunda cinética con valores finales de 2 mg/L superan por el doble el límite para

no generar un riesgo ambiental (1 mg/L), sin embargo, en el decimo día igual que muchos parámetros evaluados en la segunda cinética, los nitritos presentar concentraciones mas bajas (0.972 mg/L) y logran cumplir con los valores establecidos por la EPA, lo que coincide con el número de días optimos propuestos por Rengel en el año 2018. Por otro lado, los ortofosfatos medidos en la primera cinética (14.9 mg/L) están por debajo de la concentración máxima establecida por la FAO (25 mg/L). Para concluir, el objetivo del tratamiento en planta también fue recuperar residuo sólido algal, donde hubo mayor cantidad de microalgas finales fue en la cinética dos con 2.97×10^7 microalgas/ mL.

7.5 Biochar

El biochar se compone de los residuos sólidos provenientes del tratamiento secundario y terciario en planta, adicionalmente de la corteza de pino como material vegetal rico en carbono altamente lignificado para darle mayor estructura y disminuir humedad. Se realizo una caracterización química de la materia prima, dentro de los parámetros evaluados se encontro que el porcentaje de humedad de cada uno fue de 10.4 %, 98.8 %, 94.3 %, 96.7 % para la corteza, las microalgas, las perlas de alginato y el lodo fúngico bacteriano respectivamente, donde los valores mas altos se le atribuyen a los residuos sólidos derivados del tratamiento en planta de aguas residuales y el mas bajo a la corteza de pino.

Por otro lado, el porcentaje de carbono orgánico total más bajo fue el de las microalgas, con un porcentaje del 6.9 %, el de las perlas de alginato, el lodo fúngico-bacteriano y la corteza de pino correspondio a valores del 47.7 %, 41.9 % y 28.5 % respectivamente, la diferencia de estos valores puede estar altamente relacionado a la naturaleza química de cada una de las materia prima. El porcentaje de materia orgánica (MO) reflejo el mismo comportamiento del COT, ya que este ultimo mide el carbono unido a compuestos orgánicos presentes en las microalgas, perlas, el lodo y finalmente la corteza de pino. El % de MO presento valores de 12 %, 82.3 %, 72.3 % y 74.4 % respectivamente (**Tabla 14**).

Tabla 14. Caracterización de la materia prima del biochar.

Parámetro	Algas	Perlas	Lodo	Corteza
-----------	-------	--------	------	---------

Humedad (%)	98.8	94.3	96.7	10.4
COT (%)	6.9	47.7	41.9	28.5
MO (%)	12	82.3	72.3	74.4
pH	7.3	7.4	7,9	6.7

Finalmete el pH estuvo muy cerca de la neutralidad (6.7-7.4) para la corteza de pino, las algas y las perlas de alginato, el pH más alto fue el del lodo fungico bacteriano, pH: 8, estos valores son muy parecidos a los reportados anteriormente en el tratamiento secundario realizado en el segundo objetivo con el consorcio de hongos y bacterias y el del tratamiento terciario realizado en el tercer objetivo con microalgas (**Tabla 14**).

Adicionalmente, se caracterizo la mezcla de todas las materias primas, caracterizadas anteriormente, antes (MxH) y después (MxS) de secarla a 90 °C durante 24 horas, el porcentaje de humedad fue de 76.5 y 9.4 % respectivamente, pues en la etapa de secado de la pirolisis el material comienza a perder agua (**Tabla 15**).

Por otro lado, el porcentaje de COT y MO en ambas mezclas tuvieron valores muy cercanos, para MxH y MxS fue de 36.7 y 38.3 % de COT y 64.8 y 67.2 % de MO respectivamente. Adicionalmente, a estas muestras se le determinó el porcentaje FV, CF y cenizas el primero corresponde a la fracción del carbono que se volatiliza facilmente en contacto con el oxigeno, el carbono fijo (CF) como su nombre lo dice, es la fracción del carbono que queda fija a la muestra, y por ultimo el % de cenizas representa el residuo que queda en la muestra después de un proceso de combustión, para MxH los valores obtenidos fueron del 85.3, 0.74 y 14 % y para MxS es de 72.9 , 9.7 y 17.4 % respectivamente. Lo que refleja que la reducción de agua en la muestra provoca un aumento en la cantidad de carbono fijo, cenizas, COT y MO, pero disminuye el porcentaje de fracción volátil en la mezcla (**Tabla 15**).

Finalmente, el pH fue menor a 7 en la mezcla a pesar que cada materia prima por separado presento valores de pH superior a 6.7. La MxH obtuvo un valor de pH: 6.4 y para la MxS fue de 5.8. Y la conductividad fue mayor en la MxS (0.53 mS) que en la MxH (0.017 mS) (**Tabla 15**).

Tabla 15. Caracterización material crudo y biochar.

Parámetro	Material crudo	Material crudo	B300	B500	B700
	húmedo (MxH)	seco (MxS)			
Humedad (%)	76.5	9.4	6.2	4.2	1.6
COT (%)	36.7	38.3	26	52.1	42.3
MO (%)	64.8	67.2	44.9	89.8	72.9
CF (%)	0.74	9.7	27.3	25.9	24.8
FV (%)	85.3	72.9	59.2	54.6	52.8
Cenizas	14	17.4	13.5	20.0	22.5
pH (%)	6.4	5.8	5.0	6.4	7.7
Conductividad	0.017	0.53	0.13	0.014	6.44
Rendimiento en biochar	-	-	62.11	46.3	31.6
Rendimiento en CF	-	-	19.5	14.2	10.5

Después de la caracterización de la mezcla y secarla, se produjo biochar a tres diferentes temperaturas: 300, 500 y 700 °C. Dentro de los parámetros evaluados, la humedad presento valores descendentes con el aumento de la temperatura de pirólisis, ya que a 300, 500 y 700 °C los valores registrados fueron 6.2, 4.2 y 1.6 % respectivamente (**Tabla 15**).

El % COT de B300 fue de 26 % el cual según la clasificación del biochar se encuentra en clase III al encontrarse entre valores de ≥ 10 % y < 30 %, y los de B500 y B700 estan dentro de la clase II porque se encuentra entre valores de ≥ 30 % y < 60 %. Por otro lado, los porcentajes de MO fueron de 44.9, 89.8 y 72.9 % para los biochar de 300, 500 y 700 °C respectivamente.

Con respecto a él % de FV y CF hubo una disminución de estos a medida que incrementaba la temperatura, el % de FV fue de 59.2, 54.8 y 52.3 para el B300, B500 y B700, el % de CF fue de 27.3, 25.9 y 24.8 para B300, B500 y B700 respectivamente. Por el contrario, en el % de cenizas se obtuvieron valores ascendentes con el aumento de la temperatura, $300 < 500 < 700$ °C, con valores de 13.5, 20 y 22.3 % (Tabla 15).

Otra característica de tipo químico del biochar fue el pH y la conductividad. El pH disminuyo con el aumento de la temperatura: a 300 °C fue ácido, pH: 5; a 500 °C fue de 6.4; y por último a

700 °C fue de 7.7. La conductividad fue muy alta a 700 °C (6.4 mS) y bajas a 300 y 500 °C (0.13 y 0.014 mS)

Con respecto al rendimiento, tanto en biochar como en carbono fijo fue mayor a bajas temperaturas y disminuyó a medida que se aumentaba la temperatura de pirólisis del biochar. Es decir, a 300, 500 y 700 °C se obtuvieron rendimientos de biochar del 62.1, 46.3 y 31.6 % respectivamente, de igual forma en rendimiento de carbono fijo con valores de 19.5, 14.22 y 10.5 % para 300, 500 y 700 °C respectivamente (**Figura 25 y Tabla 15**).

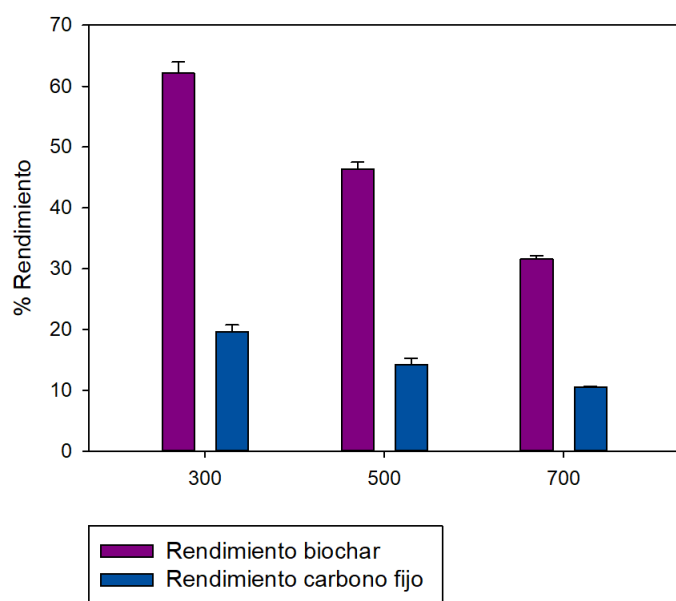


Figura 25. Rendimiento en biochar y carbono fijo de los biochar a las diferentes temperaturas evaluadas.

7.5.1 Microscopia Electronica de Barrido (SEM)

Se realizó microscopia electrónica de barrido de los productos obtenidos en el tratamiento termoquímico a diferentes temperaturas (**Figura 26**). Se evidencia diferencias en las estructuras presentes en el producto siendo a 700 °C donde la conformación del material se presenta mayor estabilizado (**Figura 26D**). Por otro lado, en la mezcla que no ha sido sometida al tratamiento termoquímico (**Figura 26A**) se puede observar la presencia del logo fúngico bacteriano por la presencia de hifas y esporas, las microalgas las cuales se observan esféricas con tamaños cercanos

a 2 μm , las perlas de alginato y el material llenante que en mayor proporción lo conforma, corteza de pino.

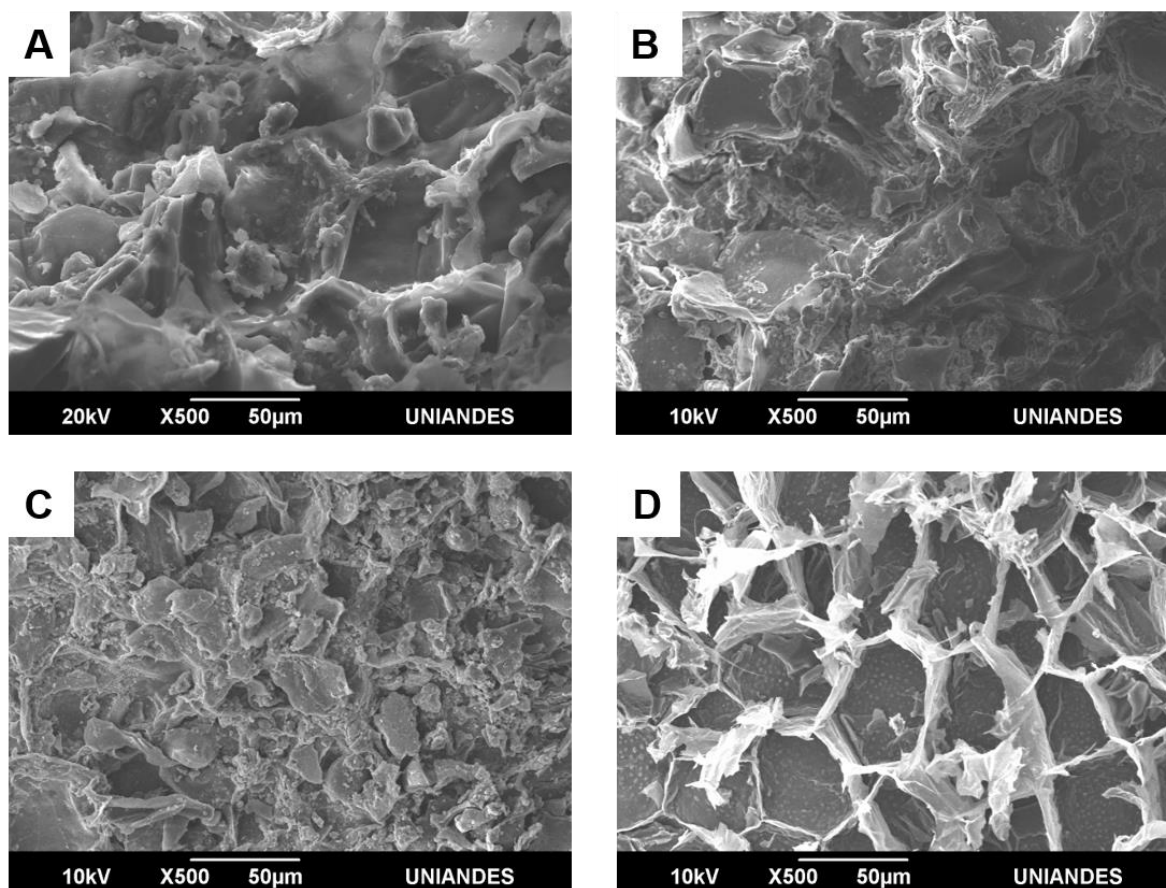


Figura 26. Microscopía electrónica de barrido. Mezcla de los residuos sólidos derivados de la planta piloto y la corteza de pino (A). Biochar 300 °C (B). Biochar 500 °C (C). Biochar a 700 °C (D).

8. DISCUSION.

8.1 Aislamiento de microalgas

Los sedimentos y los suelos contienen una extraordinaria abundancia y diversidad de microorganismos, la estructura de una comunidad microbiana está dada por diferentes factores ambientales, procesos evolutivos y procesos neutros o estocásticos. Estos sedimentos son utilizados como materia orgánica para establecer comunidades dentro de las columnas de Winogradsky, donde la actividad microbiana y los procesos abióticos dan lugar a gradientes químicos y ambientales desde la superficie al interior de las columnas, generando diversos nichos

para el crecimiento microbiano [Esteban et al., 2015]. Las microalgas al ser fototróficas y aerobias se encuentran en el estrato superior de la columna y según un estudio realizado por Sushma Gurumayum & Sushree Sangita, los cambios en la columna de Winogradsky empiezan alrededor del séptimo día de incubación, con crecimiento algal en la capa de agua superior, así como en los lados de la columna, como un biofilm, y a medida que aumenta el número de días de incubación, también se ve una capa de crecimiento en la superficie del suelo por presencia de microalgas.

