



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIRIQUÍ**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS CON ÉNFASIS EN INOCUIDAD**  
**ALIMENTARIA**

**TESIS TITULADA:**

**“EVALUACIÓN DE CRECIMIENTO Y CAPACIDAD DEPURADORA DE LA MICROALGA *Chlorella sorokiniana*, CULTIVADA EN AGUAS RESIDUALES DE DISTINTAS PROCEDENCIAS”**

**ELABORADO POR:**

Miguel José Vega Quiel

**ASESORA:**

Dra. Ariadna Batista.

**CO-ASESORES:**

Dr. Pedro González.

Dr. Orlando Cáceres.

**LINEA DE INVESTIGACIÓN:**

BIOTECNOLOGIA ALGAL PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PARA**

**OPTAR POR EL TÍTULO DE**

**MÁSTER EN CIENCIAS QUÍMICAS CON ÉNFASIS EN INOCUIDAD ALIMENTARIA.**

David, Chiriquí, República de Panamá

Marzo, 2022.



*Obs. Dec*

## I. AGRADECIMIENTO.

Sobre todo, deseo dar gracias a Dios, por nunca abandonar mis sueños y estar conmigo en cada paso que doy, por no dejarme caer, por darme fuerzas para continuar y luchar, por otorgarme sabiduría y entendimiento, por ayudarme a nunca perder la fe, por arroparme en mis momentos más difíciles de estudio, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo este tiempo.

*e-1 23/11/22 UNACH*  
*Reg Kaha*

Doy gracias infinitas a mis padres y a mi abuela por todos sus valores enseñados y dirigirme para ser la persona que soy hoy en día, mucho de mis logros son gracias a ustedes entre los que se incluye éste. Sus luchas y esfuerzos son un ejemplo para mí, gracias mil gracias por nunca dejarme solo y por siempre dar lo mejor de ustedes. Sus consejos fueron claves en mi vida, hoy en día estoy por convertirme en un magister lo cual es uno de mis más grandes logros y todo debido a que siempre me ayudaron, apoyaron y nunca me dejaron ir por el camino del mal. ¡Muchas gracias!

Me gustaría agradecer a la Dra, profesora, guía y madre Ariadna Batista, por su magnífico esfuerzo, dedicación y preocupación por el desarrollo investigativo en nuestro país. Sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia y su motivación, han sido fundamentales para mi formación como investigador y persona. Agradezco por potenciar en mí el sentido de seriedad de formalidad y responsabilidad. Igualmente quiero agradecer a mis coasesores el Dr. Pedro González y el Dr. Orlando Cáceres, por toda la asesoría, el tiempo dedicado y todo su apoyo en la realización de este proyecto.

Al Centro de Investigación de Productos Naturales y Biotecnología (CIPNABIOT) por las instalaciones, equipos y reactivos facilitados para la realización de este trabajo. A mis grandes compañeros del CIPNABIOT Isaac Lisondro, Eduardo Sáens, Luis Montero, Kyriam Cianca, Diana Sánchez, Aníbal Flores y Diana Staff (Q.E.P.D) por su amistad, cariño, ayuda, motivación, por brindarme conocimientos, orientaciones y por guiarme a trabajar cada vez mejor. Quiero agradecer en especial a Yaiseth Castillo (Mi China) por todo su amor, apoyo, compañía y ayudarme a levantar cuando más lo necesitaba, gracias infinitas.

Agradezco enormemente a la SENACYT por el apoyo financiero y por siempre abrir las puertas a este tipo de proyecto que busca el desarrollo profesional del recurso humano y por ende el crecimiento investigativo de Panamá.

## II. DEDICATORIA.

“A MIS PADRES”

“A MI ABUELA”

“A MIS FAMILIARES”

“A MIS AMIGOS”

### III. TABLA DE CONTENIDOS.

I. AGRADECIMIENTO.....	ii
II. DEDICATORIA.....	iii
III. TABLA DE CONTENIDOS.....	iv
IV. LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	vi
V. LISTA DE GRÁFICOS.....	vii
VI. INTRODUCCIÓN.....	viii
VII. RESUMEN.....	xii
CAPÍTULO 1.....	1
1. ASPECTOS GENERALES.....	2
1.1 ANTECEDENTES.....	2
1.2 SITUACIÓN ACTUAL DE PROBLEMA.....	8
1.3 HIPÓTESIS.....	9
1.4 OBJETIVOS.....	10
Objetivo General.....	10
Objetivos Específicos.....	10
1.5 DELIMITACIÓN, ALCANCE Y COBERTURA.....	10
1.6 LIMITACIONES.....	11
CAPÍTULO 2.....	13
2. MARCO TEÓRICO.....	14
2.1 AGUAS RESIDUALES.....	14
2.2 GENERALIDADES DE LAS MICROALGAS.....	18
2.3 MICROALGA EN ESTUDIO ( <i>Chlorella sorokiniana</i> ).....	20
2.4 DEPURACIÓN DE AGUAS RESIDUALES CON MICROALGAS.....	22
2.5 METABOLISMO DE NITRÓGENO Y FÓSFORO POR MICROALGAS.....	26
2.5.1 NITRÓGENO (Gonçalves, Pires y Simões, 2017).....	26
2.5.2 FÓSFORO (Gonçalves, Pires y Simões, 2017).....	27
CAPÍTULO 3.....	29
3. TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	30
3.1 DEFINICIÓN.....	30
3.2 JUSTIFICACIÓN.....	30

3.3 DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES.....	31
3.4 POBLACIÓN.....	31
3.4.1 MUESTRA.....	31
3.4.2 TIPO DE MUESTREO.....	32
3.5 MÉTODOS E INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN.....	32
3.5.1 MÉTODOS.....	32
3.5.2 INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN.....	38
CAPÍTULO 4.....	39
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
4.1 CRECIMIENTO DE INÓCULO DE <i>Chlorella sorokiniana</i> .....	40
4.2 CRECIMIENTO DE <i>Chlorella sorokiniana</i> (mg/L) EN MEDIO CONTROL (MC25%) Y AGUA RESIDUAL (AR1, AR2, AR3, AR4 y AR5).....	40
4.3 CONDICIONES DE OPERACIÓN (PH, TEMPERATURA Y LUZ).....	46
4.4 EVALUACIÓN DEL CONSUMO DE NUTRIENTES (NITRATOS Y FOSFATOS). ....	50
CAPÍTULO 5.....	60
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	61
CAPÍTULO 6.....	62
6. BIBLIOGRAFÍA.....	63
ANEXOS.....	72
7.1 CRECIMIENTO CELULAR-CURVA DE ABS VS CONCENTRACIÓN.....	73
7.2 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA ANÁLISIS DE NITRATOS.....	74
7.3 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA ANÁLISIS DE FOSFATOS.....	76
7.4 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS TOTALES.....	79
7.5 ANÁLISIS DE PIGMENTOS TOTALES (CLOROFILAS Y CAROTENOIDES). ....	79
7.6 ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS.....	80
7.7 ANÁLISIS DE LÍPIDOS.....	82
7.8 MUESTREO SIMPLE DEL AGUA RESIDUAL PARA LLEVAR A CABO LOS EXPERIMENTOS.....	83
7.9 ESTABLECIMIENTO DE LOS EXPERIMENTOS Y CRECIMIENTO DE <i>Chlorella sorokiniana</i> , APLICANDO AGUA RESIDUAL Y UN MEDIO CONTROL (M8).....	85
7.10 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRATOS Y FOSFATOS EN LOS CULTIVOS CON AGUA RESIDUAL, MÉTODO DE REDUCCIÓN POR CADMIO (IZQUIERDA) Y MÉTODO DE AZUL DE ÁCIDO ASCÓRBICO (DERECHA). ....	86
7.11 EVALUACIÓN DE CRECIMIENTO CELULAR, PRODUCTIVIDAD DE BIOMASA Y PH.....	87

7.12 DETERMINACIONES ANALÍTICAS A LA BIOMASA GENERADA: HUMEDAD, PROTEÍNAS TOTALES, LÍPIDOS TOTALES, CARBOHIDRATOS DISPONIBLES, PIGMENTOS.....	88
---	----

#### IV. LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.

##### CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Contenido de nitrógeno total (NT) y fósforo total (FT) en diferentes aguas residuales .....	15
<b>Cuadro 2.</b> Calidad de diferentes aguas residuales de procesamiento de alimentos .....	16
<b>Cuadro 3.</b> Grupos más importantes de microalgas en términos de abundancia .....	18
<b>Cuadro 4.</b> Contenido de lípidos y productividad de diferentes especies de microalgas.....	22
<b>Cuadro 5.</b> Sistemas basados en microalgas para diferentes tratamientos de aguas residuales .....	25
<b>Cuadro 6.</b> Composición química del medio M8a. ....	34
<b>Cuadro 7.</b> Biomasa final en medio control (MC25%) y en las distintas aguas residuales (AR1, AR2, AR3, AR4 y AR5).....	43
<b>Cuadro 8.</b> Concentraciones iniciales de nitratos y fosfatos (mg/L) presentes en las aguas residuales utilizadas y medio control .....	43
<b>Cuadro 9.</b> Temperatura, pH y Luz presente en medio control (MC25%) y los distintos cultivos de agua residual (AR1, AR2, AR3, AR4 y AR5). ....	46
<b>Cuadro 10.</b> Resumen para la eliminación de nutrientes (Nitratos y Fosfatos) en agua residual (AR1, AR2, AR3, AR4 y AR5).....	51
<b>Cuadro 11.</b> Resumen de consumo final (ppm) de nitratos y fosfatos en agua residual (AR1, AR2, AR3, AR4 y AR5).....	51
<b>Cuadro 12.</b> Análisis bioquímico proximal de biomasa obtenida.....	55

##### FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Chlorella sorokiniana</i> .....	21
<b>Figura 2.</b> Mecanismo de eliminación de nitrógeno y fósforo de aguas residuales por microalgas (Gupta, Pawar, y Pandey, 2019).....	28
<b>Figura 3.</b> Preparación para inóculo de <i>Chlorella sorokiniana</i> en medio de cultivo M8a (MC25%)-300 mL .....	33
<b>Figura 4.</b> Preparación para inóculo de <i>Chlorella sorokiniana</i> en agua residual.....	35
<b>Figura 5.</b> Crecimiento de <i>Chlorella sorokiniana</i> en medio M8a (MC25%) y agua residual (AR1, AR2, AR3, AR4 y AR5).....	36
<b>Figura 6.</b> Estructura de Kegglin con el átomo de fósforo central en naranja, los átomos de molibdeno en violeta y los de oxígeno en rojo. ....	78