Con el tiempo la comunidad algal presente en las columnas de Winogradsky diverge de la comunidad presente en el sedimento inicial cuando las condiciones ambientales son óptimas para el crecimiento de una especie particular de algas, la proliferación tiene lugar para producir floraciones algales [Babel et al., 2002]. Siendo en este estudio los géneros de *Chlorella* sp., *Chlorococcum* sp. y *Achnantheidium* sp. los que prevalecieron en función del tiempo, desde los 3 hasta los 12 meses de estabilización, véase **figura 15**.

Las comunidades de diatomeas son afectadas significativamente por variables ambientales, por este motivo son utilizadas como indicadores de nutrientes, salinidad y carbono orgánico e inorgánico disuelto en aguas. *Achnantheidium* sp. es una diatomea considerada ubicua, ha sido reportada en aguas alcalinas, ácidas, oligotróficas e hipertróficas y especies como *Achnantheidium minutissimum* a menudo referida como tolerante a varios tipos de estresores ambientales (alteraciones hidrológicas, pH bajo y metales pesados) [Ponader et al., 2007; Potapova et al., 2007; Schonfelder et al., 2002; Bondoc et al., 2006]. Incluso es considerada como indicadora en aguas pobres de nutrientes considerando que a medida que aumenta el tiempo de estabilización en las columnas disminuye la cantidad de nutrientes y minerales como: K, Ca, Mg, Fe, Cu y Mn, que son micronutrientes esenciales para el crecimiento y metabolismo algal, generando un carácter selectivo para el crecimiento de esta microalga diatomea [Li et al., 2011].

En otras palabras, el uso de diatomeas permite conocer de forma indirecta el estado de la muestra utilizada como sedimento en la columna de Winogradsky. Géneros como *Nitzschia* sp. y *Navicula* sp. son buenos indicadores de alta cantidad de fósforo y condiciones de nitrógeno bajo, ambas de manera independiente evidenciadas en los 3 diferentes tiempos de estabilización. Además, las concentraciones de nutrientes alteran indirectamente la composición de las comunidades de

diatomeas al aumentar la competencia con otros grupos de microalgas, como las clorófitas [Jennifer et al., 2000], predominando la presencia de clorófitas sobre el de diatomeas (Figura 15).

Por otro lado, con respecto a las microalgas clorófitas, su crecimiento por encima de las diatomeas coincide con un experimento realizado por Babcsányi y colaboradores en el año 2017, donde reportan 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. Adicionalmente se ha reportado la alelopatía algal, un efecto dañino directo o indirecto de una especie sobre otra a través de la producción de químicos liberados en el medio ambiente, donde *Chlorella vulgaris* tiene la capacidad de producir una mezcla de grasas e hidrocarburos (clorelina) que exhiben actividad antibiótica, inhibiendo el crecimiento de *Nitzschia* sp., mientras que estimula el crecimiento *Scenedesmus* sp. [Fergola et al., 2007]. Este comportamiento podría explicar la sucesión de especies en la columna, como se demostró en las columnas de 3 y 9 meses de estabilización con presencia de *Nitzschia* sp, pero su ausencia en las de 12 meses.

Las clorófitas al ser ubicuas y poseer la capacidad de crecer en diversos hábitats acuáticos y terrestres, así como en cualquier superficie que contenga humedad, incluyendo la corteza de un árbol, piedras, paredes de yeso o vidrio, etc [Klochkova et al., 2006]. En la columna de Winogradsky a medida que pasa el tiempo tanto la materia orgánica como el agua disminuyen y se evidencia un sedimento altamente seco y compacto que impide el crecimiento de diferentes microorganismos, afectando directamente la biodiversidad microbiana presente en la columna. Microalgas del género *Chlorococcum* sp. tienen la capacidad de tolerar condiciones de estrés ambiental, como la salinidad y la resistencia a sequías gracias a la presencia de protoplastos altamente viscosos, y se ha reportado en especies como *Chlorococcum hypnosporum* el desarrollo de hipnosporas e hipnozygotes, la estructura de la pared celular podría haber contribuido a la resistencia a las superficies con bajo contenido de humedad, lo que le confiere la capacidad para sobrevivir en condiciones de oscuridad y sequía por más de 5 años y en contacto nuevamente con agua dulce poder recuperar su actividad biológica. [Klochkova et al., 2006].

Según un estudio realizado por Pagaling y colaboradores en el 2017 donde hicieron un análisis basado en el índice de diversidad de Shannon mostró que la riqueza y la uniformidad de los grupos presente en la columna de Winogradsky de 16 semanas fueron más altas que las de los microcosmos de 8 semanas, lo que indica que hubo cierta recuperación de la diversidad en las etapas posteriores del desarrollo comunitario, este comportamiento puede explicar el aumento de diatomeas en los 9 meses de estabilización. Sin embargo, otro estudio realizado por Esteban y colaboradores en el año 2015 demostró que los cambios en las columnas inician rápidamente y se desaceleran, pero que jamás se establecieron las comunidades microbianas durante un periodo 248 días (8 meses). Dentro de los cambios en la abundancia de miembros de la comunidad microbiana es probable que implique una combinación de efectos deterministas de nicho, como la competencia y selección de hábitat, y procesos estocásticos, como tasas de crecimiento, tasas de mortalidad o dispersión. Además, el entorno cambiante puede dar como resultado condiciones menos favorables para los organismos inicialmente altamente activos y permitir que los organismos de crecimiento más lento aumenten en abundancia [Esteban et al., 2015].

Finalmente, 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, con la liberación concomitante de metales unidos a los sedimentos [Babcsányi et al., 2017]. Estos metales pueden ser tóxicos para algunos géneros de algas mientras que algunas microalgas producen péptidos capaces de unirse a metales pesados, evitando y neutralizando su efecto tóxico. Las microalgas del género *Chlorella* poseen mayor resistencia a estos metales, la cual esta relacionada con su gran área de superficie y alta afinidad de unión a la pared celular [Perales et al., 2006; Jaafari et al., 2019; Christenson et al., 2011]. También hay que considerar que la diversidad y cantidad de algas que se encuentran en una columna de Winogradsky está determinada por la muestra de sedimento utilizado, y las muestras utilizadas para la elaboración de las columnas provienen de diferentes lugares (Figura 15).

8.2 Pruebas de tolerancia

Los efluentes del tratamiento secundario en planta contienen colorantes que inducen un color persistente junto con una alta carga de materia orgánica (**Tabla 6**) que afectan el equilibrio simbiótico ecológico de la corriente de agua receptora y se consideran variables en sus características debido a la variación en cantidad y tipo de colorante. Las microalgas utilizan estos colorantes como alimento para su crecimiento, y la degradación de los colorantes se lleva a cabo a través de tres mecanismos, 1) asimilación del colorante, 2) transformación del colorante a productos intermediarios coloreados o transformación completa hasta CO₂ y H₂O, y finalmente, 3) la adsorción de cromóforos presentes en el ARnD/ TB [**Venkata et al., 2002; Holkar et al., 2016**].

Los mecanismos de adaptación de las microalgas frente a la exposición a ambientes no propios de su habita natural, puede provocar cambios genéticos causados por mutaciones espontaneas o una adaptación fisiológica. Estas mutaciones son a corto plazo y ocurren después de la exposición a un estrés agudo [**Osundeko et al., 2014**]. Especies como *Chlorella luteoviridis* y *Parachlorella bursii* fueron identificadas por Osundeko y colaboradores en el año 2013 como cepas nativas, naturalmente adaptadas a aguas residuales postratadas en tratamientos secundarios. Estas especies, como mecanismo de adaptación frente a tensiones ambientales desencadenan la excesiva formación y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) dentro de la célula microalgal, 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. Sin embargo, las microalgas son capaces de mediar en la defensa antioxidante a través de las actividades de varias enzimas eliminadoras de ROS, como la peroxidasa de ascorbato (APX), superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y peroxidasa (POD). Finalmente, otro mecanismo como respuesta al estrés oxidativo es el aumento del contenido de clorofila y carotenoides dentro de las células, estos pigmentos poseen propiedades antioxidantes y, por lo tanto, pueden sintetizarse en abundancia para hacer frente al estrés oxidativo [**Osundeko et al., 2013; Miazek et al., 2017**].

Dentro de las microalgas encontradas en las columnas de Winogradsky, las únicas que crecieron en el agar ARnD fueron las de la clase Chlorophyceae del género *Chlorella*. Lo que coincide con lo reportado por Wang y colaboradores en el año 2010 en el uso de *Chlorella* sp. por su eficacia en el tratamiento de aguas residuales, así como su capacidad para eliminar la DQO, fosforo y

nitrógeno con diferentes tiempos de retención. Adicionalmente, según lo reportado por Blair y colaboradores en el año 2014, el medio agarizado Bold estimula el crecimiento de *Chlorella* sp. previniendo el crecimiento de otros por lo que la población de *C. vulgaris* se incrementa en los cultivos.

Las pruebas de tolerancia reflejaron que *Chlorella* sp. poseía un metabolismo mixotrófico, debido a que asimilo simultáneamente sustratos orgánicos presentes en el agua residual e inorgánicos como el CO₂ mediante procesos respiratorios y fotosintéticos, que son la suma de un metabolismo fotoautótrofo y heterótrofo [Ji et al., 2015]. El control no poseía ninguna fuente de carbono en el medio de cultivo, por esta razón permitía el crecimiento de todas las microalgas de la clase Chlorophyceae. Sin embargo, al incubarlas en oscuridad y en un medio con ARnD/TB como única fuente de carbono, limito su desarrollo permitiendo solo el crecimiento de aquellas con metabolismo mixotrófico, como *Chlorella* sp.

Existen microalgas que son viables no cultivables, 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. Del mismo modo, este comportamiento podría explicar la inhibición de varios taxones de la clase Diatomea, lo que concuerda con un estudio realizado por Compton y colaboradores en el año 2011 donde la inhibición de *Achnanthes microcephala*, *Fragilaria capucina*, *Navicula seminulum*, *Nitzschia frustulum* var. *perminuta* y *synedra ulna* var. *Danica*, ocurre cuando se cultivan en condiciones artificiales debido a que reducen su tamaño e inhibe su crecimiento [Compton J. C., 2011]. Finalmente, su crecimiento está limitado por la disponibilidad de silicio el cual es necesario para la conformación de su pared celular, fenómeno que no sucede con las clorófitas, lo que pudo haber generado un carácter selectivo para el crecimiento de microalgas clorófitas [Bondoc et al., 2006; López et al., 2015].

Los resultados indicaron que a medida que se estabilizan las columnas, las microalgas crecieron y presentaron mayor tolerancia a concentraciones ascendentes de DQO, DBO₅, COT y UC. Estos resultados son opuestos a lo que se reporta en la literatura y podrían relacionarse con dos

teorías. La primera, las microalgas ya tenían activa la capacidad para crecer en autotrofia (control) y mixotrofia (concentraciones de efluente); ya que en las columnas originales se dan las dos condiciones (CO₂ gaseoso producto del metabolismo de heterotróficos y materia orgánica rica en carbono que se utiliza para formular las mezclas iniciadoras de las columnas). Sin embargo, las microalgas que provenía de las columnas con mayor tiempo de estabilización posiblemente tenían mayor tolerancia a cargas variables de materia orgánica y nutrientes, dado que llevaban mayor tiempo dentro de las columnas. La segunda teoría se relaciona con las concentraciones de iniciales de DQO, DBO₅, COT y color residual. En las columnas originales las concentraciones de estos parámetros muy seguramente eran más altas que las evaluadas en las pruebas de tolerancia. Por consiguiente, las microalgas ya estaban adaptadas a concentraciones altas y al ser cultivadas a concentraciones bajas el efecto que se pudo dar fue disminución del crecimiento por restricción de sustrato. Generando los recuentos más bajos.

Las hipótesis propuesta antes se confirman teóricamente teniendo en cuenta que, si la columna de Winogradsky es utilizada como un microcosmos para imitar tanto la diversidad microbiana como las relaciones ecológicas, es ampliamente utilizada in situ solo para el estudio del ciclaje de nutrientes llevado a cabo por los diferentes microorganismos, es decir, no es utilizada como un biofiltro para la degradación de contaminantes. Teniendo en cuenta esto, se puede afirmar que los compuestos orgánicos e inorgánicos persistirán en la columna a pasar el tiempo, no todas propias del sedimento sino de los productos intermedios generados a partir de la biodegradación de la materia orgánica, estas sustancias altamente susceptibles a ser oxidadas [Loss et al., 2013; Babcsányi et al, 2017; Rundell et al., 2014; Pagaling et al., 2017]. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la cantidad de materia orgánica si disminuirá a pasar el tiempo por los procesos de mineralización mediado por los microorganismos, pero jamás en grandes proporciones.

8.3 Operación planta

El consorcio fúngico bacteriano empleado en el tratamiento secundario en planta para llevar a cabo la degradación de colorantes poseía una amplia diversidad metabólica. Dentro de esta variedad de hongos, se encuentran los de pudrición blanca los cuales fueron utilizados en este estudio, como *Phanerochaete chrysosporium*, *Ganoderma lucidum*, *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus*,

siendo los de mayor interés debido a su capacidad de mineralizar y despolimerizar la lignina mediante la segregación de enzimas extracelulares. Las principales enzimas son: manganeso peroxidasa (MnP), E.C. 1.11.1.13, lignina peroxidasa (LiP), E.C. 1.11.1.14 y lacasas (Lac), E.C. 1.10.3.2, sin embargo, debido a su baja especificidad por sustrato, también pueden degradar una amplia gama de compuestos xenobióticos 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 [Zahmatkesh et al, 2017; Faraco et al, 2008].

Todos los microorganismos producen diferentes enzimas de actividad variada y en cantidades muy bajas que son únicamente utilizadas para sus procesos celulares (lipasas, proteasas, amilasas), muchas de estas producidas en la tropofase. Cuando las producen en muy altas concentraciones son excretadas al medio, y estas enzimas son capaces de consumir diferentes materiales poliméricos insolubles, por ejemplo, la conversión de ácidos carboxílicos en alcanos y alquenos por la enzima lipasa secretada por hongos. Sin embargo, no todas favorecen la actividad metabólica de otras enzimas de mayor importancia, las proteasas extracelulares producidas por hongos de pudrición blanca parecen ser importantes respecto a su impacto sobre la batería de enzimas lignocelulósicas, se ha informado que en especies como *P. chrysosporium* y *T. versicolor* la secreción de enzimas proteolíticas (proteasas) podría haber causado la baja estabilidad de las enzimas ligninolíticas producidas durante el cultivo [Arunprasath et al., 2019; Staszczak et al., 2000; Xiong et al., 2008].

Cabe resaltar que se utilizó un consorcio fúngico-bacteriano. Los hongos y las bacterias pueden trabajar sinérgicamente, donde se usaron los hongos para degradar los compuestos más recalcitrantes (colorantes), y las bacterias aerobias asociadas para degradar compuestos aromáticos o subproductos alifáticos de la biotransformación mediada por los hongos. Las bacterias liberan diversos sistemas enzimáticos como las monooxigenasas, dioxigenasas, tirosinasas, hexano-oxidasa y aminopirina N-desmetilasa [Pedroza-Camacho et al., 2018; Badia-Fabregat et al., 2017].

Al inicio del tratamiento el pH del ARnD/TB empezó ácido (pH 5.42), ocasionada por la mezcla de compuestos de carácter ácido presentes en el afluente, como el verde malaquita, el cristal

violeta y el Lugol cuyos valores de pH se encuentra entre 1-3, sin embargo, la presencia del colorante rojo Congo que es de carácter alcalino (pH 8.5) provoca que se estabilicen las cargas en la mezcla. Por otro lado, al final del tratamiento en el efluente el pH era 7.6. Este cambio en el potencial de hidrogeniones pudo deberse a que la degradación de los colorantes genera intermediarios como compuestos aromáticos y aminas que aumentan el pH [Gadekar & Ahammed, 2019; NCBI, 2017]. Por otro lado, la actividad de las enzimas está altamente influenciada por el pH, y para cada una varía ampliamente. Se ha informado que la enzima LiP tiene un rango óptimo de pH entre 2-5, la MnP es de 4 a 7, y para las lacasas varía desde 2 a 10 [Manayalan et al., 2014]. Esto sugiere que a pH 5 todas las enzimas pudieron haber tenido actividad enzimática, pero a pH > 5 la enzima LiP pudo haber estado inactiva ya que a pH neutro y básico presenta alta inestabilidad.

Estructuralmente, los tintes azoicos constan de tres componentes principales, un cromóforo formado por tres anillos aromáticos unidos entre sí por un enlace azo, un auxocromo que modifica la absorción de luz del cromóforo y un solubilizador. Los tintes azoicos se unen covalentemente a las fibras celulósicas y, por lo tanto, pueden soportar cambios de temperatura, fricción y pH. Los grupos cromóforos presentes en el ARnD/TB, como azo (-N=N-), carbonilo (-C=O-), nitro (-N=O-), quinoides y grupos auxocromos como amina, carboxilo, sulfonato e hidroxilo son los responsables de proporcionarle la carga eléctrica a la molécula y la coloración en el agua [Holkar et al, 2016; Blanco-Vargas et al., 2018]. Las enzimas ligninolíticas pueden dividir los enlaces azo (N = N) modificando los grupos cromóforos y, por lo tanto, cambiando la absorción visible del espectro, comportamiento que se evidencia en la **figura 20A**, donde compuesto que se lee en el segundo día a 620 nm, en el tercer día se lee a 435 nm por la transformación de un compuesto aromático a uno alifático. Posteriormente, los subproductos pueden ser oxidados, reducidos, desmetilados e hidroxilados, produciendo benceno o quinonas sustituidas [Blanco-Vargas et al., 2018].

Los procesos asociados a la disminución del color es la biosorción por medio de microorganismos, donde interactúan las formas iónicas del colorante en solución y la carga eléctrica superficial de la biomasa, este mecanismo depende del pH de la solución. Los tintes son compuestos orgánicos complejos que poseen diferentes anillos aromáticos y grupos funcionales; estos últimos tienen diferentes potenciales de ionización a diferentes pH y, por lo tanto, su

interacción con la biomasa microbiana depende de la química de un tinte particular y de la naturaleza química del biosorbente. La pared celular fúngica está compuesta por polisacáridos (es decir, quitina y quitosana), proteínas, lípidos y melanina con varios grupos funcionales (como los grupos amino, carboxilo, tiol y fosfato) capaces de unirse a las moléculas de colorante.

Los valores de pH observados en los 9 días de tratamiento oscilan de 5-7, para explicar mejor el comportamiento que pudo haber sucedido en el biorreactor se tiene que, a un pH bajo (pH <6.0), la carga total de la superficie en los sitios activos se vuelve positiva. Por lo tanto, la interacción electrostática aumenta entre los grupos cargados negativamente en las moléculas de tinte y el adsorbente cargado positivamente. El aumento en los valores de pH (pH > 6) generalmente resulta en el cambio de la carga superficial en el biosorbente. A valores altos de pH, la repulsión electrostática aumenta debido a la reducción de la densidad de carga positiva en el biosorbente, lo que conduce a una disminución en la capacidad de biosorción del tinte **[Bayramoğ et al., 2006; Djafer et al., 2016]**.

Adicionalmente, estos microorganismos son capaces de retener los colorantes en su biomasa mediante mecanismos de precipitación, atrapamiento en espacios interiores de la biomasa, fuerzas físicas y la formación de enlaces de hidrógeno **[Wanyonyi et al., 2017]**. Estos procesos pudieron haberse llevado a cabo en las primeras horas de contacto de la biomasa fúngica con el afluente, seguido por procesos de biotransformación mediado por el complejo enzimático involucrado, mencionado anteriormente. Otro factor de gran importancia es que al biorreactor se le adiciono el medio líquido de extracto salvado de trigo como cosustrato, el cual presenta fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo más fáciles de degradar por los microorganismos que los colorantes, bajo estas condiciones el consorcio fúngico-bacteriano pudo obtener nutrientes de fácil biodegradabilidad más rápido para apoyar el metabolismo primario **[Pedroza-Camacho et al., 2018]**. Los resultados obtenidos en la remoción de color coinciden con un estudio realizado por Faraco y colaboradores en el 2008 donde reportaron que *Phanerochaete chrysosporium* y *Pleurotus ostreatus* alcanzan una efectividad en la decoloración de aguas residuales con colorantes de tipo azo del 87 % y 60 % respectivamente durante 7 días de tratamiento.

La demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y la demanda química de oxígeno (DQO), se utilizan ampliamente como indicadores de la calidad del agua y según la normativa SDA y 0631 del 2015

no se logra cumplir los valores límites para su vertimiento. Al calcular la relación DBO_5/DQO en el primer ciclo, durante los nueve días de tratamiento, dieron valores >5 lo que considera la presencia de un alto contenido de materia orgánica biodegradable. Sin embargo, en el segundo ciclo el efluente presento una relación de 0.35 lo que indica un bajo contenido de materia orgánica biodegradable, por la presencia de compuestos complejos y persistentes que dificultan el tratamiento biológico [Yang et al., 2009; GilPavas et al., 2019] lo que también puede estar relacionado con que en el segundo ciclo en comparación con el primero, se encontró menor disminución en todos los parámetros evaluados. Estos compuestos pueden ser los productos intermedios de la biodegradación de colorantes, y se sugiere un tratamiento complementario como el uso de microalgas. Los resultados obtenidos en los porcentajes de remoción de DQO coinciden con los reportados por Blanco-Vargas y colaboradores en el 2009 quienes utilizaron enzimas ligninolíticas para biodegradar colorantes azoicos, obteniendo valores del 92 y 76 % para la remoción de DQO y DBO_5 respectivamente. Finalmente, el COT indica el grado de mineralización del agua, por consiguiente, es el más adecuado para determinar el contenido de materia orgánica, y puede ser más preciso que el DQO o el DBO al evaluar los compuestos orgánicos en un tratamiento de agua residual [Bustillo-Lecompte., 2014]. Adicionalmente, se ha reportado que con procesos de oxidación avanzada se obtiene mayor disminución del COT, Bilińska y colaboradores en el año 2016 utilizando este proceso lograron la remoción del 50 % del COT en un lapso de 60 minutos.

Conforme a lo mencionado anteriormente, se observó que los valores iniciales varían entre lotes (Tabla 9), lo que es consistente con lo reportado por Pedroza-Camacho y colaboradores en el 2018, Rojas en el 2018 y Hernández en el 2017. Al igual que lo reportado por estos autores, en el presente trabajo los resultados varían de acuerdo con el semestre, laboratorio y tipo de asignatura que se esté dictando. Sin embargo, lo que sí es común para los dos lotes es que la mayoría de los parámetros mencionados anteriormente están por fuera de la norma de vertimiento 0631 y la resolución 3957, determinando que ambos requieren tratamiento antes de ser vertidas. Por lo tanto, son excelente afluentes para realizar el tratamiento con el consorcio fúngico/bacteriano. Por otro lado, también se encontró que ambos lotes tenían el mismo máximo de absorción en las curvas espectrales, 550 nm en el afluente, la intensidad de la señal fue disminuyendo en el tiempo, lo que demuestra que se llevaron a cabo procesos de mineralización que pudieron haber estado mediado por enzimas y procesos de adsorción por

parte del consorcio usado en el reactor, anteriormente explicado. La intensidad de esta señal posiblemente corresponde a colorantes como fucsina básica o fenicada los cuales fueron reportadas por Hernández, 2017 en ARnD/TB con un máximo de absorción a 545 nm.

Con respecto a los SST, ST y SDT se sabe que el aumento de estos puede estar estrechamente relacionado a el aumento de la biomasa por parte del consorcio fúngico-bacteriano, así como a la presencia de contaminantes del agua, las variaciones de estos parámetros en los diferentes días de muestreo pueden ser debido a la no homogenización del reactor a la hora de extraer la muestra. El uso de operaciones unitarias secundarias después del tratamiento llevado a cabo por el consorcio favorece la disminución de los SST, ST, SDT **figura 20C**.

Después de nueve días de retención hidráulica en el biorreactor aerobio el agua se paso por dos unidades de tratamiento, un sedimentador (HTR:1hora) y filtros de arena cuarcítica y carbón activado. En el sedimentador, la velocidad de sedimentación de una sola partícula discreta, es decir aquella que no cambia de tamaño, forma y peso después de sufrir algún tratamiento, se deriva de las fuerzas que actúan sobre la partícula (fuerza gravitacional, fuerza de arrastre y fuerza de flotación). La velocidad de caída depende tanto de la densidad y viscosidad de el fluido, como de la densidad, forma, tamaño y textura superficial de la partícula **[Lizica-Simona, 2006]**. Teniendo en cuenta lo anterior, se encontró que mayor parte de la biomasa se sedimentó y fue la que se recirculo al biorreactor para el segundo ciclo, sin embargo, aun quedaron SST y SDT en el agua residual, por esta razón, el uso de filtros después de un tratamiento biológico secundario elimina cantidades sustanciales de partículas en las aguas residuales, se ha reportado que reducen los sólidos suspendidos a un nivel de 5-10 mg/ L, además de la remoción hasta un 65 % de la turbidez, un 60 % del color aparente y un 56 % DBO₅ y DQO, ocasionada por el área de superficie específica y la capacidad de adsorción del material filtrante **[Zipf et al., 2016; Hamoda et al., 2004]**.

El nitrógeno es esencial para todos los microorganismos en la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas, aminoácidos y compuestos metabólicos con alto valor energético. La remoción de nitrógeno presente en el agua residual requiere de procesos de nitrificación y desnitrificación, para que se lleve a cabo la oxido-reducción de amonio, nitrato y nitrito. En condiciones anaerobias las bacterias usan el nitrato como aceptor de electrones en los procesos de respiración

reduciéndolo de manera secuencial a nitrito **[Canfield et al., 2010]**, comportamiento que se evidencia en el sexto y noveno día de operación en planta, debido a que la disminución del nitrato va acompañada con un aumento en la concentración de nitrito. Esto sugiere que al utilizar un reactor aeróbico los procesos anaeróbicos se ven limitados. Sin embargo, a partir del tercer día se empieza a evidenciar la remoción de nitratos y nitritos, número de días que coincide con un estudio realizado por Iorhemen y colaboradores en el año 2018 donde la formación de gránulos aeróbicos empieza a desarrollarse a partir del tercer día de operación del reactor, con un tamaño 115 μm , con una estructura y tamaño rígido que permite el bloqueo de la entrada de aire por los poros. Otra manera de mejorar la remoción de nitratos y nitritos es acoplar un tratamiento terciario de microalgas, la cual ha sido ampliamente reportado por la eficiencia en la remoción de nutrientes.

Los gránulos aeróbicos exhiben una estructura en capas con una zona óxica cerca de la superficie del granulo, una zona anóxica en la capa media y una zona anaeróbica en el centro del granulo. Esta estructura estratificada proporciona condiciones adecuadas para la eliminación de sustancias orgánicas y nutrientes (nitrógeno y fósforo), incluso cuando el sistema se opera de forma totalmente aeróbica. Hay que tener en cuenta que el lodo utilizado estaba conformado por diferentes microorganismos, y generalmente, los organismos filamentosos (bacterias u hongos) crecen dentro de un flóculo, se fortalecen y se alargan en la solución circundante. Las bacterias se adhieren a las hifas de los hongos que favorecen el crecimiento de la bacteria en el biofilm granular suspendido **[Iorhemen et al., 2018; More et al., 2010]**.