## V. LISTA DE GRÁFICOS.

<b>Gráfico 1.</b> Crecimiento de inóculo de <i>Chlorella sorokiniana</i> .....	40
<b>Gráfico 2.</b> Crecimiento de <i>Chlorella sorokiniana</i> en AR1 y medio control (MC25%).....	40
<b>Gráfico 3.</b> Crecimiento de <i>Chlorella sorokiniana</i> en AR2 y medio control (MC25%).....	41
<b>Gráfico 4.</b> Crecimiento de <i>Chlorella sorokiniana</i> en AR3 y medio control (MC25%).....	41
<b>Gráfico 5.</b> Crecimiento de <i>Chlorella sorokiniana</i> en AR4 y medio control (MC25%).....	42
<b>Gráfico 6.</b> Crecimiento de <i>Chlorella sorokiniana</i> en AR5 y medio control (MC25%).....	42
<b>Gráfico 7.</b> Eliminación de nitratos en agua residual (AR1, AR2, AR3, AR4 y AR5) por <i>Chlorella sorokiniana</i> .....	50
<b>Gráfico 8.</b> Eliminación de fosfatos en agua residual (AR1, AR2, AR3, AR4 y AR5) por <i>Chlorella sorokiniana</i> .....	51
<b>Gráfico 9.</b> Curva de calibración para análisis de crecimiento celular.....	73
<b>Gráfico 10.</b> Curva de calibración para la determinación de Nitratos ( $\text{NO}_3^{-1}$ ).....	75
<b>Gráfico 11.</b> Curva de calibración para la determinación de fosfatos ( $\text{PO}_4^{-3}$ ).....	77
<b>Gráfico 12.</b> Curva de calibración obtenida para análisis de proteínas.....	79
<b>Gráfico 13.</b> Curva de calibración obtenida para análisis de carbohidratos.....	81

## VI. INTRODUCCIÓN.

La población mundial aumenta y se concentra en los centros urbanos, esta tendencia se refleja mayormente en los países en desarrollo, donde se espera que 2.1 billones de personas más vivan en estas ciudades en 2030 (United Nation, 2012). Lo que conlleva a una producción de millones en toneladas de desechos cada año, incluidos lodos y aguas residuales, donde el destino de estos residuos es muy diferente según el contexto local: pueden ser recogido o no, tratado o no y finalmente utilizado de forma directa, indirecta o finalmente sin uso beneficioso (Mateo-Sagasta, Raschid-Sally y Thebo, 2015). Las aguas residuales se pueden definir como "aguas descargadas de hogares, negocios, industria, ciudades y agricultura" (Asano y otros, 2007). Según esta definición hay tantos tipos de aguas residuales, por ejemplo, aguas residuales urbanas, alimentarias, agrícolas e industriales. Los componentes mayoritarios de muchas de estas aguas residuales son los compuestos con nitrógeno (N), fósforo (P), oxígeno (O) y Carbono (C), éstos contribuyen al proceso de eutrofización y contaminación en grandes masas de agua como lagos, ríos y océanos si se descargan de forma inadecuada (Liu, y otros, 2014). El nitrógeno en efluentes de aguas residuales se deriva principalmente de interconversiones metabólicas de los compuestos extraderivados (proteínas, ureas, aminas y aminoácidos), mientras que el 50 % o más de fósforo surge de detergentes sintéticos, carbono y oxígeno están presente en su mayoría en materia orgánica (Horan, 1990). Otros constituyentes inorgánicos presentes en aguas residuales son el sodio, calcio, potasio, magnesio, cloro, azufre, bicarbonato, sales de amonio (Lim y otros, 2010); además de metales pesados proveniente de aguas residuales industriales (Oyebamiji y otros, 2019).

Para contrarrestar los problemas de aguas residuales existen las plantas de tratamiento, estas tienen como función básica acelerar los procesos naturales de depuración. Los procesos de tratamiento generalmente se dividen en físico, químico y biológico, todo tratamiento convencional combina etapas primaria, secundaria y terciaria, con la colaboración de instalaciones y el equipo adecuado para cada fin (Serdarevic y Dzibur, 2018). Las zonas urbanas y desarrolladas han logrado un avance significativo en el tratamiento de aguas residuales en comparación con las

zonas rurales, las plantas de tratamiento de aguas residuales representan una de las principales inversiones debido al alto costo de capital, operación y mantenimiento, afectando a países en desarrollo con presupuestos locales restringidos, falta de experiencia local, y la falta de financiación (Massoud, Tarhini y Nasr, 2009). Los países subdesarrollados no cuentan con tratamientos de aguas residuales eficientes, muchas de sus infraestructuras son precaria, obsoleta e insuficiente, lo que representa un riesgo no solo para los habitantes de las zonas por donde circulan estas aguas, sino a la sociedad en su conjunto, los ecosistemas y el medio ambiente (Ferro y Lentini, 2012). Para buscar una solución económica y amigable al ambiente, diversos investigadores en todo el mundo han propuesto un mejoramiento y purificación de las aguas empleando técnicas de biorremediación, utilizando microalgas (ficorremediación). La ficorremediación es el uso de microalgas y / o macroalgas para eliminar o transformar contaminantes, incluidos nutrientes y productos químicos tóxicos de las aguas residuales, y gases de efecto invernadero del medio ambiente con producción simultánea de biomasa (Brar y otros, 2020). El uso de microalgas para aplicaciones de ficorremediación, ha recibido una atención significativa debido a la capacidad de las microalgas de asimilar contaminantes para apoyar sus actividades metabólicas en un período corto (Singh y otros, 2020); además, esta aplicación comprende una reducción de costos sobre métodos convencionales de depuración de aguas residuales (Nagarajan y otros, 2020). Células de microalgas tienen un mayor crecimiento y altas tasas de fijación, lo que convierte su biomasa en una materia prima prometedora para productos de alto valor en diversas aplicaciones, como productos nutricionales y para la salud humana, cosméticos, biocombustibles, productos farmacéuticos, acuicultura, alimentos para animales, biofertilizantes, agentes antimicrobianos, agentes antivirales y agentes contra el cáncer (Emparan y otros, 2020). Durante el proceso de selección de cepas de algas para el tratamiento de aguas residuales se establecen múltiples criterios, que incluyen (1) tasa de crecimiento rápido; (2) alta tasa de eliminación de nutrientes; (3) fuerte adaptabilidad a diferentes tipos de aguas residuales y al clima local; y (4) alta productividad de biomasa. Cuando no se pueden cumplir varios criterios, la primera opción de "tasa de crecimiento rápido" debería ser el mejor para perseguir ya que una alta tasa de crecimiento indica la

adaptabilidad de una cepa seleccionada, que a menudo se relaciona positivamente con una alta tasa de eliminación de nutrientes y resistencia (Miyawaki y otros, 2020; Li y otros, 2019). Según los investigadores Li y otros (2019) las especies ampliamente utilizadas para tratamiento de aguas residuales son *Chlorella sp.*, que incluye *C. emersonii*, *C. kessleri*, *C. pyrenoidosa*, *C. sorokiniana*, *C. vulgaris* y *C. reinhardtii*; Además, hay algunas cepas de otras especies, como *Anabaena sp.* (*A. Doliolum*, *A. flosaquae*), *Arthrospira sp.* (*A. platensis*), *Auxenochlorella sp.* (*A. protothecoides*), *Botryococcus sp.* (*B. braunii*), *Chlamydomonas sp.* (*C. reinhardtii*), *Desmodesmus sp.*, *Dunaliella sp.* (*D. salina*), *Haematococcus sp.* (*H. pluvialis*), *Hindakia sp.*, *Isochrysis sp.* (*I. galbana*), *Nanocloropsis sp.*, *Neochloris sp.* (*N. oleoabundans*), *Microcystis sp.* (*M. aeruginosa*), *Oscillatoria sp.*, *Phaeodactylum sp.* (*P. tricornutum*), *Phormidium sp.* (*PAGS. bohneri*, *P. laminosum*), *Scenedesmus sp.* (*S. bicellularis*, *S. bijugatus*, *S. dimorphus*, *S. intermedius*, *S. obliquus*, *S. quadricauda*, *S. rubescens*), *Spirulina sp.* (*S. maxima*), *Synechococcus sp.* (*S. alarga*), *Trentepohlia sp.* (*T. aurea*). Nuestra investigación utiliza como microorganismo principal *Chlorella sorokiniana*, en nuestro centro de investigación (CIPNABIOT) ha sido empleada en estudios para el aprovechamiento de compuestos bioactivos y en estudios pioneros basados en tratamiento de aguas residuales. El objetivo principal de nuestra investigación fue evaluar la capacidad de la microalga *Chlorella sorokiniana* para depurar aguas residuales urbanas, agrícolas e industriales. Inicialmente la *Chlorella sorokiniana* fue cultivada, inoculada; luego se evaluó su comportamiento en un medio control y en cinco tratamientos a base de agua residual de distintas procedencias AR1: Supermercado, AR2: Ganadería, AR3: Urbana, AR4: Universidad, AR5: Restaurante. Se analizó el crecimiento celular y productividad de biomasa, en conjunto con un análisis proximal de la biomasa. La cuantificación y determinación de la concentración de contaminantes (nitratos y fosfatos) se realizó al inicio y durante la fase de crecimiento de la *Chlorella sorokiniana*.

Actualmente los problemas de contaminación asociados con el agua por presencia de contaminantes son una de las principales preocupaciones de la sociedad panameña. Por lo tanto, en términos de salud, medio ambiente y económicos, la lucha contra la contaminación por aguas residuales con altas concentraciones de N y P es un

problema de gran importancia. Una alternativa para eliminar contaminantes en aguas, se ha estado mencionando en este documento el cual es el uso de microalgas, se han llevado a cabo estudios sobre las microalgas y éstas han presentado un alto potencial como herramienta para la depuración de aguas residuales, ayudando a evitar la contaminación de los recursos hídricos. Los resultados de estos estudios muestran porcentajes de eliminación que alcanzan el 100% en algunos casos. A futuro la fitorremediación irá progresando en Panamá y podrá aplicarse en industrias principalmente alimentarias donde se generan grandes cantidades de aguas residuales, trayendo como resultado la recuperación y reutilización de recurso natural tan vital como lo es el agua, reduciendo la contaminación, favoreciendo las necesidades de abastecimiento y reduciendo los costos de producción. El agua reutilizable podrá ocuparse para el riego de cultivos. En el caso del procesamiento de alimentos la misma podrá ser utilizada para lavado, transporte y limpieza, e incluso para refrigeración o generación de vapor.

## VII. RESUMEN.

El tratamiento de las aguas residuales es cada vez más imperativo antes de ser vertidas a efluentes, para evitar la contaminación ambiental y enfermedades. Según el Banco Interamericano de Desarrollo, 2017, se estima que en América Latina y El Caribe (ALC) el 77 % de la población de América Latina y el Caribe carece de acceso a saneamiento seguro, se estima que únicamente el 28 % de las aguas residuales recolectadas por la red pública recibe algún tipo de tratamiento antes de ser vertida en el ambiente, contribuyendo al deterioro de la calidad de los cuerpos receptores de agua donde Panamá no escapa de esta realidad, por ello es muy importante plantear métodos alternativos, económicos, amigables al ambiente, contribuyendo a contrarrestar dicha problemática. El uso de microalgas es una opción factible, el principal potencial de las microalgas en la depuración de aguas residuales urbanas se fundamenta en su capacidad de asimilación de componentes y en la eliminación de nitrógeno y fósforo. Entre las especies reportadas para este fin están la microalga *Chlorella sorokiniana* y *Chlorella vulgaris* que presentan especial tolerancia a medios con elevada concentración en contaminantes y a condiciones extremas. En esta investigación la microalga utilizada fue *Chlorella sorokiniana* y el objetivo principal se basó en evaluar su crecimiento y capacidad para depurar aguas residuales de distintas procedencias. Inicialmente la *Chlorella sorokiniana* fue cultivada, inoculada; luego se evaluó su crecimiento en un medio control (MC25%) y en cinco tratamientos a base de agua residual de distintas procedencias (AR1: Supermercado, AR2: Ganadería, AR3: Urbana, AR4: Universidad, AR5: Restaurante) los resultados de crecimientos obtenidos se encuentran entre 1.194 g/L a 1.466 g/L con diferencia significativas entre los ensayos y el medio control ( $P < 0.05$ , análisis de varianza de un factor y prueba de Tuckey). Seguidamente se analizaron durante el cultivo las condiciones de temperatura y pH, obteniendo valores (T: 21-23 °C y pH: 7-8) que se encuentran entre lo recomendado para el crecimiento de *Chlorella sorokiniana*. La intensidad de luz suministrada a cada cultivo fue baja ( $< 100 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ). Los % de depuración de nitratos se encuentran entre los 58% y 87%, con diferencia significativas de

depuración entre ensayos ( $P < 0.05$ , análisis de varianza de un factor y prueba de Tuckey). los resultados de depuración de fosfatos también presentaron diferencias significativas entre ensayos ( $P < 0.05$ , análisis de varianza de un factor y prueba de Tuckey), los resultados se encontraban entre los 74 y 100% de eliminación. Los resultados en la biomasa fueron variados con diferencia significativas entre ensayos ( $P < 0.05$ , análisis de varianza de un factor y prueba de tuckey), los lípidos entre ensayos se encontraban por los 0.733 a 1.900 mg/L, proteínas entre 7.250 a 19.240 mg/L, clorofilas entre 8.720 a 20.153  $\mu\text{g/mL}$ , carotenoides entre 2.543 a 4.585  $\mu\text{g/mL}$  y carbohidratos entre 15.313 a 20.517 mg/L. Observando los datos de crecimiento, depuración y composición bioquímica de biomasa, se llega a la conclusión que *Chlorella sorokiniana* presentó resultados de adaptabilidad en aguas residuales que son positivos, relevantes y comparables con otros estudios de mayor excelencia.

# CAPÍTULO 1

## 1. ASPECTOS GENERALES

### 1.1 ANTECEDENTES

Desde el momento en que aparecieron las primeras poblaciones estables, la eliminación de los residuos ha constituido un problema importante para la sociedad, hoy en día el mundo ha venido observando con inquietud, analizando y tratando de resolver una serie de problemas relacionados con la disposición de los residuos líquidos procedentes del uso doméstico, agrícola e industrial (Centeno Calderón, Quintana Díaz y López Fuentes, 2019).

El natural crecimiento demográfico y la generación de un volumen respetable de aguas residuales, particularmente en las zonas urbanas, están provocando serias alteraciones ecológicas, deteriorando paulatinamente los recursos naturales del entorno (Masud, Yeasmin, Hasan y Kamruzzaman, 2022). Se ha indicado el interés de los investigadores por el uso de microalgas para llevar a cabo purificación de aguas residuales, la importancia y aplicación de estos microorganismos en el tratamiento de aguas residuales es de gran relevancia actual, debido a que ayuda a prevenir problemas a largo plazo, entre los cuales se encuentran riesgos para la salud y contaminación (Torres-Franco y otros, 2021). El uso de microalgas, permite la remoción del fósforo y el nitrógeno del agua, a que son parte de los nutrientes requeridos por estos organismos (Mazzeo y otros, 2002). Adicionalmente, estos microorganismos pueden usar químicos residuales e integrarlos a su metabolismo, remover metales pesados mediante adaptación y de la misma forma, tolerar y eliminar compuestos altamente tóxicos presentes en aguas contaminadas provenientes de diversas fuentes (Abdel-Raouf y otros 2012). Su amplia diversidad, les permite a las microalgas adaptarse a un gran número de ambientes en los cuales pueden formar consorcios con otros microorganismos (hongos y bacterias) que tienen un efecto de sinergia degradativo en los diferentes ambientes contaminados (Ranuka y otros, 2015).

Entre los primeros estudios para el tratamiento de aguas residuales empleando microalgas está el reportado por Cadwell (1946) quien señaló que estos microorganismos tienen una alta capacidad depuradora; también Oswald (1957)

describe otro proceso conocido como lagunaje para depurar. Seguidamente en 1960 los investigadores Witt y Borchardt, diseñaron un estudio para establecer datos fundamentales que permitía la eventual aplicación de cultivo de algas (*Scenedesmus sp* y *Chlorella sp*) para la eliminación de nutrientes en aguas residuales. También se llevó a cabo un estudio a escala de laboratorio para determinar la facilidad de usar algas (*Chlorella sp.*, *Scenedesmus sp*, *Oscillatoria sp* y *Microsistis sp*) que puedan crecer en aguas residuales con altas concentraciones de metales pesados, las microalgas utilizadas lograron remover 70 % de cadmio y cobre, 20 % de cromo (Filip y otros, 1979). En el año 1985 los investigadores Chevalier y de la Noüe utilizaron *Scenedesmus sp* para la absorción de nitrógeno en agua residual, la reducción de  $N-NH_4^+$  fue del 90 % en 4 horas a pH 9 y del 70% en 5 horas a un pH ajustado de 7,7.

Dos especies diferentes de microalgas fotosintéticas, *Chlorella pyrenoidosa* y *Scenedesmus sp.*, se cultivaron en filtrados de aguas residuales sedimentadas con el objetivo de reducir la carga de nutrientes del agua residual, al final de este estudio, más del 80% del total de fósforo y el nitrógeno inorgánico presentes en las aguas residuales sedimentadas se lograron reducir (Tam y Wong, 1989). Garbisu y otros (1994) plantearon como objetivo realizar un estudio inicial de la viabilidad de utilizar *Phormidium laminosum* inmovilizadas con polivinilo (PV) para la eliminación de nitratos, nitritos y fosfatos del agua potable potencialmente contaminada, los biorreactores de flujo continuo con agitación de aire mostraron eficiencias de eliminación de Nitrógeno de hasta 90% para tiempos de residencia de 14 h en experimentos a corto plazo. En 1995 los investigadores Lau y otros, emplearon experimentos por lotes a escala de laboratorio para examinar el efecto de la microalga *Chlorella vulgaris* para eliminar nutrientes en aguas residuales, en 10 días al final del estudio más del 90 % de  $N-NH_4^+$  Y 80 % de  $P-PO_4^{3-}$  fueron eliminados. En otra investigación Craggs y otros (1997) aislaron 2 microalgas marinas (*Phaeodactylum tricorutum*, y *Oscillatoria sp.*) para determinar su capacidad de eliminar el  $NH_4^+$  y  $PO_4^{3-}$  en aguas residuales diluidas con agua de mar, en un periodo de cuatro meses la eliminación del amonio y el fosfato fue de un 100%.

Un estudio realizado por Ogbonna y otros (2000) empleando *Chlorella sorokiniana*, muestra la eliminación significativa de 400 ppm de amoníaco en aguas residuales sintéticas; además observaron un crecimiento favorable de esta especie bajo ausencia de luz. Muñoz, Guieysse y Mattiasson en 2003, utilizaron un consorcio de algas y bacterias formado por *Chlorella sorokiniana* y una *Pseudomonas migulae* que degrada el fenantreno. La cepa pudo biodegradar 200-500 mg/L de fenantreno disuelto en aceite de silicona o tetradecano en condiciones fotosintéticas y sin ningún suministro externo de oxígeno. El fenantreno solo se eliminó cuando se proporcionó en un disolvente orgánico, lo que confirma el potencial de los sistemas de dos fases para reducir la toxicidad. En otra investigación Hernández (2004) utilizó dos especies de microalgas del género *Chlorella* (*Chlorella vulgaris* y *Chlorella sorokiniana*), co-inmovilizadas en esferas de alginato de sodio con una bacteria promotora de crecimiento *Azospirillum brasilense*, para la depuración de nutrientes de las aguas residuales domésticas. La depuración de nitrógeno y fósforo fue superior en el sistema co-inmovilizado con los dos microorganismos, en comparación con el efecto que producía la microalga sola. Los porcentajes de eliminación en aguas residuales domésticas (ARD) oscilaron desde 94% para nitratos y 92% para el fósforo donde existían los dos microorganismos; comparado a un 84% de nitrato y 89% de fósforo, eliminados cuando la microalga estaba sola. Adicionalmente este investigador experimentó con *Chlorella sorokiniana* para observar cuanta cantidad de fosforo era eliminado en ayuno previo de 72 horas, en los resultados obtenidos se observó que el crecimiento poblacional no se vio afectado por el ayuno, pero la eliminación de fósforo fue más eficiente en estos cultivos.

Los investigadores Liu y otros (2012) realizaron un experimento donde se analizó la eliminación de nitrógeno y fósforo por *Chlorella sorokiniana* inmovilizada en alginato de calcio, todo esto llevado a cabo en diferentes condiciones: autotróficas, heterotróficas, mixotróficas y micro – aeróbicas. Se comprobó que tanto las células inmovilizadas como las células libres crecieron mejor bajo condiciones micro – aeróbicas en comparación con las otras condiciones. En los resultados se confirma que las células inmovilizadas tenían una tasa más alta de eliminación de nitrógeno (21,84 %, 43,59 % y 41,46 %) en comparación con las células de microalgas libres

(14,35 %, 38,57 % y 40,59 %), bajo condiciones autotróficas, heterotróficas, y micro – aeróbica respectivamente. A su vez las células inmovilizadas de microalgas tenían la tasa más alta de eliminación de fósforo (87,49 %, 88,65 % y 84,84 %) en comparación con las células de microalgas libres (20,21 %, 42,27 % y 53,52 %) bajo condiciones heterotróficas, mixotróficas y micro – aeróbicas respectivamente.

Los investigadores Lizzul y otros (2014), exploraron si las aguas residuales pueden reemplazar el material de alimentación convencional para la producción de biomasa microalgal a partir de *Chlorella sorokiniana*. Los resultados señalan que la especie *Chlorella sorokiniana* crece correctamente en estas aguas; además esta microalga resultó eficiente en la eliminación de nitrógeno total en un periodo entre 48 y 96 h.

Los científicos Solovchenko y otros en el año 2014 investigaron las posibilidades de una biorremediación en aguas residuales de una destilería de alcohol, empleando *Chlorella sorokiniana* cultivada en semi-continuo en un fotobiorreactor de alta densidad monitoreado en línea la clorofila a través de fluorescencia. Tras la inoculación se formó un consorcio alga- bacteria estable logrando disminuir durante cuatro días, (95%) nitrato, (77%) fosfato y sulfato (35%).

Ramanna y otros (2014), evaluaron el potencial de las fuentes de nitrógeno que complementa las aguas residuales domésticas para el cultivo de microalgas. (urea, nitrato de potasio, nitrato de sodio y nitrato de amonio) fueron evaluados por su efecto en el cultivo y producción de lípidos en *Chlorella sorokiniana*. Con urea se mostró el más alto rendimiento de biomasa de 0,220 g/L y fue seleccionado para la experimentación adicional. Una concentración de 1,5 g/L de urea produjo 0,218 g/L de biomasa y 61,52 % de lípidos. La urea resultó ser un suplemento de nitrógeno eficaz para el cultivo de *C. sorokiniana* en las aguas residuales.

Posteriormente Gupta y otros (2016), realizaron un estudio donde se presenta una amplia investigación sobre la aplicabilidad de *Chlorella sorokiniana* en el tratamiento de aguas residuales sin necesidad de ningún tratamiento adicional. Los resultados muestran la eliminación de nitrógeno ( $86,93 \pm 3,49$  %) y eliminación de fósforo ( $68,24 \pm 11,69$  %). Además, *Chlorella sorokiniana* demostró gran adaptabilidad a las tensiones fisiológicas y puede ser adecuada para lograr un tratamiento integral y

acumulación de lípidos. En otro estudio se utilizó aguas residuales municipales en varias etapas del proceso de tratamiento como medio de crecimiento potencial para *Chlorella sorokiniana* bajo diferentes modos de cultivo, este estudio demostró una eliminación eficiente de amonio (94,29%) y fosfato (83,30%) por parte de *Chlorella sorokiniana* (Ramsundar y otros, 2017).