Finalmente, se evaluó el aumento en la concentración de hongos y bacterias durante el procesamiento de la planta piloto debido a la biotransformación y al consumo de la materia orgánica. El recuento de hongos fue menor que el de las bacterias, estos resultados son comparables con un estudio realizado por Pedroza-Camacho y colaboradores en el año 2018 donde la concentración de los hongos tanto en el inicio como al final del proceso fue menor que el de las bacterias, 3.0 - 7.6 Log₁₀UFC / mL y 7.0 - 8.8 Log₁₀UFC / mL hongos y bacterias respectivamente. Las diferencias entre los recuentos totales de los dos microorganismos que forman el inóculo se explican por la presencia de menos compuestos complejos y más subproductos alifáticos de fácil degradación liberados por los hongos. Las bacterias pueden usar estos compuestos junto con la materia orgánica biodegradable que se encuentra en el ARnD

para crecer a un ritmo más rápido que los hongos. La producción de biomasa fúngica-bacteriana es muy importante en la valorización de residuos, ya que podría representar un producto de valor agregado [Pedroza-Camacho et al., 2018; Zerva et al., 2017].

8.4 Cinética con Microalgas o tratamiento terciario en reactor de 15 L

El efluente generado del tratamiento secundario se caracteriza por una alta DQO y DBO₅, lo que implica la presencia de materia orgánica recalcitrante. Las microalgas demuestran la capacidad de remediar los efluentes en concentraciones que comúnmente se encuentran en el tratamiento post-secundario, son, por lo tanto, consideradas como posibles candidatos para el tratamiento de aguas residuales terciaria, proporcionando dos beneficios, una producción simultánea de biomasa y el tratamiento de aguas residuales [Ajmi et al., 2018; Whitton et al., 2015; Ji et al., 2015].

Adicionalmente, en diversos estudios se ha reportado el uso de un paso previo de aclimatación de las microalgas en un entorno similar a las aguas residuales para ayudar a las microalgas a adaptarse mejor a estas [Hu et al., 2019], igualmente, en este estudio el inóculo donde se obtuvieron las microalgas provenía de unas columnas de vidrio de 1600 mL que son constantemente alimentadas con agua residual suplementadas con sales de Bold, además su origen son de columnas de Winogradsky que poseen grandes cantidades de materia orgánica como se mencionó anteriormente, por lo que las algas utilizadas están metabólicamente familiarizada con compuestos recalcitrantes de difícil degradación.

Las aguas utilizadas para el tratamiento terciario se caracterizan por no cumplir con los valores límites permitidos por la resolución 0631 del 2015 en parámetros como la DBO₅ y la DQO. Además, de poseer un color aparente diáfano, que permite el paso de la luz fácilmente a través de la muestra, en comparación del agua cuando no ha sido tratada. Sin embargo, la desaparición o una disminución del color 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].

En la primera cinética, se evidencia compuestos que se leen a 515 nm, el cual posiblemente corresponde al colorante rojo de metilo o intermedieraron de este según Suman y colaboradores (2015), y en la segunda cinética la intensidad de la señal es a 449 nm lo que puede deberse a la presencia de colorantes como fucsina básica o fenicada los cuales fueron reportadas por Hernández, 2017 en ARnD/TB con un máximo de absorción a 545 nm o de cristal violeta que se lee a 551 nm **[Singh et al., 2010]**.

Las algas eucariotas son capaces de biotransformar y biodegradar los contaminantes aromáticos que se encuentran comúnmente en las aguas naturales y residuales. Además, estos organismos pueden aumentar el potencial de degradación del microbiota presente y, por lo tanto, contribuir a la eliminación de contaminantes del ecosistema. Los mecanismos de eliminación de tinte varían según los colorantes y las especies de algas utilizada **[Della Greca et al., 2008]**. En la cinética uno se evidencian porcentajes de remoción altos y desde el noveno día ya se cumple con la resolución 0631 del 2015, hay que tener en cuenta que se iniciaron con valores de DQO muy bajos (400-300 mg/L) y se han reportado que en general, una concentración de DQO de afluencia excesiva (más de 2000 mg L⁻¹) daría como resultado una tasa de crecimiento insatisfactoria de microalgas y una baja eficiencia de eliminación de nutrientes en las aguas residuales, pero aun así estos mismos autores, encontraron que con una DQO inicial de 2000 mg/L un monocultivo de *Chlorella vulgaris* y un co-cultivo de *Chlorella vulgaris* con un lodo activado presentaron porcentajes de remoción de DQO del 42.3 y 48.6 % respectivamente **[Gao et al., 2018]**. Es decir, las microalgas pueden resistir concentraciones altas de DQO y estas dosificaciones son eventualmente efluente de tratamiento secundario con lodos activados.

En la cinética 2 se evidencio que el porcentaje máximo de eliminación de DQO (70 %) fue en el 10 día, después disminuye hasta el 65 % en el día 15. Este comportamiento coincide con Qin y colaboradores en el año 2016 donde la eliminación máxima de DQO en aguas residuales por *Chlorella* sp. alcanza el 44 % en el tercer día y disminuye gradualmente a 23.21 % en el séptimo día. A pesar de esto, el valor final de DQO obtenido está por debajo del valor máximo que exige la resolución 0631. De hecho, se podría sugerir detener el proceso en el décimo día, e incluso en el noveno día donde la DQO sigue siendo muy baja, con el fin de reducir costos y evitar este aumento en la concentración.

Este comportamiento del aumento en la concentración de DQO y de COT después del décimo día de tratamiento en el fotobiorreactor puede ser debido a dos razones. La primera, explicada de acuerdo con las rutas metabólicas preferidas por las algas para el crecimiento: la ruta metabólica de *Chlorella* sp. puede alterarse con el suministro de sustratos orgánicos, como los ácidos orgánicos o la glucosa, lo que significa que pueden realizar un crecimiento heterótrofo, además del autotrófico común, de utilizar el CO₂ como única fuente de carbono. Las sustancias orgánicas pueden funcionar directamente como un nutriente orgánico esencial o actuar como un factor de crecimiento accesorio. El crecimiento heterótrofo de *Chlorella* puede proceder de una manera mucho más rápida incorporando directamente sustrato orgánico en el proceso de asimilación oxidativa para la producción de material de almacenamiento. Las materias de carbono en el efluente son en su mayoría inertes después del tratamiento con lodos activados y, por lo tanto, no pueden ser utilizadas por las algas. Cuando el sustrato orgánico no está disponible, el crecimiento autótrofo utiliza CO₂ como fuente de carbono, excretando pequeñas sustancias orgánicas moleculares como el ácido glicólico al medio ambiente como un producto del ciclo de reducción de carbono fotosintético, que es la razón por la cual aumenta la DQO y COT en el efluente después del cultivo de algas [Wang et al., 2009]. La segunda razón hace referencia a las condiciones de crecimiento: se ha informado que la pared celular de la especie *Chlorella* consiste en una sustancia similar a la esporopolenina, politerpeno resistente a los agentes químicos e impermeable. Las altas temperaturas y la intensidad de la luz inhiben el proceso de crecimiento y fotosíntesis y conducen a una alta liberación de materia orgánica extracelular. Las algas pueden liberar entre el 7 % y el 50 % del carbono asimilado en forma de polímeros extracelulares [Babel et al., 2002].

La eficiencia de decoloración biológica aumenta con un aumento en la biomasa de algas inicial. La posible razón es que, al aumentar la biomasa de algas inicial, aumenta el número de células activas responsables del proceso de decoloración biológica [Khataee et al., 2013]. Sin embargo, cuando se realiza recuento en cámara de Neubauer como variable de respuesta se desconoce cuáles de estas están vivas y cuáles no, no obstante, estas últimas son las que cumplen un papel importante en los primeros minutos de contacto de las algas con el agua residual. En el día 0 se evidencio una disminución de todos los parámetros evaluados, exceptuando los nutrientes, después de 10 minutos de haber añadir el inóculo de algas. Esta reducción puede explicarse por

métodos de biosorción que tiene lugar en la pared celular de microalgas muertas o inactivas. Cabe señalar que la biosorción es generalmente el enfoque preferido debido a los tiempos de proceso más cortos, sin necesidad de energía. La eficiencia de la biosorción depende del pH, la temperatura y el tiempo de contacto. Se ha informado que el tiempo para alcanzar la capacidad máxima de adsorción es de 30 minutos a 14 horas, dependiendo de los microorganismos biosorbentes [Dirbaz et al., 2018; Furuhashi et al., 2019]. Un estudio realizado por Dirbaz y colaboradores en el 2018, encontraron que los grupos funcionales involucrados en los procesos de biosorción de contaminantes por *Parachlorella* sp., fueron: -OH, -NH, el quelante C=O presente en las amidas, y C-O presente en grupos alcohólicos, en este estudio la biosorción se vio favorecida a pH 7. Por otro lado, otros grupos como metilo (-CH₃), metileno (-CH₂), P-O, C=C de los anillos aromáticos, C-O de los éteres aromáticos fueron reportados por da Rosa y colaboradores en el 2018 para la adsorción de colorante catiónico (Rodamina B) por *Chlorella pyrenoidosa* a un pH óptimo de 8. Estos estudios coinciden con el rango de pH (pH 7-7.6) en el que se mantuvo el biorreactor fototrófico durante los 15 días de tratamiento, sin embargo, con respecto a la temperatura ellos tenían valores superiores a 25 °C, opuesto a la temperatura en este estudio ya que fue de 19 °C.

Los colorantes usados como el cristal violeta y azul de metileno son catiónicos, es decir, tienen carga positiva. A valores de pH bajo, los iones H⁺ compiten con el colorante catiónico y hay una disminución del área de contacto con el biosorbente, y la presencia de estos iones en exceso puede disminuir la ionización del grupo carboxilo. Por otra parte, cuando el pH de la solución aumenta, la superficie se carga negativamente debido a la biosorción de OH⁻ y la deprotonación, mejorando la biosorción por atracción electrostática, es decir, que a valores de pH < 6,94, las microalgas están cargadas positivamente, mientras que a valores de pH > 6,94 tiene una carga superficial negativa [Vyavahare et al., 2018; da Rosa et al., 2018].

En ambas cinéticas había bacterias, en la primera cinética así se haya esterilizado el biorreactor no era estéril y el inóculo de algas no era puro, además, el recuento lo demuestra. Este consorcio tiene varias ventajas, ya que las bacterias pudieron descomponer la materia orgánica y asimilar el fósforo utilizando el O₂ producido por la fotosíntesis de las algas. Se ha reportado que consorcios de *Chlorella vulgaris*, *Bacillus cereus* y *Pseudomonas putida*, aumenta el crecimiento de las microalgas, estos coinciden con los recuentos realizados en la segunda cinética la cual fue mayor

en comparación con la primera donde la cantidad de bacterias fue 3 unidades logarítmicas menos. Además, las interacciones simbióticas entre microalgas y bacterias pueden reducir la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) en las aguas residuales tratadas [Gómez-Guzmán et al., 2017; Qu et al 2014].

Adicionalmente, las microalgas producen compuestos como pigmentos, enzimas, azúcares, lípidos con ácidos grasos valiosos, esteroides y vitaminas que pueden presentar picos de absorción en el rango de luz visible (400-700 nm) sin embargo estos picos solo se evidencian en un solo día y desaparecen, esto puede explicarse ya que todas estas moléculas sirven como sustratos para el crecimiento bacteriano, así que las consumen provocando la ausencia del pico de absorción al siguiente día [Gómez-Guzmán et al., 2017; Koller et al., 2014].

Por otro lado, los nitratos y nitritos se midieron en ambas cinéticas y en ninguna hubo remoción en el día 15 de haber operado el fotobiorreactor. Esto puede ser debido a que la forma preferida para las microalgas es el NH_4 ya que no requiere pasos previos de reducción y es incorporado activamente en las células para convertirlo directamente en aminoácidos a través de la vía de la glutamina sintetasa-glutamato sintasa, donde la glutamina sintasa cataliza la formación de glutamina a partir de glutamato y trifosfato de adenosina (ATP) [Gonçalves et al., 2017], sin embargo, como no se evaluaron las concentraciones de amonio en el reactor, se desconoce si la no remoción fue debido a esto.

Adicionalmente, los nitratos y nitritos aumentaron en el tiempo, esto puede ser debido a procesos de oxidación del amonio que eventualmente provocan el aumento de nitratos y nitritos en las aguas residuales. Además, se ha reportado que al aumentar la intensidad de la luz los oxidantes de nitrito se vieron significativamente más afectados por la luz que los oxidantes de amonio, es decir, pueden ser foto inhibidos a altas irradiaciones que se encuentran típicamente en condiciones exteriores [Vergara et al., 2016]. Según Kaplan y colaboradores en el año 2000 en un estudio que realizaron en un cuerpo de agua natural, donde la luz se identificó como un factor importante que inhibe la nitrificación y provoca la acumulación de nitrito durante la primavera y el verano.

Finalmente, la remoción de ortofosfatos por parte de las microalgas en la primera cinética fue baja, solo de un 5 %. Este comportamiento puede ser debido a que el crecimiento algal no fue alto, aumento menos de una unidad logarítmica durante los 15 días de tratamiento. Para que se lleven a cabo remociones se considera que debe haber una alta intensidad de luz junto con una exposición suficiente para promover un rápido crecimiento de las microalgas. Por lo tanto, la rápida formación de ATP y NADPH durante el crecimiento celular aumenta la absorción de P de las aguas residuales [Halip Khalid et., 2018]. Por otro lado, el fosforo que fue consumido es utilizado para la síntesis de ácidos nucleicos y la transferencia de energía, pero aún así, la eliminación de $\text{PO}_4\text{-P}$ esta limitada por las condiciones ambientales, el aumento del pH podría provocar la precipitación de fósforo con los cationes disponibles para formar fosfatos metálicos (por ejemplo, fosfatos de calcio), así como las altas concentraciones de oxígeno disuelto [Gonçalves et al., 2017; AlMomani et al., 2016]. El pH se mantuvo por debajo de 8, pero la cantidad de oxígeno disuelto no se midió en el fotobiorreactor.