La microalga aislada *Chlorella sorokiniana* con código BENHA721\_ABO4 se cultivó en medio control (BBM), aguas residuales municipales (WW) y aguas residuales enriquecidas con elementos (WW+). El cultivo en WW+ mostró el mayor número de células que representó el 25,3 y el 47,3% sobre el cultivado en WW y BBM, respectivamente. El cultivo de microalgas en WW durante 10 días mostró una eficiencia de remoción de 74.2, 83.3 y 78.0% para  $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{NH}_3^-$ -N y Fosforo Total, respectivamente (Eladel y otros, 2019).

Khalid y otros (2019) utilizaron *Chlorella sorokiniana* para eliminar el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y el fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) del efluente de un molino de aceite de palma. Se empleó la metodología de superficie de respuesta (RSM) para evaluar las interacciones de tres factores influyentes principales, es decir, la intensidad de la luz, el fotoperíodo y el tamaño del inóculo, y sus efectos sobre la eficiencia de eliminación de nutrientes. La preferencia de nutrientes, composición elemental de biomasa y también se investigó el mecanismo de eliminación de nutrientes de las microalgas. En las condiciones óptimas (200  $\mu\text{mol}$  fotón  $\text{m}^{-1}$ , fotoperíodo de 12 h y tamaño del inóculo del 28%), se eliminaron con éxito el 93,36% de  $\text{NH}_4^+$  y el 94,50% de  $\text{PO}_4^{3-}$ .

En 2019 los investigadores Asadi, Rad y Qaderi evaluaron el comportamiento de *Chlorella sorokiniana* y *Chlorella vulgaris* en aguas residuales de industrias lácteas. La eficiencia reportada de remoción de nitrato, amoníaco, fosfato y la demanda química de oxígeno para *Chlorella sorokiniana* y *Chlorella vulgaris* en ambos efluentes fue de más del 80%. En otro estudio, se examinaron tres cepas de microalgas autóctonas (*Chlorella sorokiniana* AK-1, *Chlorella sorokiniana* MS-C1 y *Chlorella sorokiniana* TJ5) para determinar su capacidad de crecimiento en aguas residuales porcinas sin tratar. *Chlorella sorokiniana* AK-1 mostró la mejor tolerancia a las aguas residuales porcinas y obtuvo la mayor concentración de biomasa (5,45 g/L) y productividad de

proteínas (0,27 g/L/d). La eficiencia de remoción de DQO, Nitrógeno y fosforo total para las aguas residuales porcinas fue de 90,1, 97,0 y 92,8%, respectivamente (Chen y otros, 2020). Un estudio bajo limitación de luz utilizando *Chlorella sorokiniana* se llevó a cabo por Fan y otros en 2020, se evaluó el tratamiento de aguas residuales por parte de *Chlorella sorokiniana* en condiciones heterotróficas oscuras (24 h de oscuridad, período de oscuridad de 12 h/12 h de luz/oscuridad). El rendimiento dependió en gran medida de la relación lodo/algas con la mejor relación inicial de 1: 2, donde se mostró una mayor eliminación de  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  y P (en un 6% y 10%, respectivamente), una eliminación de DQO similar y una mejor capacidad de sedimentación.

En Panamá la depuración de aguas residuales empleando microalgas ha sido aplicada en el centro de Investigación de Productos Naturales y Biotecnología (CIPNABIOT-UNACHI), cuando el licenciado Vega en 2016-2017 realizó una depuración de aguas residuales procedentes de un supermercado utilizando *Chlorella sorokiniana*, con eliminación de fosfatos y nitratos arriba del 70 %. Actualmente en el CIPNABIOT se proponen investigaciones donde se busca depurar aguas residuales de distintas procedencias, con el propósito futuro de dar apoyo y alternativas para contrarrestar el problema que causan las aguas residuales a nivel nacional.

## 1.2 SITUACIÓN ACTUAL DE PROBLEMA

El tratamiento y la reutilización del agua juegan un papel fundamental en la administración y manejo de este recurso en todos los países, especialmente en aquellos que presentan problemas de escasez. De acuerdo a MI AMBIENTE Panamá produce un volumen de descarga de aguas residuales diarias de 59,611,211.9 m<sup>3</sup> y 10,360,494.85 toneladas de materia orgánica que representa más de 3 mil millones de m<sup>3</sup> al año, reduciendo así significativamente la disponibilidad de agua en algunas cuencas hidrográficas del país. La Planta de Tratamiento de Juan Díaz es el destino final de muchas de las aguas que se recolectan en la Ciudad de Panamá, en busca de mejorar su calidad e impacto en el ambiente. Alrededor de 900 millones de dólares se han invertido en el saneamiento de aguas de la ciudad de Panamá, después de varios años de iniciado el proyecto que hoy en día va para su segunda fase. El 70.3% (1,398,473 habitantes en Panamá) de las aguas residuales reciben tratamiento, a través de lagunas de oxidación, tanques sépticos y tanques Inhoff, existiendo un déficit de sistemas de tratamiento, además muchos de los que existen no son adecuados tecnológicamente. En el interior del país y en otras provincias la situación es preocupante, algunas ciudades como David, Santiago, Chitré y Las Tablas, poseen lagunas de estabilización que tratan solo una porción de las aguas residuales de cada región. En la provincia de Chiriquí el Instituto de Acueductos y Alcantarillados Nacionales de Panamá (IDAAN) en conjunto con la empresa privada construyen una nueva red de saneamiento en la Ciudad David (250,000 habitantes), pero a la fecha el proyecto no ha culminado. Con la ausencia de un buen tratamiento o una planta fija, las aguas residuales seguirán siendo vertidas en aguas superficiales, creando un riesgo obvio para la salud humana, el medio ambiente y sistemas ecológicos de nuestra región.

Para la solución de la problemática de contaminantes presentes en aguas residuales existe un proceso factible que ha ido creciendo con el pasar de los años, este proceso se basa en la depuración en sistemas controlados a base de microalgas. A partir de los años 40 diversos científicos de todo el mundo han enfocado sus investigaciones en las microalgas, ésto es debido a su alto potencial en depuración de aguas y la

solución de problemas ambientales, donde estudios realizados a la fecha han demostrado que las microalgas del género *Chlorella*, *Phormidium*, *Botryococcus*, *Chlamydomonas*, *spirulina*, entre otras, tienen un alto potencial para eliminar contaminantes, convirtiendo a estos microorganismo en una posibilidad real para la eliminación de contaminantes presentes en aguas residuales.

Hasta la fecha la bibliografía de investigaciones o proyectos enfocados en la depuración de aguas residuales empleando especialmente la microalga *Chlorella sorokiniana* se desconocía en Panamá, debido a ésto es de gran interés realizar una investigación para conocer su capacidad ficorremediadora y los beneficios que puede aportar tanto para el medio ambiente como para los seres humanos en nuestra región. Por ello nos planteamos como pregunta de investigación la siguiente, **¿Qué capacidad tiene la microalga *Chlorella sorokiniana* para crecer y depurar aguas residuales con distintas procedencias?**, todo esto con el fin de generar resultados que permitan el uso de microalgas en la depuración de aguas residuales en Panamá.

### 1.3 HIPÓTESIS

**Ho:** No existe diferencia en la capacidad de *Chlorella sorokiniana* para eliminar nitratos y fosfatos en aguas residuales de distinta procedencia.

**Ha:** Existe diferencia en la capacidad de *Chlorella sorokiniana* para eliminar nitratos y fosfatos en agua residual de distinta procedencia.

**Ho:** No existe diferencia en el crecimiento de *Chlorella sorokiniana* cultivada en aguas residuales de distinta procedencia.

**Ha:** Existe diferencia en el crecimiento de *Chlorella sorokiniana* cultivada en aguas residuales de distinta procedencia.

**Ho:** No existe diferencia en el contenido de lípidos, proteína, clorofilas, carotenoides y carbohidratos presentes en la biomasa final de los cultivos con aguas residuales de distinta procedencia.

**Ha:** Existe diferencia en el contenido de lípidos, proteína, clorofilas, carotenoides y carbohidratos presentes en la biomasa final de los cultivos con aguas residuales de distinta procedencia.

## 1.4 OBJETIVOS

### Objetivo General

- Evaluar el crecimiento y capacidad depuradora de la microalga *Chlorella sorokiniana* cultivada en agua residuales de distinta procedencia (AR1: Supermercado, AR2: Ganadería, AR3: Urbana, AR4: Universidad, AR5: Restaurante).

### Objetivos Específicos

- Conocer las condiciones óptimas de T, pH y Luz para un cultivo de *Chlorella sorokiniana* en aguas residuales de distintas procedencias (AR1: Supermercado, AR2: Ganadería, AR3: Urbana, AR4: Universidad, AR5: Restaurante).
- Evaluar la concentración de contaminantes removidos (fosfatos y nitratos) por la microalga *Chlorella sorokiniana*.
- Valorar la productividad de biomasa empleando agua residual de distinta procedencia (AR1: Supermercado, AR2: Ganadería, AR3: Urbana, AR4: Universidad, AR5: Restaurante) como medio de cultivo.
- Conocer la concentración de lípidos, proteínas, pigmentos y carbohidratos presentes en la biomasa final de los cultivos con aguas residuales (AR1: Supermercado, AR2: Ganadería, AR3: Urbana, AR4: Universidad, AR5: Restaurante).

## 1.5 DELIMITACIÓN, ALCANCE Y COBERTURA

Con esta investigación se impulsarán las políticas del Programa de Ciencia, Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación para el Desarrollo Sostenible establecido en el PENCYT, en el fortalecimiento de actividades de investigación que permitan satisfacer las necesidades actuales de la población en aspectos muy importantes como la contaminación, seguridad alimentaria y saneamiento ambiental.

De igual manera se busca situar a Panamá como un país con capacidad técnica y científica para resolver problemáticas de aprovechamiento y depuración de aguas

residuales utilizando métodos amigables como la fitorremediación, el cual es un proceso ecológico sin contaminación secundaria que puede beneficiar a muchos sectores como el económico, salud, ambiental, industrial (alimentos) y académico.

El sector privado o más bien las industrias, sector agrario y alimentario pueden ser beneficiados con este tipo de investigación que establece un método eficaz para la depuración de aguas residuales. El tratamiento de este tipo de aguas es sumamente importante para la protección del medio ambiente. Los macros y micros nutrientes presentes en estas aguas son fuentes esenciales para el crecimiento de microalgas, lo que trae como resultado una depuración eficiente y la obtención de productos de valor agregado (biomasa).

La sociedad se ve beneficiada por este tipo de investigación debido a que se busca mejorar su calidad de vida, evitando la contaminación de fuentes hídricas naturales que son muy importantes para este sector, además de que se da la eliminación de contaminantes de un modo más factible y seguro desde el punto de vista ecológico, con los beneficios añadidos de la recuperación, tales como la utilización de aguas para riego y biomasa para fines de producción en biocombustibles, biofertilizantes, colorantes, entre otros.

El sector universitario también se ve beneficiado mediante la adquisición y transferencia de conocimiento que puede ser transmitido a sectores importantes de nuestra universidad como son las escuelas y programas de posgrado científicos, centros de investigación, entre otras.

## **1.6 LIMITACIONES**

La dimensión en este tipo de investigación genera limitaciones en muchos sentidos, tanto a nivel investigativo, científico y económico.

Existen factores científicamente comprobados que pueden tener un efecto significativo en el desempeño de la eficiencia para la eliminación de nutrientes y la productividad de biomasa por las microalgas, entre esos factores se encuentran las características de las aguas residuales, la intensidad de luz, la relación C/N y N/P, el suministro de CO<sub>2</sub> y el modo de cultivo.

Hoy en día se generan diferentes tipos de aguas residuales, cada una presenta componentes distintos que favorecen o no al crecimiento algal. Los niveles presentes de nutrientes en estas aguas, así como el pH, temperatura y sustancias tóxicas (como metales pesados, compuestos aldehídicos y fenólicos) podrían influir de una manera positiva o negativa en el crecimiento de algas, las tasas de recuperación de nutrientes y la productividad de la biomasa. Por otra parte, la intensidad de la luz como las condiciones de fotoperíodo son factores primarios que se relacionan con la eficiencia de eliminación de nutrientes y el crecimiento microalgal (producción de biomasa), existen muchos estudios que demuestran resultados positivos y negativos cuando se hace variaciones como irradiación de luz intensa, régimen de 12 h de luz-12 h de oscuridad, iluminación artificial continua de 24 h, entre otros.

Las proporciones C/N como N/P juegan también un papel importante en la asimilación de nutrientes, que no solo son cruciales para la productividad potencial sino también para el predominio de especies candidatas en cultivo (microalgas). El suministro adicional de carbono en forma de CO<sub>2</sub> también tiene un impacto en la ficorremediación, estudios han demostrado que la adición de CO<sub>2</sub> podría tener auge en la eliminación de fósforo, mientras que tiene efectos limitados en la eliminación de DQO y nitrógeno. El modo de cultivo es importante, los modos de autotrofia, heterotrofia y mixotrofia han demostrado diferencia cuando se aplican para procesos de ficorremediación, principalmente cuando se hace referencia a un favorecimiento en la simbiosis algas-bacterias para llevar a cabo el proceso de depuración.

Económicamente, este tipo de estudios se puede ver limitado por un análisis más amplio del agua residual, muchos de los reactivos necesarios para análisis como DQO, nitritos, nitratos, fosfatos, amonio, tienen un costo elevado. A su vez, el estudio puede verse limitado por la falta de equipos adicionales necesarios para los análisis mencionados anteriormente.

# CAPÍTULO 2

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 AGUAS RESIDUALES

Acien y otros, 2016 explican que la composición de las aguas residuales varía principalmente en función de la ubicación y las actividades predominantes en el entorno (agricultura, industria, granjas, entre otros). Hoy en día los cursos de agua reciben contaminación de muchas fuentes diferentes, que varían tanto en fuerza como en volumen, donde la composición de las aguas residuales es un reflejo de los estilos de vida y las tecnologías practicadas en la sociedad productora (Gray, 1989). Las aguas residuales son una mezcla compleja de materiales naturales orgánicos e inorgánicos, así como de compuestos artificiales (Abdel-Raouf, y otros, 2012).

Las grandes naciones y países desarrollados mantienen en su mayoría soluciones amigables para el cuidado del agua; sin embargo, en muchos países en desarrollo, la calidad del agua ha alcanzado un estado preocupante. Las aguas residuales municipales, agrícolas e industriales contienen una gran cantidad de contaminantes orgánicos e inorgánicos, como microplásticos, xenobióticos, metales pesados, alta concentraciones de nitratos, fosfatos y compuestos de carbono, siendo un peligro para la vida humana y los ecosistemas en general (Wollmann y otros, 2019).

Se puede hacer una mención más específica sobre los componentes contaminantes que conforman las aguas residuales de distinta procedencia (cuadro 1). Las aguas residuales de origen municipal han ido teniendo mayor auge debido al crecimiento económico-industrial, este tipo de agua presenta concentraciones variadas de nitrógeno y fósforo; sin embargo, las concentraciones de metales como plomo, zinc y cobre son más considerables (Cai, Park y Li, 2013). Para las aguas agrícolas las concentraciones de nitrógeno amoniacal, nitrógeno orgánico, fosfatos y demanda química de oxígeno (DQO) suelen ser altas, la relación de nitrógeno a fósforo (N / P) es típicamente 2–8 para las aguas residuales de los corrales de engorde de ganado lechero, porcino y vacuno (Kangas y Mulbry, 2014). La composición de las aguas residuales vertidas desde la industria es compleja, el carbono es deficiente y las concentraciones de nitrógeno y fósforo son más bajas con respecto a las concentraciones de metales pesados (Chinnasamy y otros, 2010; Wu y otros, 2012).

**Cuadro 1.** Contenido de nitrógeno total (NT) y fósforo total (FT) en diferentes aguas residuales (Cai, Park y Li, 2013).

Agua Residual	Descripción	NT (mg/L)	FT (mg/L)	N/P
<b>Municipal</b>	Agua Residual	15-90	5-20	3.3
<b>Animal</b>	Productos lácteos.	185-2636	30-727	3.6-7.2
	Aves de corral.	802-1825	50-446	4-16
	Cerdo.	1110-3213	310-987	3-7.8
	Corral de engorde carne vacuna	63-4165	14-1195	2.0-4.5
<b>Industrial</b>	Textil	21-57	1-9.7	2-4.1
	Bodega	110	52	2.1
	Curtiduría	273	21	13
	Papel	1.1-10.9	0.6-5.8	3-4.3
	Molino de oliva	532	182	2.9
<b>Efluente de digestión anaeróbica</b>	Estiércol de lechería.	125-3456	18-250	7.0-13.8
	Estiércol de aves de corral.	1380-1580	370-382	3.6-4.3
	Lodos de depuradora.	427-467	134-321	--
	Residuos de alimentos y estiércol lácteo.	1640-1885	296-302	--

Por otra parte, un procesamiento es vital para la cadena de suministro de un alimento y su huella hídrica es de gran consideración, no solo por la gran cantidad de agua utilizada en la fabricación, sino también para los importantes volúmenes de aguas residuales producidas. Las aguas residuales alimentarias surgen en su mayoría del procesamiento de alimentos como la soya, leche, papas, bebidas, cerveza, carnes,

aceites, con un contenido elevado de macromoléculas como carbohidratos, proteínas, lípidos y nutrientes como calcio, potasio, sodio, magnesio, manganeso, fósforo, nitrógeno, hierro, zinc y compuestos de azufre (Li y otros, 2019). Los componentes mayoritarios de aguas residuales alimentarias se muestran en el siguiente cuadro:

**Cuadro 2.** Calidad de diferentes aguas residuales de procesamiento de alimentos (Li y otros, 2019).

Agua Residual	pH	DQO (mg/L)	COT (mg/L)	NT (mg/L)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg/L)	FT (mg/L)
Soya	6.1	13215	--	267.1	52.1	56.3
Lácteos	7.8	2000-6000	120	300-400	300	20-70
Cervecería	3-11	2000-32500	--	25-450	5-21.6	0.5-216
Patatas	4.5	37000	--	620	190	560
Bodega	2.5-12.9	320-15900	41-7363	10-415	--	2-280
Matadero	4.9-8.1	500-15900	70-1200	50-841	--	25-200
Aceitunas	3.5-6.6	800-135000	7884-8759	50-300	--	107.7-120.2

*Notas: Carbono Orgánico Total (COT), Nitrógeno Total (NT), Fosforo Total (FT),*

Lo mencionado anteriormente refleja como el nitrógeno y el fósforo se puede encontrar en diferentes concentraciones y formas en las aguas residuales. El nitrógeno está presente en el ambiente en muchas formas, debido a los siete estados de oxidación, en las aguas residuales las principales formas en las que se producen son: nitrógeno orgánico, nitrito, nitrato y a pH neutro el 99% del amoníaco (NH<sub>3</sub>) se encuentra protonado formando el ion amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) (Horan, 1990). Según Molina (2015), las proteínas suponen entre el 40 y el 60% de la materia orgánica de un agua residual, y junto con la urea, son los principales responsables de la presencia de nitrógeno en las aguas residuales.

Según U.S. EPA (1975); el agua residual puede introducir altas cantidades de amonio y nitratos al ambiente de los cuerpos de aguas receptores, generando problemas ambientales como:

- Toxicidad en animales acuáticos
- Agotamiento del oxígeno disuelto

- Efecto corrosivo
- Efecto mutagénico y carcinogénico

Al igual que el nitrógeno, el fósforo se puede encontrar en el ambiente de manera orgánica e inorgánica, debido a su reactividad no se encuentra libre en la naturaleza, por lo que principalmente se encuentra como fosfatos, específicamente ortofosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) (Pérez, 2009). Las concentraciones de fósforo total en agua residual provienen de los detergentes convencionales de uso doméstico e Industrial (Mata y otros, 2010).

Tanto el nitrógeno como fósforo son causantes primarios de la eutrofización y contaminación en muchas regiones del mundo. Según una encuesta realizada por el Comité Internacional de Medio Ambiente de los Lagos, el 48% de los lagos y los embalses de América del Norte son eutróficos; en Asia y el Pacífico, 54%; en Europa, 53%; en América del Sur, 41%; y en África 28%, causando reducción de biodiversidad y reemplazo de especies dominantes, aumento toxicidad del agua, aumento de la turbidez del agua y disminución de la vida útil de lagos, ríos u otros (Cai, Park y Li, 2013). Los problemas que causan las aguas residuales también se ven reflejados en la salud humana, algunas evidencias científicas sugieren que la ingestión de estos compuestos contaminantes podría contribuir al desarrollo de linfomas y cánceres, enfermedades coronarias, infecciones del tracto respiratorio, malformaciones en los recién nacidos, abortos espontáneos y nacimientos prematuros (Calvachi y Ortiz, 2013). Además, se pueden presentar efectos adversos sobre la salud humana por causas indirectas, por ejemplo, la proliferación de microorganismos tóxicos que pueden ocasionar desde trastornos fisiológicos e intoxicación hasta la muerte de la persona afectada por su ingesta por contacto de tipo recreacional (Stewart y otros, 2006). La eutrofización puede favorecer el desarrollo de organismos patógenos y vectores y por ende la transmisión de enfermedades como el Cólera; igualmente, las adiciones de N en los ambientes acuáticos generan cambios ecológicos que incluyen la dinámica de algunas enfermedades humanas producto de la alteración de la abundancia y distribución de importantes vectores como los mosquitos que transmiten la malaria (Calvachi y Ortiz, 2013).

## 2.2 GENERALIDADES DE LAS MICROALGAS

Las microalgas son algunas de las formas de vida más antiguas del mundo, son microorganismos fotosintéticos procariotas o eucariotas que pueden crecer rápidamente y viven en condiciones muy duras, debido a su estructura multicelular, unicelular o simple, (Li y otros, 2008; Li y otros 2008; Mata y otros, 2010). Las microalgas procariotas se clasifican en dos divisiones: Cyanophyta y Prochlorophyta y las eucariotas en nueve: Glaucophyta, Rhodophyta, Heterokontophyta, Haptophyta, Cryptophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Chlorarachniophyta y Chlorophyta (Fernandez y otros, 2012). Sin embargo, según Khan y otros (2009) la clasificación de las microalgas se realiza en cuatro grupos debido a su abundancia: diatomeas, algas verdes, algas verde-azules y algas doradas (Cuadro 3).