8.5 Biochar

El tratamiento de los residuos sólidos de aguas residuales siempre ha sido un problema de protección ambiental, ya que contiene metales pesados y contaminantes orgánicos. Los medios tradicionales para tratar los lodos incluyen principalmente vertederos e incineración, sin embargo, estas medidas pueden causar contaminación secundaria. La pirólisis es uno de los alternativas para obtener productos sólidos, líquidos y de gas que han atraído una atención cada vez mayor. Los productos derivados del biochar de pirólisis son porosos y económicos y tienen el potencial de ser utilizados como un adsorbente para la purificación de aguas residuales en la eliminación de moléculas orgánicas a escala industrial [Zhang et al., 2019; de Caprariis et al., 2017]

La temperatura de pirólisis es un parámetro termodinámico vital que influye en las características del biochar. Los biochar producidos a partir de materias primas orgánicas a altas temperaturas (400–700 °C) contienen grandes cantidades de carbono en estructuras aromáticas policondensadas. La policondensación del carbono en anillos aromáticos que se produce al aumentar la temperatura de pirólisis también mejora el área de superficie y el desarrollo de poros del biochar lo que imparte una alta capacidad de adsorción a los biochar producidos a altas

temperaturas. Sin embargo, los biochar a altas temperaturas de pirólisis (400–700 °C), normalmente contienen menos grupos funcionales para crear sitios de intercambio iónico y cargas superficiales, como resultado de la descarboxilación, mientras que los biochar de baja temperatura contienen grupos funcionales como C=O y C-H que fomentan la retención de nutrientes [Qambrani et al., 2017]. según un estudio realizado por Zheng y colaboradores en el año 2017, demostraron que *Chlorella* sp. poseía mayor polaridad con mas grupos funcionales que contenían oxígeno, donde determinaron que los principales grupos funcionales involucrados antes y después de la adsorción de p-nitrofenol eran O-H, -C=N, -N-H, C-OH, C-O-C y C-N-S, todos estos encontrados en la superficie de la pared de las microalgas.

Con respecto al pH, se ha informado que el biochar producido a través de desechos de madera parece ser un adsorbente prometedor para la eliminación de colorantes azoicos de aguas residuales textiles, especialmente cuando se trabaja a valores de pH más bajos [Shankar et al., 2017]. El potencial zeta del biochar a bajas temperaturas le confiere una carga superficial positiva, y muchos de los colorantes de tipo azo presentes en las aguas residuales de la Facultad de Ciencias poseen una carga negativa, por este motivo el biochar a bajas temperaturas (300 °C) probablemente posee la capacidad de adsorber a través de la atracción electrostática que opera entre la superficie del biochar y el colorante [Tong et al., 2011]. Según un estudio realizado por Kelm y colaboradores en el 2019 un pH ácido exhibió casi el 100% de eliminación del colorante del agua.

El porcentaje de carbono fijo disminuye a medida que se aumentaba la temperatura de pirólisis del biochar. Esto se debe a que el contenido de carbono de biochar es más alto cuando proviene del material lignocelulósico que de los residuos sólidos derivados de la planta debido a un mayor contenido de carbono derivado de la lignina y, además, las proporciones de corteza de pino eran más altas en este estudio. Dentro de los componentes principales de la corteza de pino esta la lignina, la hemicelulosa y la celulosa, estos dos últimos en una atmósfera libre de oxígeno se volatilizan debido a la escisión térmica de las unidades de monómeros de carbohidratos. La hemicelulosa es la más lábil desde el punto de vista térmico y se descompone primero en un rango de temperatura de 220–315 °C, la celulosa es más estable térmicamente debido a su estructura cristalina, se descompone a una temperatura más alta de 315–400 °C, en contraste, la lignina es un polímero significativamente más heterogéneo (en relación con la celulosa o las

hemicelulosas) y se descompone en una ventana de temperatura mucho más amplia de 190-900 °C [Maddi et al., 2011]. Adicionalmente, las perlas de alginato son un biopolímero de origen vegetal que puede comportarse de la misma forma que las estructuras presentes en la corteza de pino.

Adicionalmente, la mayoría de los biopolímeros en las algas (con la excepción de pequeñas cantidades de lípidos) contienen oxígeno, es probable que la desoxigenación incompleta sea la causa del menor contenido de carbono por parte de las algas [Maddi et al., 2011], por otro lado, se ha reportado que el biochar producido a partir de diferentes muestras de lodos de depuradora, a temperaturas que oscilaron entre 300 y 500 °C, registraron valores de C de 33.1 % y 3.1 % respectivamente, es decir disminuye la cantidad de carbono de acuerdo con el aumento de temperatura de pirólisis [Regkouzas & Diamadopoulos, 2019].

Por un lado, al aumentar la temperatura de pirólisis, la estructura mineral se transfiere de una estructura amorfa más soluble a una estructura cristalina más estable, aumentando el contenido de cenizas a medida que se aumentaba la temperatura de pirólisis, lo que coincide con este estudio. Las cenizas contienen nutrientes, como N, P y K, que pueden mejorar la fertilidad del suelo y luego aumentar el crecimiento vegetal. Los elementos minerales de la ceniza en los biochar pueden interactuar con los subproductos pirolíticos de los compuestos orgánicos y producir radicales libres que pueden facilitar la degradación de una serie de contaminantes orgánicos. Sin embargo, la ceniza en biochar también tiene un efecto negativo, ya que sus partículas pueden ocupar los sitios de sorción o bloquear el acceso a los poros interiores, suprimiendo la sorción de contaminantes orgánicos, como diuron, p-nitrotolueno, m-dinitrobenceno, nitrobenceno, naftaleno, fenantreno y bisfenol. Adicionalmente, se ha reportado que la ceniza en el biochar puede contener algunos contaminantes metálicos (por ejemplo, Cu, Cd y Pb), que se originan principalmente de materias primas como lodos de depuración y residuos de la producción de biogás [Chen et al., 2019]. Adicionalmente, se ha reportado que elementos inorgánicos en la ceniza de algas catalizan la formación de carbón durante la pirólisis, como los hidrocarburos grasos orgánicos que se descomponen en biogás o se transforman en estructuras aromáticas [Maddi et al., 2011].

La temperatura de pirólisis fue el factor más importante que afectó el rendimiento de los biochar producidos, debido a que en varios estudios se ha reportado que el rendimiento del biochar disminuye con el aumento de la temperatura. La disminución en el rendimiento del biochar posiblemente esté relacionada con una conversión de pirólisis adicional y, por lo tanto, podría atribuirse a una mayor descomposición primaria de la materia prima inicial o a reacciones secundarias del residuo sólido. Lo que coinciden con Xue y colaboradores en el año 2019, debido a que reportaron rendimientos de biochar derivados de residuos sólidos de plantas, de 88.6 y 49.2 a temperaturas de pirólisis de 300 y 600 °C durante 60 minutos respectivamente. [Chen et al., 2018; De Bhowmick et al., 2018; Agrafioti et al., 2013].

9. CONCLUSIONES

- La diversidad microbiana en las columnas de Winogradsky reflejó la prevalencia de microalgas del género *Chlorella* sp., *Chlorococcum* sp. y *Achnanidium* sp. en los diferentes tiempos de estabilización, donde predominó la presencia de la clase clorófita sobre diatomea, debido a que las clorófitas presentan mayores mecanismos de resistencia y competencia con los diversos nichos ecológicos presentes en el sedimento, en cambio, las diatomeas son altamente afectadas por variables ambientales.
- En las pruebas de tolerancia, el género de *Chlorella* fue el único en crecer a una concentración del 100 % (v/v) de ARnD/TB postratada, con valores de DQO, DBO₅ y COT de 473.3, 184 y 119 mg/L respectivamente.
- El afluente tratado por el consorcio fúngico-bacteriano presentó altos niveles de remoción y generó un residuo sólido de valor agregado, sin embargo, no cumplió con los valores límite establecidos por la resolución 0631 del 2015 para su disposición final, motivo por el cual se acopló a un tratamiento terciario.
- El uso de microalgas para la remoción de color y DQO fue un sistema altamente eficiente, ya que cumplió con la normativa nacional. Con valores de remoción de DQO del 90 % (40 mg/L) y de 65 % (105 mg/L) para la primera y segunda cinética respectivamente, no obstante, no hubo disminución de nitratos ni nitritos.
- El uso de residuos sólidos de la planta de tratamiento generó tres productos de valor agregado: biochar a 300, 500 y 700 °C los cuales tuvieron un rendimiento de biochar de

62.11, 46.3 y 31.6 % y un rendimiento de carbono fijo del 19.5, 14.2 y 10.5 % respectivamente.

10. RECOMENDACIONES

- Disminuir el tiempo de tratamiento terciario en planta a solamente 10 días, disminuyendo la intensidad lumínica para favorecer procesos de nitrificación, así como medir la cantidad de amonio en las muestras. Adicionalmente, la adición de molibdeno puede incrementar la asimilación de nitratos por parte de las algas.
- Realizar tratamiento terciario de aguas residuales no domésticas con concentraciones de DQO más alto.
- Realizar pruebas de adsorción a los tres tipos de biochar generados a diferentes temperaturas de pirólisis, o en su defecto al de 300 °C el cual según la literatura posee mejores características para este tipo de procesos.

11. BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., & Ibraheem, I. B. M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(3), 257–275. doi:10.1016/j.sjbs.2012.04.005

Agrafioti, E., Bouras, G., Kalderis, D., & Diamadopoulos, E. (2013). Biochar production by sewage sludge pyrolysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 101, 72–78. doi:10.1016/j.jaap.2013.02.010

Ahmad, M., Rajapaksha, A. U., Lim, J. E., Zhang, M., Bolan, N., Mohan, D., Ok, Y. S. (2014). Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: A review. *Chemosphere*, 99, 19–33. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.10.071

Ahmad, M., Rajapaksha, A. U., Lim, J. E., Zhang, M., Bolan, N., Mohan, D., ... Ok, Y. S. (2014). Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: A review. *Chemosphere*, 99, 19–33. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.10.071

Ajmi, K., Vismara, E., Manai, I., Haddad, M., Hamdi, M., & Bouallagui, H. (2018). Polyvinyl acetate processing wastewater treatment using combined Fenton's reagent and fungal consortium: Application of central composite design for conditions optimization. *Journal of Hazardous Materials*, 358, 243–255. doi:10.1016/j.jhazmat.2018.06.050

AlMomani, F. A., & Örmeci, B. (2016). Performance Of *Chlorella Vulgaris*, *Neochloris Oleoabundans*, and mixed indigenous microalgae for treatment of primary effluent, secondary effluent and centrate. *Ecological Engineering*, 95, 280–289. doi:10.1016/j.ecoleng.2016.06.038

Alvarado M. y Solano J. (2002). Medios o sustratos en la producción de viveros y plantas. Proyecto Vifinex. Costa Rica. pp 3-36

APHA-AWWA-WEF (2005) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. *21th Edition. New York*, 2-55 y 2-56, método 2540 B.

Arbib, Z., Ruiz, J., Álvarez-Díaz, P., Garrido-Pérez, C., & Perales, J. A. (2014). Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: Wastewater tertiary treatment, CO₂ bio-fixation and low cost biofuels production. *Water Research*, 49, 465–474. doi:10.1016/j.watres.2013.10.036

Arunprasath, T., Sudalai, S., Meenatchi, R. S., Jeyavishnu, K., & Arumugam, A. (2019). Biodegradation of triphenylmethane dye malachite green by a newly isolated fungus strain. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. doi:10.1016/j.bcab.2019.01.030

Babcsányi, I., Meite, F., & Imfeld, G. (2017). Biogeochemical gradients and microbial communities in Winogradsky columns established with polluted wetland sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(8). doi: 10.1093/femsec/fix089

Babel, S., Takizawa, S., & Ozaki, H. (2002). Factors affecting seasonal variation of membrane filtration resistance caused by *Chlorella* algae. *Water Research*, 36(5), 1193–1202. doi:10.1016/s0043-1354(01)00333-5

Badia-Fabregat, M., Lucas, D., Tuomivirta, T., Fritze, H., Pennanen, T., Rodríguez-Mozaz, S., Vicent, T. (2017). Study of the effect of the bacterial and fungal communities present in real wastewater effluents on the performance of fungal treatments. *Science of The Total Environment*, 579, 366–377. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.11.088

Baily, R. E. (2009). Sludge: Types, Treatment Processes and Disposal. New York: Nova Science Publishers, Inc. Retrieved from <http://ezproxy.javeriana.edu.co:2048/login?url=https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=nlebk&AN=333705&lang=es&site=eds-live>

Bayramoğlu, G., Çelik, G., & Arica, M. Y. (2006). Biosorption of Reactive Blue 4 dye by native and treated fungus *Phanerocheate chrysosporium*: Batch and continuous flow system studies. *Journal of Hazardous Materials*, 137(3), 1689–1697. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.05.005

Beak, M. H., Ijagbemi, C. O., & Kim, D. S. (2009). Treatment of malachite green-containing wastewater using poultry feathers as adsorbent. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 44(5), 536–542. doi:10.1080/10934520902720132

Bhowmick, G., Sarmah, A. K., & Sen, R. (2018). Production and characterization of a value-added biochar mix using seaweed, rice husk and pine sawdust: A parametric study. *Journal of Cleaner Production*, 200, 641–656. doi:10.1016/j.jclepro.2018.08.002