Por lo general crecen en diversos ambientes acuáticos, como el agua dulce, agua de mar y aguas residuales, a su vez algunas especies pueden crecer en las rocas, suelos y plantas, siempre y cuando exista cantidades adecuadas de C (carbono orgánico o inorgánico), N (amonio, nitrato, urea, extracto de levadura, etc.), y P, así como otros elementos traza esenciales (Liu y otros, 2014).

**Cuadro 3.** Grupos más importantes de microalgas en términos de abundancia (Fernández y otros, 2012).

Microalga	Especies conocidas (Aprox)	Material Almacenado	Habitat
Diatomeas ( <i>Bacillariophyceae</i> )	100 000	Quirsolaminarin (Polímero de carbohidratos) y TAGs	Océanos, agua dulce y salobre.
Algas verdes ( <i>Chlorophyceae</i> )	8 000	Almidón y TAGs	Aguas dulces
Algas verdes-azules ( <i>Cyanophyceae</i> )	2 000	Almidón y TAGs	Diferentes hábitats

Algas ( <i>Chrysophyceae</i> )	Doradas	1 000	TAGs Carbohidratos	y Agua dulce
-----------------------------------	---------	-------	-----------------------	--------------

Las microalgas son uno de los recursos biológicos más importantes que se encuentran actualmente y reciben mucha atención debido a una multiplicidad de razones (Rawat y otros, 2011). Estos microorganismos son responsables de al menos el 60 % de la productividad primaria de biomasa en la tierra, pueden proporcionar una larga lista de sustancias útiles, incluyendo biohidrógeno, hidrocarburos y combustibles, pigmentos, oxígeno y colorantes, alimentos y piensos, biopolímeros, biofertilizantes, productos nutracéuticos, compuestos farmacológicos y en adición, las microalgas se pueden utilizar en el tratamiento de aguas residuales (Richmond, 2008), así como en el secuestro de dióxido de carbono concomitante (Rawat y otros, 2011). De igual forma la biorremediación de aguas residuales por las microalgas es un proceso respetuoso del medio ambiente sin contaminación secundaria, siempre que la biomasa producida sea reutilizada y permita el reciclado eficiente de nutrientes (Muñoz, y Guieysse, 2006).

Según Brennan y Owende (2010), otras ventajas del aprovechamiento de las microalgas son:

- a) Crecimiento en medios acuosos, pero necesitan menos agua que los cultivos terrestres, por lo tanto, reducen la carga en fuentes de agua dulce.
- b) Las microalgas tienen un gran potencial de crecimiento y muchas especies tienen un contenido de aceite en el intervalo de 20-50% de peso seco de biomasa, las tasas de crecimiento exponencial pueden duplicar su biomasa en períodos tan cortos como 3,5 h.
- c) Mantiene y mejora la calidad del aire, la producción de biomasa de microalgas puede efectuar biofijación de residuos CO<sub>2</sub> (1 kg de biomasa seca de alga utiliza aproximadamente 1,83 kg de CO<sub>2</sub>)
- d) El cultivo de microalgas no requiere la aplicación de herbicidas o pesticidas.

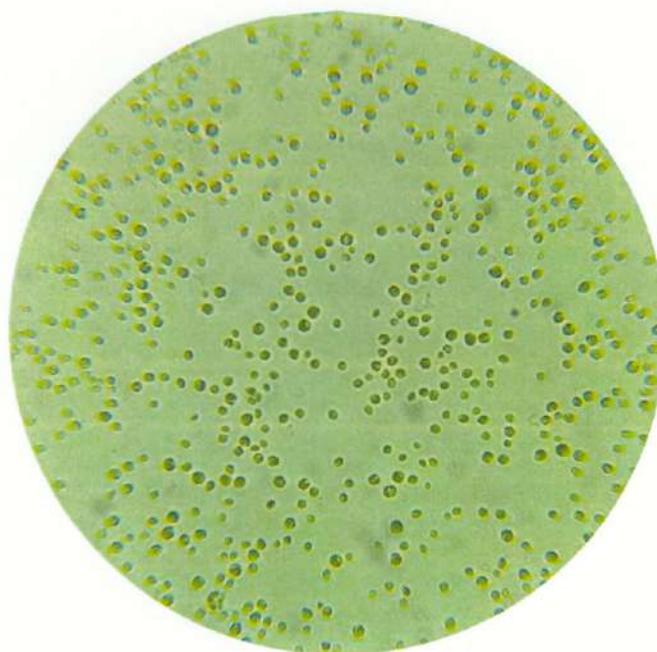
- e) La composición bioquímica de la biomasa de las microalgas se puede modular variando las condiciones de crecimiento.

### 2.3 MICROALGA EN ESTUDIO (*Chlorella sorokiniana*)

Las microalgas han sido exploradas con fines de tratamiento de aguas residuales durante más de dos décadas y son considerados activamente para la producción de biomasa. Las especies más exitosas generalmente provienen del grupo de las clorofitas, incluyendo *Scenedesmus sp.*, *Chlorella sp.* o *Chlamydomonas sp.*, pero cianobacterias u otros grupos filogenéticos aparecen ocasionalmente en la literatura (Paskuliakova y otros, 2018). Las clorofitas o algas verdes son un grupo (división) importante de microalgas que deben su color a la clorofila (sobre todo la clorofila a y b), carotenoides y xantofilas presentes en su estructura; la clase más destacada de clorofitas son las clorofíceas, entre las que a su vez destacan las órdenes de las volvocales (organismos de agua dulce provistos de flagelos) y las clorococales (microorganismos desprovistos de flagelos) (Ruiz, 2011).

Las microalgas del genero *Chlorella* pueden reproducirse fácilmente en presencia de luz solar, dióxido carbono, agua y pequeñas cantidades de nutrientes, haciendo que su cultivo sea fácil. Tienen un ciclo de vida simple y un metabolismo vegetal superior, siendo capaz de producir grandes cantidades de proteínas, carotenoides, vitaminas y minerales y, por lo tanto, se producen como fuente de alimentos (Silva y otros, 2019). Además, *Chlorella* acumula altas concentraciones de carotenoides (astaxantina, luteína,  $\beta$ -caroteno, violaxantina y zeaxantina), antioxidantes, vitaminas, polisacáridos, proteínas, péptidos y ácidos grasos (Martins y otros, 2020). *Chlorella* consta de varias subespecies unicelulares que se encuentran tanto en agua dulce como en agua salada (Kotoula y otros, 2020). Dentro de dichas subespecies se encuentra la *Chlorella sorokiniana* (Figura 1) la cual es un alga clorofita de rápido crecimiento y termo-tolerante (Li y otros, 2013). Se trata de un alga unicelular robusta, pequeña (2–4,5  $\mu\text{m}$  de diámetro) que es capaz de crecer mixotróficamente en diversas fuentes de carbono, lo que la hace ideal para el cultivo en materia prima de desecho (Lizzul y otros, 2014). Diversos resultados informan que este microorganismo puede tener un

crecimiento óptimo a temperaturas entre 25-40 °C y pH entre 4-8 (de-Basham y otros, 2008; Moranta y otros, 2006); con tiempos de duplicación fototróficos tan bajos como 4-6 h. Se ha observado que el crecimiento en condiciones mixotróficas es incluso más rápido, con preferencia por azúcares como la glucosa o fuentes de carbono más simples como el acetato (Lizzul y otros, 2014). También se ha demostrado que la especie es lo suficientemente robusta para escalar en columnas de burbujas (Béchet y otros, 2013) y reactores tubulares (Liu y otros, 2020). Algunos trabajos también han demostrado que *Chlorella sorokiniana* puede crecer en aguas residuales en condiciones que serían desfavorables para otras especies de algas (de-Basham y otros, 2008). Su adaptabilidad a este medio es muy buena y su eficiencia para depurar DQO, nitrógeno total y fósforo total supera los 90% (Chem y otros, 2020). *Chlorella sorokiniana* ha sido ampliamente estudiada con respecto a su fisiología, genética y por su producción de biomasa con alto contenido de lípidos (cuadro 4), específicamente ácidos grasos insaturados omega 3, 6 y 9, empleados en la obtención de suplementos nutricionales, cosméticos, farmacéuticos y biocombustibles (Ugwu y otros, 2005; Spolaore y otros, 2006).



**Figura 1.** *Chlorella sorokiniana*.

**Cuadro 4.** Contenido de lípidos y productividad de diferentes especies de microalgas (Mata y otros, 2010).

Especies de microalgas marinas y de agua dulce	Contenido de lípidos (Biomasa en % peso seco)	Productividad de lípidos (mg/L/día)	Productividad volumétrica de biomasa (g/L/día)	Productividad de la biomasa Areal.
<i>Chlorella emersonii</i>	25-63	10.3-50.0	0.036-0.041	0.91-0.97
<i>Chlorella protothecoides</i>	14.0-57.8	12.14	2.00-7.70	-
<i>Chlorella sorokiniana</i>	19.0-22.0	44.7	0.23-1.47	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	5.0-58.0	11.2-40.0	0.02-0.20	0.57-0.95
<i>Chlorella sp.</i>	10.0-48.0	42.1	0.02-25	1.61-16.47/25
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	2.0	-	2.90-3.64	72.5/130
<i>Chlorella</i>	18.0-57.0	18.7	-	3.50-13.90

## 2.4 DEPURACIÓN DE AGUAS RESIDUALES CON MICROALGAS

Para un mejoramiento de las aguas y evitar la eutrofización (Abdel-Raouf y otros, 2012), diversos investigadores han centrado sus estudios en depurar aguas residuales con algas empleando técnicas de biorremediación.

Por biorremediación se entiende la utilización de organismos vivos, de cualquier reino, para depurar ambientes contaminados (Pinzón y Gómez, 2013). La ficorremediación puede definirse como el uso de macroalgas, microalgas y cianobacterias, vivas o muertas, para la eliminación o biotransformación de contaminantes, incluidos nutrientes, compuestos orgánicos e inorgánicos, tóxicos y recalcitrantes, de

origen natural o antropogénico, de aguas residuales, suelo contaminado o de corrientes de aire residuales (Rawat y otros, 2011).

Las aplicaciones de la ficorremediación son diversas y algunas están más desarrolladas que otras; algunas aplicaciones ya se encuentran a nivel comercial, mientras que otras aún se encuentran en la etapa de investigación y desarrollo. Los procesos de eliminación de nutrientes de las aguas residuales domésticas, como el Advanced Integrated Wastewater Pond Systems (AIWPS), ya se han comercializado gracias a los esfuerzos a largo plazo del pionero en el uso de microalgas para el tratamiento de aguas residuales, el profesor Williams J. Oswald (Olguin, 2003). Por otro lado, la eliminación de nutrientes de los efluentes que contienen componentes orgánicos de alta concentración sigue siendo un área relevante de investigación y desarrollo, ya que los desechos de animales o los efluentes agroindustriales no se eliminan adecuadamente en muchos países y la eutrofización de las masas de agua superficiales es un problema común (Olguín y Sánchez-Galván, 2019).

Según Lavoie, y De la Noüe (1985); Gouveia y otros (2016), la ficorremediación garantiza varias ventajas y comprende varias aplicaciones:

- Eliminación de nutrientes en aguas residuales.
- Transformación y degradación de compuestos xenobióticos.
- Tratamiento de aguas residuales con metales presentes y secuestro de CO<sub>2</sub>.
- Detección de compuestos tóxicos con la ayuda de biosensores a base de algas.
- Reducción de costos.
- Producción de biomasa algal útil para fines energéticos.

Las algas han ido ganando atención desde entonces debido a su potencial de eliminación de aguas residuales urbanas (DeBashan, 2010), industriales (Bordel, 2009) y de agricultura (Olguin, 2003). Los investigadores Parra y Villanueva en 2013 llevaron a cabo un estudio de la remoción de nitratos y fosfatos utilizando

*Scenedesmus incrassatulus* inmovilizado en alginato de calcio, como una nueva alternativa tecnológica de remoción.

Se han desarrollado tanto monocultivos como cultivos de varias especies en aguas residuales artificiales y reales, de modo que estudios simultáneos sobre un extenso número de especies de microalgas han concluido que estas son aptas para la eliminación de contaminantes en aguas residuales y que la eficacia del proceso es muy prometedor, (Ruiz, 2011). Resultados de diferentes investigaciones muestran eliminaciones que van desde 70 hasta 100% en algunos casos (Vela, 2016; Olarte y Valencia, 2016), variando en función de las condiciones de operación, las especies empleadas y las características del agua residual. Algunas de las especies estudiadas son *Chlorella sorokiniana* (Ogbonna y otros, 2010), *Chlorella vulgaris* (Wang y otros, 2010), *Scenedesmus obliquus* (Chisti, 2007), *Spirulina platensis* y *Botryococcus braunii* (Rawat, 2010).

Según Abdel-Raouf y otros 2012, el interés del cultivo de microalgas para el tratamiento de aguas residuales se deriva del hecho que los procesos de tratamiento convencionales sufren de algunas importantes desventajas:

- La eficiencia en la eliminación de nutrientes.
- Costos de operación muy elevados
- Los procesos químicos a menudo conducen a una contaminación secundaria
- Conlleva a la pérdida de valiosos nutrientes potenciales (N, P).

Los ejemplos dados en el cuadro 5 demuestran que las algas son de hecho capaces de contribuir a la degradación de muchos contaminantes presentes en diferentes tipos de aguas residuales, mediante la transformación directa de los mismos.

**Cuadro 5.** Sistemas basados en microalgas para diferentes tratamientos de aguas residuales (Molinuevo-Salces y otros, 2019; Rawat, 2011)

Microalgas	Agua residual	NT removido (%)	FT removido (%)
<i>Algas bentónicas</i>	Lácteos digeridos	39	51
<i>Chlorella vulgaris</i>	AR Artificial	97	96
<i>Chlorella sp.</i>	Estiércol digerido	76-83	63-75
<i>Chlorella sorokiniana</i>	AR Procesamiento de papa	>95	81
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Estiércol de cerdos	83	58
<i>Chlorella vulgaris</i>	AR de Industria láctea	30-95	20-55
<i>Coelastrum microporum</i>	AR Municipal	88	89
<i>Oocystis sp.</i>	AR Procesamiento de pescado.	>95	42
<i>Phormidium tergestinum</i>	AR Matadero.	83	91
<i>Scenedesmus obliquus</i>	AR Municipal	79-100	47-98
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	AR Industria Láctea.	>90	20-55
<i>Mucidosphaerium pulchellum</i>	AR Domestica	79	49
Microalgas de agua dulce	AR procesamiento de café	80	--
Microalgas de agua dulce	AR Procesamiento de pescado	45-85	--

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIRIQUI  
BIBLIOTECA Dr. ROBERTO JAEN Y JAÉN

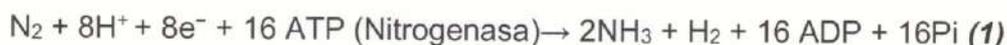
<b>Microalgas de agua dulce</b>	Efluentes de molinos.	>95	>95
<b>Microalgas de agua dulce</b>	AR domestica	70	85
<b>Microalgas de agua dulce</b>	AR municipal	22	26
<b><i>Prototheca zopfii</i></b>	Hidrocarburos derivados del petróleo	--	--
<b><i>Chlorella pyrenoidosa</i></b>	Tintes azoicos en aguas residuales	--	--
<b><i>Ankistrodesmus y Scenedesmus</i></b>	AR industria del papel.	--	--
<b><i>Spirulina platensis</i></b>	AR urbana	--	--

Notas: Nitrógeno Total (NT), Fósforo Total (FT),

## 2.5 METABOLISMO DE NITRÓGENO Y FÓSFORO POR MICROALGAS

### 2.5.1 NITRÓGENO (Gonçalves, Pires y Simões, 2017)

Según las formas de nitrógeno inorgánico más comunes incluyen nitrato, nitrito, ácido nítrico, amonio, amoniaco, nitrógeno molecular, óxido nitroso, óxido nítrico y dióxido de nitrógeno. Las microalgas juegan un papel importante tanto en la fijación como en la asimilación de nitrógeno. Microalgas procariontas (cianobacterias) son capaces de fijar nitrógeno molecular atmosférico (N<sub>2</sub>-N), convirtiéndolo en nitrógeno amoniacal (NH<sub>3</sub>-N), que puede ser incorporado en aminoácidos y proteínas o excretado al medio ambiente:



Las microalgas eucariotas, a su vez, son capaces de asimilar nitrógeno fijo, tales como NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N y NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N. Estas fuentes de nitrógeno entran en las células de microalgas a través del transporte activo en las membranas. El NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N, que es la forma más oxidada, es termodinámicamente más estable que el NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N y, por lo tanto, es

más común encontrar esta forma de nitrógeno inorgánico en medios acuáticos. Sin embargo, la asimilación de esta fuente de nitrógeno requiere una reducción previa en  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ , en un proceso de dos pasos catalizado por las enzimas nitrato reductasa y nitrito reductasa. En el primer paso (Ec 2), la nitrato reductasa cataliza la reducción de  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  en  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  utilizando fosfato presente en el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADPH) como agente reductor. La reducción adicional en  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  es catalizada por la nitrito reductasa, que usa ferredoxina para catalizar la reacción de transferencia de seis electrones (Ec. 3)



El  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  resultante de la reducción de  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  y  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  y que se incorpora activamente a las células de microalgas se convierte 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 del glutamato y trifosfato de adenosina (ATP), según Ec. 4:



Dado que la asimilación de  $\text{NH}_4\text{-N}$  no requiere pasos de reducción previos, se cree que esta es la forma de nitrógeno preferida para las microalgas.

### **2.5.2 FÓSFORO (Gonçalves, Pires y Simões, 2017)**

La transferencia de energía y la síntesis de ácidos nucleicos están mediadas por el fósforo. Este nutriente ingresa a las células de microalgas a través del transporte activo en la membrana plasmática en forma de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$ . La incorporación del  $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$  en compuestos orgánicos se realiza mediante los siguientes procesos: (i) fosforilación a nivel de sustrato; (ii) fosforilación oxidativa; y (iii) fotofosforilación. En estos procesos el ATP es producido a partir de difosfato de adenosina (ADP) y un aporte de energía, que se puede obtener de la oxidación de los sustratos respiratorios o del sistema de transporte de electrones de las mitocondrias (en el caso de los dos

primeros procesos) y de la transformación de la energía luminosa (en el caso del tercer paso). La reacción general está representada por la ecuación 5:

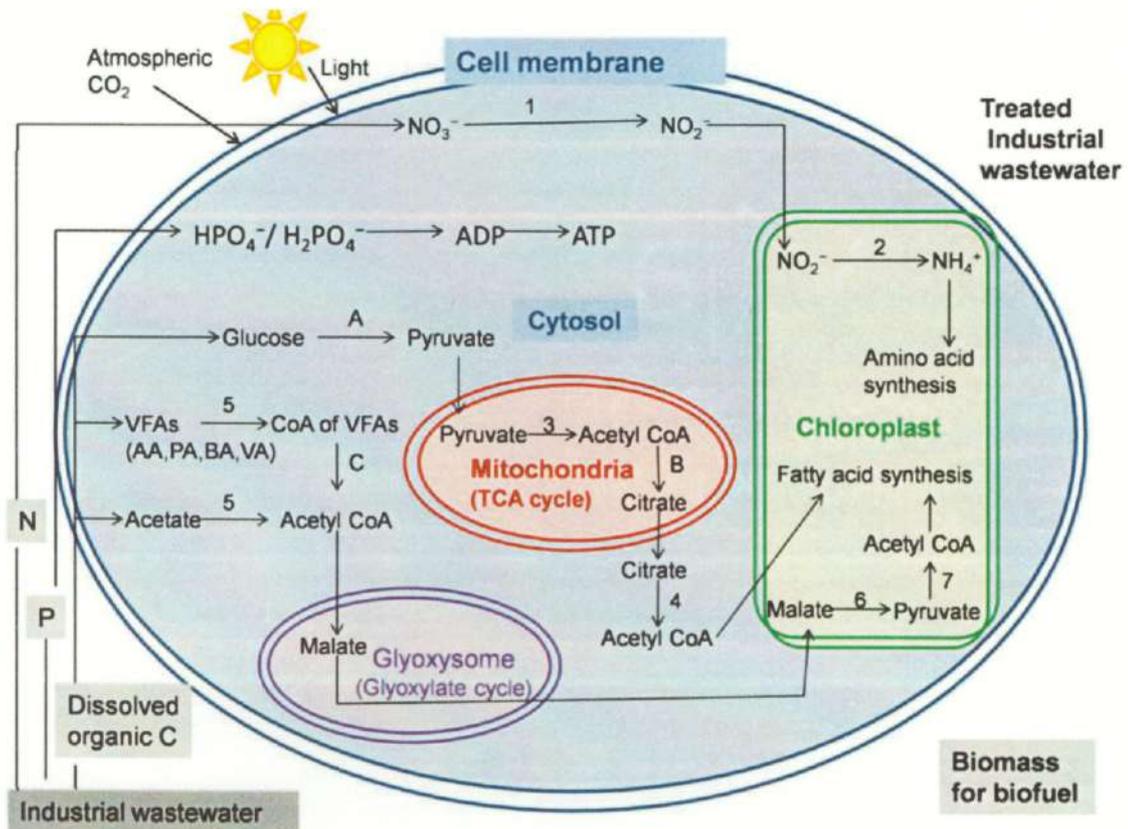


Figura 2. Mecanismo de eliminación de nitrógeno y fósforo de aguas residuales por microalgas (Gupta, Pawar, y Pandey, 2019).

# CAPÍTULO 3

### **3. TIPO DE INVESTIGACIÓN**

#### **3.1 DEFINICIÓN**

Este estudio se basa en el uso de microalgas para la eliminación o biotransformación de contaminantes como el nitrato y fosfato, estos dos compuestos tienen alta presencia en aguas residuales afectando directamente al medio ambiente (ecosistemas), seres humanos y recursos hídricos.

El estudio es de tipo experimental-descriptivo-cuantitativo, se basa principalmente en un tratamiento de aguas residuales con microorganismos altamente depuradores como las microalgas. El desarrollo consistió en el levantamiento de inóculo microalgal, seguido de los cultivos de microalga *Chlorella sorokiniana* en diversas aguas residuales (Crecimiento-producción de biomasa, análisis de pH, temperatura, luz, análisis de contaminantes como nitratos y fosfatos y por último una evaluación de la biomasa generada (lípidos, proteínas, pigmentos y carbohidratos).