- Bilińska, L., Gmurek, M., & Ledakowicz, S. (2016). Comparison between industrial and simulated textile wastewater treatment by AOPs – Biodegradability, toxicity and cost assessment. *Chemical Engineering Journal*, 306, 550–559. doi:10.1016/j.cej.2016.07.100
- Bird, M. I., Wurster, C. M., de Paula Silva, P. H., Bass, A. M., & de Nys, R. (2011). Algal biochar –production and properties. *Bioresource Technology*, 102, 1886–1891. doi:10.1016/j.biortech.2010.07.106
- 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. doi:10.1016/j.jece.2013.11.005
- Blanco-Vargas, A., Ramírez-Sierra, C. F., Duarte-Castañeda, M., Beltrán-Villarraga, M., Medina-Córdoba, L. K., Florido-Cuellar, A.-E., Pedroza-Rodríguez, A. M. (2018). A novel textile wastewater treatment using ligninolytic co-culture and photocatalysis with TiO₂. *Universitas Scientiarum*, 23(3), 437–464. doi:10.11144/Javeriana.SC23-3.antw
- Bondoc, K. G. V., Heuschele, J., Gillard, J., Vyverman, W., & Pohnert, G. (2016). Selective silicate-directed motility in diatoms. *Nature Communications*, 7, 1–7.
- Bustillo-Lecompte, C. F., Mehrvar, M., & Quiñones-Bolaños, E. (2014). Cost-effectiveness analysis of TOC removal from slaughterhouse wastewater using combined anaerobic–aerobic and UV/H₂O₂ processes. *Journal of Environmental Management*, 134, 145–152. doi:10.1016/j.jenvman.2013.12.035
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 557–577. doi:10.1016/j.rser.2009.10.009
- Canfield, D. E., Glazer, A. N., & Falkowski, P. G. (2010). The Evolution and Future of Earth's Nitrogen Cycle. *Science*, 330(6001), 192–196. doi:10.1126/science.1186120
- Carey, R. O., & Migliaccio, K. W. (2009). Contribution of Wastewater Treatment Plant Effluents to Nutrient Dynamics in Aquatic Systems: A Review. *Environmental Management*, 44(2), 205–217. doi:10.1007/s00267-009-9309-5
- Chang, Y.-M., Tsai, W.-T., & Li, M.-H. (2015). Chemical characterization of char derived from slow pyrolysis of microalgal residue. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 111, 88–93. doi:10.1016/j.jaap.2014.12.004
- Chen, W., Wei, R., Yang, L., Yang, Y., Li, G., & Ni, J. (2019). Characteristics of wood-derived biochars produced at different temperatures before and after deashing: Their different potential advantages in environmental applications. *Science of the Total Environment*, 651(Part 2), 2762–2771. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.10.141

Chen, Y., Lin, Y.-C., Ho, S.-H., Zhou, Y., & Ren, N. (2018). Highly efficient adsorption of dyes by biochar derived from pigments-extracted macroalgae pyrolyzed at different temperature. *Bioresource Technology*, 259, 104–110. doi:10.1016/j.biortech.2018.02.094

Christenson, L., & Sims, R. (2011). Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advances*, 29(6), 686–702. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.05.015

Compton, J. C. (2011). *Diatoms : Ecology and Life Cycle*. New York: Nova Science Publishers, Inc.

Da Rosa, A. L. D., Carissimi, E., Dotto, G. L., Sander, H., & Feris, L. A. (2018). Biosorption of rhodamine B dye from dyeing stones effluents using the green microalgae *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Cleaner Production*, 198, 1302–1310. doi: 10.1016/j.jclepro.2018.07.128

De Bhowmick, G., Sarmah, A. K., & Sen, R. (2018). Production and characterization of a value added biochar mix using seaweed, rice husk and pine sawdust: A parametric study. *Journal of Cleaner Production*, 200, 641–656. doi:10.1016/j.jclepro.2018.08.002

De Caprariis, B., De Filippis, P., Hernandez, A. D., Petrucci, E., Petrullo, A., Scarsella, M., & Turchi, M. (2017). Pyrolysis wastewater treatment by adsorption on biochars produced by poplar biomass. *Journal Of Environmental Management*, 197, 231–238. doi:10.1016/j.jenvman.2017.04.007

Della Greca, M., Pinto, G., Pistillo, P., Pollio, A., Previtera, L., & Temussi, F. (2008). Biotransformation of ethinylestradiol by microalgae. *Chemosphere*, 70(11), 2047–2053. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.09.011

Dirbaz, M., & Roosta, A. (2018). Adsorption, kinetic and thermodynamic studies for the biosorption of cadmium onto microalgae *Parachlorella* sp. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(2), 2302–2309. doi:10.1016/j.jece.2018.03.039

Djafer, A., Djafer, L., Maimoun, B., Iddou, A., Kouadri Mostefai, S., & Ayril, A. (2016). Reuse of waste activated sludge for textile dyeing wastewater treatment by biosorption: performance optimization and comparison. *Water and Environment Journal*, 31(1), 105–112. doi:10.1111/wej.12218

Duarte, C. M., Holmer, M., Olsen, Y., Soto, D., Marbà, N., Guiu J., Black, K., Karakassis, I. (2009). Will the Oceans Help Feed Humanity?. *BioScience*, (59) 967–976. doi:10.1525/bio.2009.59.11.8

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(2), 83–99. doi:10.1016/s0926-3373(00)00168-5

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. (2015). Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030, informe resumido. <http://www.fao.org/3/y3557s/y3557s00.pdf>

FAO/WHO. (2003a). Nitrite (and potential endogenous formation of N-nitroso compounds). In: Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Geneva, World Health Organization, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (WHO Food Additives Series No. 50; <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v50je05.htm>).

FAO/WHO. (2003b). Nitrate (and potential endogenous formation of N-nitroso compounds). In: Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Geneva, World Health Organization, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (WHO Food Additives Series No. 50; <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v50je06.htm>).

FAO. (n.d). Wastewater characteristics and effluent quality parameters. <http://www.fao.org/3/t0551e/t0551e03.htm>

Faraco, V., Pezzella, C., Miele, A., Giardina, P., & Sannia, G. (2008). Bio-remediation of colored industrial wastewaters by the white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus ostreatus* and their enzymes. *Biodegradation*, 20(2), 209–220. doi:10.1007/s10532-008-9214-2

Faraco, V., Pezzella, C., Miele, A., Giardina, P., & Sannia, G. (2008). Bio-remediation of colored industrial wastewaters by the white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus ostreatus* and their enzymes. *Biodegradation*, 20(2), 209–220. doi:10.1007/s10532-008-9214-2

Federation, W. E. (1999). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Part 1000 Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.

Feng, Y., Xue, L., Wang, Y., Yang, L., Sun, H., Shi, W., Xing, B. (2018). Sawdust biochar application to rice paddy field: reduced nitrogen loss in floodwater accompanied with increased NH₃ volatilization. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(9), 8388–8395. doi:10.1007/s11356-017-1059-y

Fergola, P., Cerasuolo, M., Pollio, A., Pinto, G., & DellaGreca, M. (2007). Allelopathy and competition between *Chlorella vulgaris* and *Pseudokirchneriella subcapitata*: Experiments and mathematical model. *Ecological Modelling*, 208(2), 205–214. doi: 10.1016/j.ecolmodel.2007.05.024

Fernández, J. A., Cardozo, M. G., Carrascal, A. K., Salcedo, J. C., Pedroza, A. M., & Daza, C. E. (2015). Microbiology cell-staining wastewater treatment using TiO₂ thin films / Tratamiento de agua residual de microbiología usando películas delgadas de TiO₂. *Ingeniería y Competitividad*, (1), 35. Retrieved from <http://ezproxy.javeriana.edu.co:2048/login?url=https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edssci&AN=edssci.S0123.30332015000100004&lang=es&site=eds-live>

Furuhashi, Y., Honda, R., Noguchi, M., Hara-Yamamura, H., Kobayashi, S., Higashimine, K., & Hasegawa, H. (2019). Optimum conditions of pH, temperature and preculture for biosorption

of europium by microalgae *Acutodesmus acuminatus*. *Biochemical Engineering Journal*, 143, 58–64. doi:10.1016/j.bej.2018.12.007

Gadekar, M. R., & Ahammed, M. M. (2019). Modelling dye removal by adsorption onto water treatment residuals using combined response surface methodology-artificial neural network approach. *Journal of Environmental Management*, 231, 241–248. doi:10.1016/j.jenvman.2018.10.017

Gao, S., Hu, C., Sun, S., Xu, J., Zhao, Y., & Zhang, H. (2018). Performance of piggery wastewater treatment and biogas upgrading by three microalgal cultivation technologies under different initial COD concentration. *Energy*, 165(Part B), 360–369. doi:10.1016/j.energy.2018.09.190

GilPavas, E., Dobrosz-Gómez, I., & Gómez-García, M.-Á. (2019). Optimization and toxicity assessment of a combined electrocoagulation, H₂O₂/Fe²⁺/UV and activated carbon adsorption for textile wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 651(Part 1), 551–560. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.09.125

Gómez-Guzmán, A., Jiménez-Magaña, S., Guerra-Rentería, A. S., Gómez-Hermosillo, C., Parra-Rodríguez, F. J., Velázquez, S., González-Reynoso, O. (2017). Evaluation of nutrients removal (NO₃-N, NH₃-N and PO₄-P) with *Chlorella vulgaris*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus cereus* and a consortium of these microorganisms in the treatment of wastewater effluents. *Water Science and Technology*, 76(1), 49–56. doi:10.2166/wst.2017.175

Gonçalves, A. L., Pires, J. C. M., & Simões, M. (2017). A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Research*, 24, 403–415. doi:10.1016/j.algal.2016.11.008

Guo, W.-Q., Zheng, H.-S., Li, S., Du, J.-S., Feng, X.-C., Yin, R.-L., ... Chang, J.-S. (2016). Removal of cephalosporin antibiotics 7-ACA from wastewater during the cultivation of lipid-accumulating microalgae. *Bioresource Technology*, 221, 284–290. doi:10.1016/j.biortech.2016.09.036

Gupta, V. K., & Suhas. (2009). Application of low-cost adsorbents for dye removal – A review. *Journal of Environmental Management*, 90(8), 2313–2342. doi:10.1016/j.jenvman.2008.11.017

Gupta, V. K., Mittal, A., Gajbe, V., & Mittal, J. (2008). Adsorption of basic fuchsin using waste materials—bottom ash and deoiled soya—as adsorbents. *Journal of Colloid and Interface Science*, 319(1), 30–39. doi:10.1016/j.jcis.2007.09.091

HACH Company. (2014). Nitrite test method, 584, 1–6.

HACH. (2014). Chemical oxygen demand, dichromate method. Hach, DOC316.53., 10.

HACH. (2014). Chemical oxygen demand, dichromate method. Hach, DOC316.53., 10.

HACH. (2014). Nitrate, MR, 584, 8.

Halip Khalid, A. A., Yaakob, Z., Sheikh Abdullah, S. R., & Takriff, M. S. (2018). Analysis of the elemental composition and uptake mechanism of *Chlorella sorokiniana* for nutrient removal in agricultural wastewater under optimized response surface methodology (RSM) conditions. *Journal of Cleaner Production*. doi:10.1016/j.jclepro.2018.11.095

Hamed, S., & Klöck, G. (2014). Improvement of Medium Composition and Utilization of Mixotrophic Cultivation for Green and Blue Green Microalgae towards Biodiesel Production. *Advances In Microbiology*, 04(03), 167-174. doi: 10.4236/aim.2014.43022

Hamoda, M. , Al-Ghusain, I., & Al-Mutairi, N. . (2004). Sand filtration of wastewater for tertiary treatment and water reuse. *Desalination*, 164(3), 203–211. doi:10.1016/s0011-9164(04)00189-4

Harikishore Kumar Reddy, D., & Lee, S.-M. (2014). Magnetic biochar composite: Facile synthesis, characterization, and application for heavy metal removal. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 454, 96–103. doi:10.1016/j.colsurfa.2014.03.105

He, P. J., Mao, B., Shen, C. M., Shao, L. M., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2013). Cultivation of *Chlorella vulgaris* on wastewater containing high levels of ammonia for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 129, 177–181. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.162

Hernández-García, A., Velásquez-Orta, S. B., Novelo, E., Yáñez-Noguez, I., Monje-Ramírez, I., & Orta Ledesma, M. T. (2019). Wastewater-leachate treatment by microalgae: Biomass, carbohydrate and lipid production. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 174, 435–444. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.02.052

Holkar, C. R., Jadhav, A. J., Pinjari, D. V., Mahamuni, N. M., & Pandit, A. B. (2016). A critical review on textile wastewater treatments: Possible approaches. *Journal of Environmental Management*, 182, 351–366. doi:10.1016/j.jenvman.2016.07.090

Hu, X., Meneses, Y. E., Stratton, J., & Wang, B. (2019). Acclimation of consortium of microalgae help removal of organic pollutants from meat processing wastewater. *Journal of Cleaner Production*, 214, 95–102. doi:10.1016/j.jclepro.2018.12.255

Huang, G., Chen, F., Wei, D., Zhang, X., & Chen, G. (2010). Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*, 87(1), 38–46. doi:10.1016/j.apenergy.2009.06.016

Iasimone, F., De Felice, V., Panico, A., & Pirozzi, F. (2017). Experimental study for the reduction of CO₂ emissions in wastewater treatment plant using microalgal cultivation. *Journal of CO₂ Utilization*, 22, 1–8. doi:10.1016/j.jcou.2017.09.004

Iorhemen, O. T., Hamza, R. A., Zaghoul, M. S., & Tay, J. H. (n.d.). Simultaneous organics and nutrients removal in side-stream aerobic granular sludge membrane bioreactor (AGMBR). *Journal of Water Process Engineering*, 21, 127–132. doi:10.1016/j.jwpe.2017.12.009

- Jaafari, J., & Yaghmaeian, K. (2019). Optimization of heavy metal biosorption onto freshwater algae (*Chlorella coloniales*) using response surface methodology (RSM). *Chemosphere*, 217, 447–455. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.10.205
- Jennifer G. Winter, & Hamish C. Duthie. (2000). Epilithic diatoms as indicators of stream total N and total P concentration. *Journal of the North American Benthological Society*, 19(1), 32. doi:10.2307/1468280
- Ji, M.-K., Yun, H.-S., Park, Y.-T., Kabra, A. N., Oh, I.-H., & Choi, J. (2015). Mixotrophic cultivation of a microalga *Scenedesmus obliquus* in municipal wastewater supplemented with food wastewater and flue gas CO₂ for biomass production. *Journal of Environmental Management*, 159, 115–120. doi:10.1016/j.jenvman.2015.05.037
- Jiranuntipon, S., Chareonpornwattana, S., Damronglerd, S., Albasi, C., & Delia, M.-L. (2008). Decolorization of synthetic melanoidins-containing wastewater by a bacterial consortium. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35(11), 1313–1321. doi:10.1007/s10295-008-0413-y
- Kaksonen, A., Tjanatmadja, G., Burn, S., Muster, T. H., & Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (Australia). (2014). Resource Recovery From Wastewater: A Research Agenda for Australia. Alexandria, VA: IWA Publishing. Retrieved from <https://search-ebscohost-com.ezproxy.javeriana.edu.co/login.aspx?direct=true&db=nlebk&AN=923709&lang=es&site=eds-live>
- Kaplan, D., Wilhelm, R., & Abeliovich, A. (2000). Interdependent environmental factors controlling nitrification in waters. *Water Science and Technology*, 42(1-2), 167–172. doi:10.2166/wst.2000.0309
- Kelm, M. A. P., de Araujo, C. M. B., de Assis Filho, R. B., da Motta Sobrinho, M. A., da Silva Júnior, M. J., de Barros Holanda, S. H., dos Santos, D. R. (2019). Removal of azo dye from water via adsorption on biochar produced by the gasification of wood wastes. *Environmental Science and Pollution Research*. doi:10.1007/s11356-018-3833-x
- Khan, N., Clark, I., Sánchez-Monedero, M. A., Shea, S., Meier, S., & Bolan, N. (2014). Maturity indices in co-composting of chicken manure and sawdust with biochar. *Bioresource Technology*, 168, 245–251. doi:10.1016/j.biortech.2014.02.123
- Khataee, A., Dehghan, G., Zarei, M., Fallah, S., Niaei, G., & Atazadeh, I. (2013). Degradation of an azo dye using the green macroalga *Enteromorpha* sp. *Chemistry and Ecology*, 29(3), 221–233. doi:10.1080/02757540.2012.744831
- Kim, D.-Y., Vijayan, D., Praveenkumar, R., Han, J.-I., Lee, K., Park, J.-Y., Oh, Y.-K. (2016). Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*. *Bioresource Technology*, 199, 300–310. doi:10.1016/j.biortech.2015.08.107

Klochkova, T. A., Kang, S.-H., Cho, G. Y., Poeschel, C. M., West, J. A., & Kim, G. H. (2006). Biology of a terrestrial green alga, *Chlorococcum* sp. (*Chlorococcales*, *Chlorophyta*), collected from the Miruksazi stupa in Korea. *Phycologia*, 45(3), 349–358. doi:10.2216/04-58.1

Koller, M., Muhr, A., & Brauneegg, G. (2014). Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research*, 6, 52–63. doi:10.1016/j.algal.2014.09.002

Krienitz, L., Huss, V. A. R., & Bock, C. (2015). Chlorella: 125 years of the green survivalist. *Trends in Plant Science*, 20(2), 67–69. doi:10.1016/j.tplants.2014.11.005

Larronde-Larretche, M., & Jin, X. (2016). Microalgae (*Scenedesmus obliquus*) dewatering using forward osmosis membrane: Influence of draw solution chemistry. *Algal Research*, 15, 1–8. doi:10.1016/j.algal.2016.01.014

Larsdotter, K. (2006). Wastewater treatment with microalgae—a literature review. *Vatten*, 62(1), 31.

LeGresley M., & McDermott G. (2010). Counting chamber methods for quantitative phytoplankton analysis—haemocytometer, Palmer-Maloney cell and Sedgewick-Rafter cell. In: Karlson B, Cusack C, Bresnan E (eds) Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. *UNESCO*, Paris, pp 25–30

Lehmann, J., & Joseph, S. (2009). Biochar for environmental management. London, Sterling, VA.

Lehmann, J., Rillig, M. C., Thies, J., Masiello, C. A., Hockaday, W. C., & Crowley, D. (2011). Biochar effects on soil biota – A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(9), 1812–1836. doi:10.1016/j.soilbio.2011.04.022

Li, Y., Zhou, W., Hu, B., Min, M., Chen, P., & Ruan, R. R. (2011). Integration of algae cultivation as biodiesel production feedstock with municipal wastewater treatment: Strains screening and significance evaluation of environmental factors. *Bioresource Technology*, 102(23), 10861–10867. doi:10.1016/j.biortech.2011.09.064

Liney, K. E., Hagger, J. A., Tyler, C. R., Depledge, M. H., Galloway, T. S., & Jobling, S. (2006). Health Effects in Fish of Long-Term Exposure to Effluents from Wastewater Treatment Works. *Environmental Health Perspectives*, 114, 81–89. doi:10.1289/ehp.8058

Liu, Z., Singer, S., Tong, Y., Kimbell, L., Anderson, E., Hughes, M., ... McNamara, P. (2018). Characteristics and applications of biochars derived from wastewater solids. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90, 650–664. doi:10.1016/j.rser.2018.02.040

Livernoche, D., Jurasek, L., Desrochers, M., Dorica, J., & Veliky, I. A. (1983). Removal of color from kraft mill wastewaters with cultures of white-rot fungi and with immobilized mycelium of *Coriolus versicolor*. *Biotechnology and Bioengineering*, 25(8), 2055–2065. doi:10.1002/bit.260250814

LIZICA-SIMONA, P. (2016). Design of a Primary Clarifier for Sedimentation Process in a Wastewater Treatment Plant. *Analele Universitatii Maritime Constanta*, 17(26), 43–46.

Retrieved from <https://search-ebshost-com.ezproxy.javeriana.edu.co/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=131504918&lang=es&site=eds-live>

Lopez, P. J., Desclés, J., Allen, A. E., & Bowler, C. (2005). Prospects in diatom research. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(2), 180–186. doi:10.1016/j.copbio.2005.02.002

Loss, R. A., Fontes, M. L., Reginatto, V., & Antônio, R. V. (2013). Biohydrogen production by a mixed photoheterotrophic culture obtained from a Winogradsky column prepared from the sediment of a southern Brazilian lagoon. *Renewable Energy*, 50, 648–654. doi:10.1016/j.renene.2012.07.011

Lowrey, J., Brooks, M. S., & McGinn, P. J. (2014). Heterotrophic and mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production in agricultural wastewaters and associated challenges—a critical review. *Journal of Applied Phycology*, 27(4), 1485–1498. doi:10.1007/s10811-014-0459-3

Maddi, B., Viamajala, S., & Varanasi, S. (2011). Comparative study of pyrolysis of algal biomass from natural lake blooms with lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 102(23), 11018–11026. doi:10.1016/j.biortech.2011.09.055

Manavalan, T., Manavalan, A., & Heese, K. (2014). Characterization of Lignocellulolytic Enzymes from White-Rot Fungi. *Current Microbiology*, 70(4), 485–498. doi:10.1007/s00284-014-0743-0

Manya, J. J., Azuara, M., & Manso, J. A. (2018). Biochar production through slow pyrolysis of different biomass materials: Seeking the best operating conditions. *BIOMASS & BIOENERGY*, 117, 115–123. doi:10.1016/j.biombioe.2018.07.019

Martínez P-F, Roca D. (2011). Sustratos para el cultivo sin suelo. Materiales, propiedades y manejo. En: Sustratos, manejo del clima, automatización y control en sistemas de cultivo sin suelo. 1.a ed. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia; p. 37-77.

Mashkoo, F., Nasar, A., Inamuddin, & Asiri, A. M. (2018). Exploring the Reusability of Synthetically Contaminated Wastewater Containing Crystal Violet Dye using *Tectona grandis* Sawdust as a Very Low-Cost Adsorbent. *Scientific Reports*, 8(1). doi:10.1038/s41598-018-26655-3

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. doi:10.1016/j.rser.2009.07.020

Matamoros, V., Uggetti, E., García, J., & Bayona, J. M. (2016). Assessment of the mechanisms involved in the removal of emerging contaminants by microalgae from wastewater: a laboratory scale study. *Journal of Hazardous Materials*, 301, 197–205. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.08.050

Ménesguen, A., & Lacroix, G. (2018). Modelling the marine eutrophication: A review. Science

of *The Total Environment*, 636, 339–354. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.04.183

Mercado J. (2017). Validación de la metodología analítica para la determinación de fósforo en agua potable por espectrofotometría ultravioleta-visible-método. Universidad de Cartagena, facultad de ciencias farmacéuticas.

Method, D. (2016). Organic Carbon, Total, 1–6.

Miazek, K., Kratky, L., Sulc, R., Jirout, T., Aguedo, M., Richel, A., & Goffin, D. (2017). Effect of Organic Solvents on Microalgae Growth, Metabolism and Industrial Bioproduct Extraction: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1429. doi:10.3390/ijms18071429

Morales-Álvarez, E. D., Rivera-Hoyos, C. M., Poutou-Piñales, R. A., Chaparro-Núñez, L. E., Daza, C. E., & Pedroza-Rodríguez, A. M. (2017). Decolorization and detoxification of malachite green by *Ganoderma lucidum*: Key operating parameters and adsorption studies. *Journal of Environmental Engineering (United States)*, 143(4). doi:10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001180

More, T. T., Yan, S., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2010). Potential use of filamentous fungi for wastewater sludge treatment. *Bioresource Technology*, 101(20), 7691–7700. doi:10.1016/j.biortech.2010.05.033

National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2017). PubChem Compound Database. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound?cmd=search>

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.

Osundeko, O., Dean, A. P., Davies, H., & Pittman, J. K. (2014). Acclimation of Microalgae to Wastewater Environments Involves Increased Oxidative Stress Tolerance Activity. *Plant & Cell Physiology*, 55(10), 1848–1857. doi:10.1093/pcp/pcu113

Park, J. B. K., Craggs, R. J., & Shilton, A. N. (2011). Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology*, 102, 35–42. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.158

Pagaling, E., Vassileva, K., Mills, C. G., Bush, T., Blythe, R. A., Schwarz-Linek, J., Free, A. (2017). Assembly of microbial communities in replicate nutrient-cycling model ecosystems follows divergent trajectories, leading to alternate stable states. *Environmental Microbiology*, 19(8), 3374–3386. doi:10.1111/1462-2920.13849

Pearce, C., Lloyd, J.R., Guthrie, J.T. (2003). The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. *Dyes and Pigments*, 58(3), 179–196. doi:10.1016/s0143-7208(03)00064-0

- Pedroza-Camacho, L. D., Lores-Acosta, J. C., Rojas-Enríquez, J. F., Mateus-Maldonado, J. F., Puentes, C. S., Ramírez-Rodríguez, J., Mendez-Casallas, F. J., Salcedo-Reyes J. C., Díaz-Ariza L. A., Lozano-Puentes H. S., 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(03), 369-393. doi:10.4236/jwarp.2018.103020.
- Pedroza-Rodríguez, A. M., & Rodríguez, R. (2013). Optimization of C/N Ratio and Inducers for Wastewater Paper Industry Treatment Using *Trametes versicolor* Immobilized in Bubble Column Reactor. *Journal of Mycology*, 1-11. doi: 10.1155/2013/536721
- Perales-Vela, H. V., Peña-Castro, J. M., & Cañizares-Villanueva, R. O. (2006). Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere*, 64(1), 1–10. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.11.024
- Pittman, J. K., Dean, A. P., & Osundeko, O. (2011). The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*, 102(1), 17–25. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.035
- Priyadarshani, I., Sahu, D., Rath, B. (2011). Microalgal bioremediation: Current practices and perspectives. *Journal of Biochemical Technology*, 3(3): 299-304.
- Ponader, K., & Potapova, M. (2007). Diatoms from the genus *Achnanthisidium* in flowing waters of the Appalachian Mountains (North America): Ecology, distribution and taxonomic notes. *Limnologia - Ecology and Management of Inland Waters*, (3), 227. doi:10.1016/j.limno.2007.01.004
- Potapova, M., & Hamilton, P. B. (2007). Morphological and ecological variation within the *Achnanthisidium minutissimum* (*Bacillariophyceae*) species complex. *Journal of Phycology*, 43(3), 561–575. doi:10.1111/j.1529-8817.2007.00332.x
- Qambrani, N. A., Rahman, M. M., Won, S., Shim, S., & Ra, C. (2017). Biochar properties and eco-friendly applications for climate change mitigation, waste management, and wastewater treatment: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79, 255–273. doi:10.1016/j.rser.2017.05.057
- Qin, L., Wang, Z., Sun, Y., Shu, Q., Feng, P., Zhu, L., Yuan, Z. (2016). Microalgae consortia cultivation in dairy wastewater to improve the potential of nutrient removal and biodiesel feedstock production. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(9), 8379–8387. doi:10.1007/s11356-015-6004-3
- Qu, L., Wang, R., Zhao, P., Chen, R., Zhou, W., Tang, L., & Tang, X. (2014). Interaction between *Chlorella vulgaris* and bacteria: interference and resource competition. *Acta Oceanologica Sinica*, 33(1), 135–140. doi:10.1007/s13131-014-0432-7
- Ranjith Kumar, R., Hanumantha Rao, P., & Arumugam, M. (2015). Lipid Extraction Methods from Microalgae: A Comprehensive Review. *Frontiers in Energy Research*, 2.

doi:10.3389/fenrg.2014.00061

Ratkovich, N., Horn, W., Helmus, F. P., Rosenberger, S., Naessens, W., Nopens, I., & Bentzen, T. R. (2013). Activated sludge rheology: A critical review on data collection and modelling. *Water Research*, 47(2), 463–482. doi:10.1016/j.watres.2012.11.021

Raval, N. P., Shah, P. U., & Shah, N. K. (2016). Adsorptive amputation of hazardous azo dye Congo red from wastewater: a critical review. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(15), 14810–14853. doi:10.1007/s11356-016-6970-0

Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., & Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, 88(10), 3411–3424. doi:10.1016/j.apenergy.2010.11.025

Regkouzas, P., & Diamadopoulos, E. (2019). Adsorption of selected organic micro-pollutants on sewage sludge. *Chemosphere*. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.02.165

Rengel, J. (2018). 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. Trabajo de grado. Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias Biológicas, *Pontificia Universidad Javeriana*.

Rivera-Hoyos, C. M., Morales-Álvarez, E. D., Abelló-Esparza, J., Buitrago-Pérez, D. F., Martínez-Aldana, N., Pedroza-Rodríguez, A. M., Salcedo-Reyes, J. C. (2018). Detoxification of pulping black liquor with *Pleurotus ostreatus* or recombinant *Pichia pastoris* followed by CuO/TiO₂/visible photocatalysis. *Scientific Reports*, 8(1). doi: 10.1038/s41598-018-21597-2

Rivera-Hoyos, C. M., Morales-Álvarez, E. D., Poutou-Piñales, R. A., Pedroza-Rodríguez, A. M., Rodríguez-Vázquez, R., & Delgado-Boada, J. M. (2013). Review: Fungal laccases. *Fungal Biology Reviews*, 27, 67–82. doi:10.1016/j.fbr.2013.07.001

Roostaei, J., Zhang, Y., Gopalakrishnan, K., & Ochocki, A. J. (2018). Mixotrophic Microalgae Biofilm: A Novel Algae Cultivation Strategy for Improved Productivity and Cost-efficiency of Biofuel Feedstock Production. *Scientific Reports*, 8. doi:10.1038/s41598-018-31016-1

Rundell, E. A., Banta, L. M., Ward, D. V., Watts, C. D., Birren, B., & Esteban, D. J. (2014). 16S rRNA Gene Survey of Microbial Communities in Winogradsky Columns. *PLoS ONE*, 9(8), 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0104134

S, R., & P, B. (2019). The potential of lignocellulosic biomass precursors for biochar production: Performance, mechanism and wastewater application—A review. *Industrial Crops & Products*, 128, 405–423. doi:10.1016/j.indcrop.2018.11.041

Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265–278. doi:10.1016/j.rser.2014.04.007

Schonfelder, I., Gelbrecht, J., Schonfelder, J., & Steinberg, C. E. W. (2002). RELATIONSHIPS BETWEEN LITTORAL DIATOMS AND THEIR CHEMICAL ENVIRONMENT IN NORTHEASTERN GERMAN LAKES AND RIVERS¹. *Journal of Phycology*, 38(1), 66–89. doi:10.1046/j.1529-8817.2002.01056.x

Şensöz, S. (2003). Slow pyrolysis of wood barks from *Pinus brutia* Ten. and product compositions. *Bioresource Technology*, 89(3), 307–311. doi:10.1016/s0960-8524(03)00059-2

Shankar, V., Heo, J., Al-Hamadani, Y. A. J., Park, C. M., Chu, K. H., & Yoon, Y. (2017). Evaluation of biochar-ultrafiltration membrane processes for humic acid removal under various hydrodynamic, pH, ionic strength, and pressure conditions. *Journal of Environmental Management*, 197, 610–618. doi:10.1016/j.jenvman.2017.04.040

Shedbalkar, U., Dhanve, R., & Jadhav, J. (2008). Biodegradation of triphenylmethane dye cotton blue by *Penicillium ochrochloron* MTCC 517. *Journal of Hazardous Materials*, 157(2-3), 472–479. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.01.023

Shokri Khoubestani, R., Mirghaffari, N., & Farhadian, O. (2015). Removal of three and hexavalent chromium from aqueous solutions using a microalgae biomass-derived biosorbent. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 34(4), 949–956. doi:10.1002/ep.12071

Shon, H. K., Vigneswaran, S., & Snyder, S. A. (2006). Effluent Organic Matter (EfOM) in Wastewater: Constituents, Effects, and Treatment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 36(4), 327–374. doi:10.1080/10643380600580011

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(2-3), 1462–1473. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.12.032

Sohi, S. P., Krull, E., Lopez-Capel, E., & Bol, R. (2010). A Review of Biochar and Its Use and Function in Soil. *Advances in Agronomy*, 47–82. doi:10.1016/s0065-2113(10)05002-9

Solís, M., Solís, A., Pérez, H. I., Manjarrez, N., & Flores, M. (2012). Microbial decolouration of azo dyes: A review. *Process Biochemistry*, 47(12), 1723–1748. doi:10.1016/j.procbio.2012.08.014

Staszczak, M., Zdunek, E., & Leonowicz, A. (2000). Studies on the role of proteases in the white-rot fungus *Trametes versicolor*: Effect of PMSF and chloroquine on ligninolytic enzymes activity. *Journal of Basic Microbiology*, 40(1), 51–63. doi:10.1002/(sici)1521-4028(200002)40:1<51::aid-jobm51>3.0.co;2-y

Suman, S. K., Dubey, K. A., Mishra, B. B., Bhardwaj, Y. K., Mondal, R. K., Seshadri, M., Varshney, L. (2015). Synthesis of a flexible poly(chloroprene)/methyl red film dosimeter using an environment-benign shear compounding method. *APPLIED RADIATION AND ISOTOPES*, 98, 60–65. doi:10.1016/j.apradiso.2015.01.021

Sushma Gurumayum and Sushree Sangita Senapati. 2017. Exploration of Algal Varieties from Panikhaiti Area of Guwahati using Winogradsky Column. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 6(3): 1195-1204. doi: 10.20546/ijcmas.2017.603.139

Tripathi, M., Sahu, J. N., & Ganesan, P. (2016). Effect of process parameters on production of biochar from biomass waste through pyrolysis: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 55, 467–481. doi:10.1016/j.rser.2015.10.122

Tong, X., Li, J., Yuan, J., & Xu, R. (2011). Adsorption of Cu (II) by biochars generated from three crop straws. *Chemical Engineering Journal*, 172(2-3), 828–834. doi:10.1016/j.cej.2011.06.069

Tripathi, M., Sahu, J. N., & Ganesan, P. (2016). Effect of process parameters on production of biochar from biomass waste through pyrolysis: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 55, 467–481. doi:10.1016/j.rser.2015.10.122

Vaxelaire, J., & Cézac, P. (2004). Moisture distribution in activated sludges: a review. *Water Research*, 38(9), 2215–2230. doi:10.1016/j.watres.2004.02.021

Venkata Mohan, S., Chandrasekhar Rao, N., Krishna Prasad, K., & Karthikeyan, J. (2002). Treatment of simulated Reactive Yellow 22 (Azo) dye effluents using Spirogyra species. *Waste Management*, 22(6), 575–582. doi:10.1016/s0956-053x(02)00030-2

Vergara, C., Jeison, D., Muñoz, R., Campos, J. L., & Seeger, M. (2016). Influence of light intensity on bacterial nitrifying activity in algal-bacterial photobioreactors and its implications for microalgae-based wastewater treatment. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 114, 116–121. doi:10.1016/j.ibiod.2016.06.006

Vuuren, S., Taylor, J., Gerber, A., & Ginkel, C. (2006). A guide for the identification of microscopic algae in South African freshwaters.

Vyavahare, G., Jadhav, J., Aware, C., Patil, D., Jadhav, P., Patil, R., Gurav, R. (2018). Strategies for crystal violet dye sorption on biochar derived from mango leaves and evaluation of residual dye toxicity. *Journal of Cleaner Production*, 207, 296–305. doi:10.1016/j.jclepro.2018.09.193

Wahlen, B. D., Willis, R. M., & Seefeldt, L. C. (2011). Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures. *Bioresource Technology*, 102(3), 2724–2730. doi:10.1016/j.biortech.2010.11.026

Wang, J., & Wang, S. (2019). Preparation, modification and environmental application of biochar: a review. *Journal of Cleaner Production*. doi:10.1016/j.jclepro.2019.04.282

Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y., ... Ruan, R. (2009). Cultivation of Green Algae *Chlorella* sp in Different Wastewaters from Municipal Wastewater Treatment Plant. *APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY*, 162(4), 1174–1186. doi:10.1007/s12010-009-8866-7

- 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. doi:10.1016/j.egypro.2017.07.044
- Wawrzyńska, E., & Kubies, D. (2018). Alginate matrices for protein delivery - a short review. *Physiological Research*, 67(Supplementum 2), S319–S334. Retrieved from <http://ezproxy.javeriana.edu.co:2048/login?url=https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mnh&AN=30379553&lang=es&site=eds-live>
- Wehr, J. D., & Sheath, R. G. (2015). Habitats of Freshwater Algae. *Freshwater Algae of North America*, 13–74. doi:10.1016/b978-0-12-385876-4.00002-5
- Whitton, R., Pidou, M., Jarvis, P., Villa, R., Jefferson, B., & Ometto, F. (2015). Microalgae for municipal wastewater nutrient remediation: mechanisms, reactors and outlook for tertiary treatment. *Environmental Technology Reviews*, 4(1), 133–148. doi:10.1080/21622515.2015.1105308
- XIONG, X., WEN, X., BAI, Y., & QIAN, Y. (2008). Effects of culture conditions on ligninolytic enzymes and protease production by *Phanerochaete chrysosporium* in air. *Journal of Environmental Sciences*, 20(1), 94–100. doi:10.1016/s1001-0742(08)60014-5
- Xue, Y., Wang, C., Hu, Z., Zhou, Y., Xiao, Y., & Wang, T. (2019). Pyrolysis of sewage sludge by electromagnetic induction: Biochar properties and application in adsorption removal of Pb(II), Cd(II) from aqueous solution. *Waste Management*, 89, 48–56. doi:10.1016/j.wasman.2019.03.047
- 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, Q., Li, C., Li, H., Li, Y., & Yu, N. (2009). Degradation of synthetic reactive azo dyes and treatment of textile wastewater by a fungi consortium reactor. *Biochemical Engineering Journal*, 43(3), 225–230. doi:10.1016/j.bej.2008.10.002
- Yu, K. L., Ling, T. C., Show, P. L., Ong, H. C., Chen, W.-H., & Salleh, M. A. M. (2018). Biochar production from microalgae cultivation through pyrolysis as a sustainable carbon sequestration and biorefinery approach. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 20(9), 2047–2055. doi:10.1007/s10098-018-1521-7
- Yu, K. L., Lau, B. F., Show, P. L., Ong, H. C., Ling, T. C., Chen, W.-H., Chang, J.-S. (2017b). Review: Recent developments on algal biochar production and characterization. *Bioresour Technol*, 246, 2–11. doi:10.1016/j.biortech.2017.08.009
- Yu, K. L., Show, P. L., Ong, H. C., Ling, T. C., Lan, J. C.-W., Chen, W.-H., & Chang, J.-S. (2017a). Microalgae from wastewater treatment to biochar - Feedstock preparation and conversion technologies. *Energy Conversion and Management*, 1. doi:10.1016/j.enconman.2017.07.060

Zhan, J., Rong, J., & Wang, Q. (2017). Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(12), 8505–8517. doi:10.1016/j.ijhydene.2016.12.021

Zhang, S., Wang, L., Wei, W., Hu, J., Mei, S., Zhao, Q., & Tsang, Y. F. (2017). Enhanced roles of biochar and organic fertilizer in microalgae for soil carbon sink. *BIODEGRADATION*, 29(4), 313–321. doi:10.1007/s10532-017-9790-0

Zhuang, L.-L., Yu, D., Zhang, J., Liu, F., Wu, Y.-H., Zhang, T.-Y., Hu, H.-Y. (2018). The characteristics and influencing factors of the attached microalgae cultivation: A review. *RENEWABLE & SUSTAINABLE ENERGY REVIEWS*, 94, 1110–1119. doi:10.1016/j.rser.2018.06.006

Zahmatkesh, M., Spanjers, H., & van Lier, J. B. (2017). A novel approach for application of white rot fungi in wastewater treatment under non-sterile conditions: immobilization of fungi on sorghum. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 39(16), 2030–2040. doi:10.1080/09593330.2017.1347718

Zerva, A., Zervakis, G. I., Christakopoulos, P., & Topakas, E. (2017). Degradation of olive mill wastewater by the induced extracellular ligninolytic enzymes of two wood-rot fungi. *Journal of Environmental Management*, 203(Part 2), 791–798. doi:10.1016/j.jenvman.2016.02.042

Zhang, J., Shao, J., Jin, Q., Li, Z., Zhang, X., Chen, Y., Chen, H. (2019). Sludge-based biochar activation to enhance Pb (II) adsorption. *Fuel*, 252, 101–108. doi:10.1016/j.fuel.2019.04.096

Zhao, X., Wang, Y., Ye, Z., Borthwick, A. G. L., & Ni, J. (2006). Oil field wastewater treatment in Biological Aerated Filter by immobilized microorganisms. *Process Biochemistry*, 41(7), 1475–1483. doi:10.1016/j.procbio.2006.02.006

Zheng, H., Guo, W., Li, S., Chen, Y., Wu, Q., Feng, X., Chang, J.-S. (2017). Adsorption of p-nitrophenols (PNP) on microalgal biochar: Analysis of high adsorption capacity and mechanism. *Bioresource Technology*, 244, 1456–1464. doi:10.1016/j.biortech.2017.05.025

Zheng, H., Guo, W., Li, S., Chen, Y., Wu, Q., Feng, X., Chang, J.-S. (2017). Adsorption of p-nitrophenols (PNP) on microalgal biochar: Analysis of high adsorption capacity and mechanism. *Bioresource Technology*, 244, 1456–1464. doi:10.1016/j.biortech.2017.05.025

Zipf, M. S., Pinheiro, I. G., & Conegero, M. G. (2016). Simplified greywater treatment systems: Slow filters of sand and slate waste followed by granular activated carbon. *Journal of Environmental Management*, 176, 119–127. doi:10.1016/j.jenvman.2016.03.035