#### **3.2 JUSTIFICACIÓN**

Actualmente los problemas asociados con el agua por presencia de contaminantes son una de las principales preocupaciones de la sociedad panameña. Por lo tanto, en términos de salud, medio ambiente y económico, la lucha contra la contaminación por aguas residuales con altas concentraciones de N y P es un problema de gran importancia. Una alternativa para eliminar contaminantes en aguas es el uso de microalgas, diversos estudios sustentan que estos microorganismos tienen un alto potencial como herramienta para depuración, contribuyendo a contrarrestar la contaminación de los recursos hídricos. Los resultados de estos estudios muestran porcentajes de eliminación de contaminantes que alcanzan hasta un 100% en algunos casos.

La biorremediación ha ido progresando en Panamá, grupos como el CIPNABIOT-UNACHI han llevado a cabo estudios relacionados. Hoy en día la Maestría en Ciencias Químicas con Énfasis en Inocuidad Alimentaria (MCQIA-UNACHI) busca soluciones no solo relacionadas a la inocuidad de los alimentos si no también soluciones

metodológicas que ayuden a eliminar los contaminantes presentes en aguas residuales que se generan durante la producción de un alimento. Trayendo como resultado la recuperación y reutilización de un recurso natural tan vital como lo es el agua; además de la reducción de contaminación, favorecimiento en las necesidades de abastecimiento y reduciendo los costos de producción. El agua reutilizable podrá ocuparse para el riego de cultivos, en el caso del procesamiento de alimentos la misma podrá ser utilizada para lavado, transporte y limpieza, e incluso para refrigeración o generación de vapor en las industrias.

En esta investigación para llevar a cabo la ficorremediación de aguas residuales se utilizará la microalga *Chlorella sorokiniana*. Se analizarán y reportarán datos que serán de gran importancia en nuestra región, acerca de la capacidad que tiene esta microalga para eliminar contaminantes principalmente nitratos y fosfatos presentes en aguas residuales.

La literatura nos muestra que muchos países industrializados han obtenido muy buenos resultados al utilizar este tipo de microalga para la eliminación de nutrientes presentes en aguas residuales. Por ende, este proyecto sigue la iniciativa de estos países, poniendo en práctica un nuevo método poco aplicado en nuestro país, con el fin de obtener resultados positivos que contribuyan a incrementar el conocimiento panameño en cuanto al potencial ficorremediador de las microalgas y así poder establecer a futuro proyectos a mayor escala que ayuden a muchas empresas en el tema de aguas residuales y su tratamiento.

### **3.3 DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES**

- Predictivas: Tipo de agua residual (Nominal), luz, pH, temperatura.
- Dependientes: Crecimiento celular, % de depuración de Nitratos y Fosfatos (Numérica), composición de la biomasa.

### **3.4 POBLACIÓN**

#### **3.4.1 MUESTRA**

- **Microorganismo:** Se utilizó la microalga *Chlorella sorokiniana* (CCAP211/8K) la cual reposa en el banco de cepas del CIPNABIOT, la misma fue donada por el Dr. Carlos Vilchez del grupo BITAL-Universidad de Huelva, España.

- a) **Agua residual:** Se realizó un muestreo de 3L por cada agua residual de diversas procedencias (**AR1:** Supermercado, **AR2:** Ganadería, **AR3:** Urbana, **AR4:** Universidad, **AR5:** Restaurante), las aguas residuales fueron muestreadas dentro del distrito de David, provincia de Chiriquí, Panamá.

#### **Coordenadas:**

Las aguas residuales fueron muestreadas en estación seca, la ubicación de cada lugar de muestreo se muestra a continuación:

- b) **AR1:** Av. Obaldía, David 507, 8°26'41.7"N 82°25'18.7"W.
- c) **AR2:** Canta gallo, Alanje, 8°23'34.0"N 82°36'28.4"W
- d) **AR3:** Av. 8a Este, David, 8°25'15.1"N 82°26'57.6"W.
- e) **AR4:** Quebrada San Cristóbal, 8°26'00.3"N 82°27'09.6"W.
- f) **AR5:** C. P Nte., David, 8°26'40.6"N 82°25'18.5"W.

#### **3.4.2 TIPO DE MUESTREO**

- Diseño completamente al azar

### **3.5 MÉTODOS E INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN**

#### **3.5.1 MÉTODOS**

- **Crecimiento del inóculo**

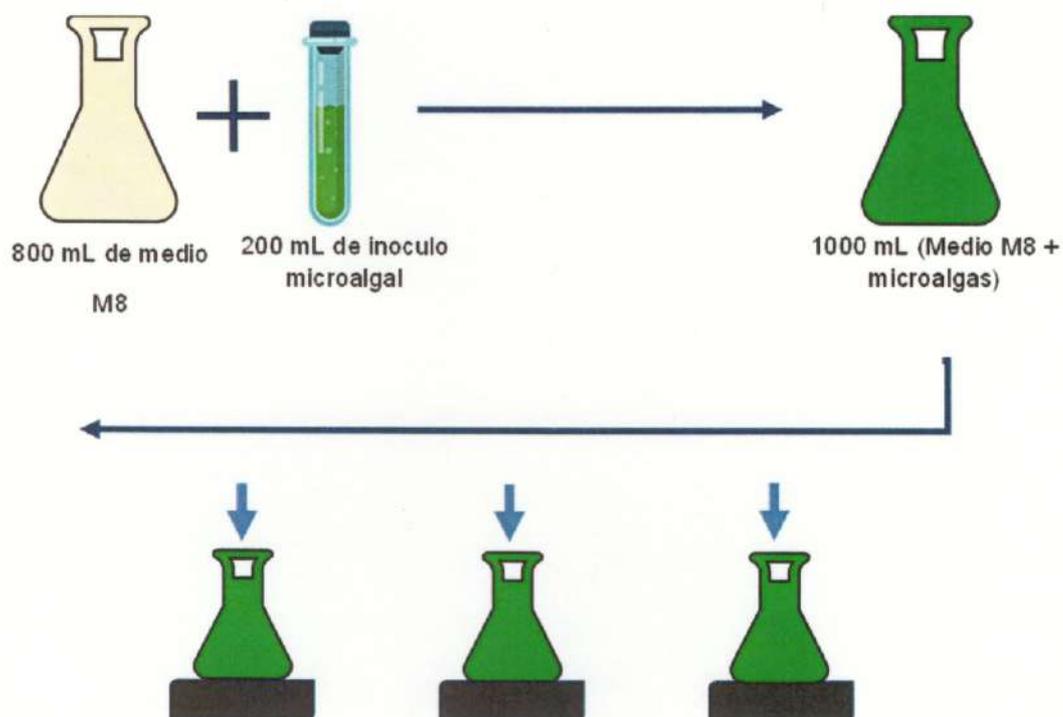
Los materiales utilizados fueron esterilizados a una temperatura de 135 °C y una presión de 1 atm. Una vez esterilizados los materiales, el inóculo de la microalga *Chlorella sorokiniana* se hizo crecer libre de contaminantes (axénico – Unialgal en medio M8a (Mandalam y Palsson, 1998) en un periodo de 15 días. Para dicho crecimiento se empleó un sistema de cultivo batch (estático) utilizando un volumen de 2 litros, temperatura de 27 a 30 °C, agitación constante, rango de pH 7- 8 e iluminación PAR (Radiación Fotosintéticamente Activa, 400-700 nm), el crecimiento fue obtenido mediante conteo celular. Una vez terminado esta etapa, el inóculo presentó un crecimiento de aproximadamente  $390 \times 10^6$  cel/mL.

- **Crecimiento con medio de cultivo control (MC25%).**

Inicialmente se preparó el medio de cultivo M8 a su concentración máxima en un litro, tal y como lo indica el autor (Mandalam y Palsson, 1998), una vez preparado se tomaron 250 mL de dicho medio y se disolvió con 750 mL de agua, el medio de cultivo obtenido (**MC25%**) será el medio control que se utilizó en este proyecto.

Seguidamente, en un matraz de 2 L se colocaron 200 mL de inóculo (figura 1)- **concentración de  $390 \times 10^6$  cel/mL de microalga *Chlorella sorokiniana*** en 800 mL de medio de cultivo MC25%. Esta proporción 2:8 se realiza debido a que el inóculo presenta una concentración muy alta de microalgas, lo que resulta no beneficioso para debido a que puede haber sobrepoblación, inhibición, entre otras afectaciones durante el proyecto.

Inóculos de la microalga se colocaron en reactores estáticos a volúmenes máximos de 300 mL en las condiciones de cultivo previamente señaladas (ver apartado de crecimiento del inóculo).



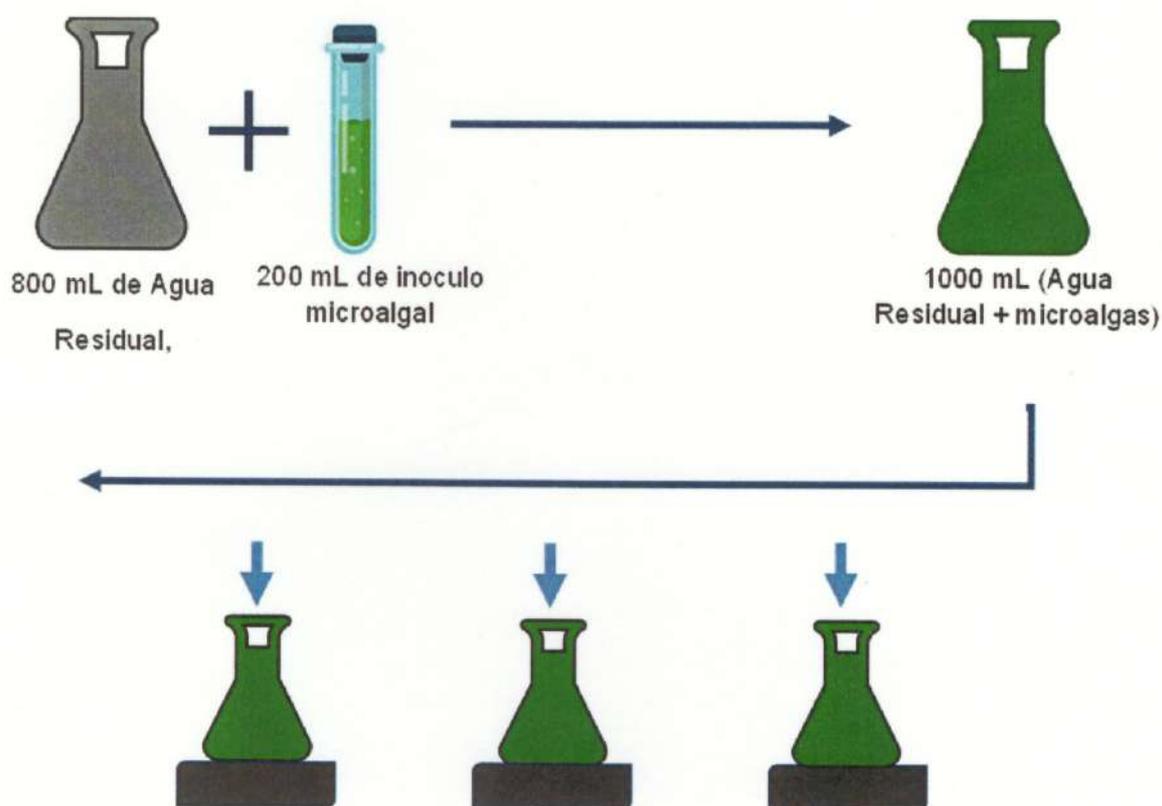
**Figura 3.** Preparación para inóculo de *Chlorella sorokiniana* en medio de cultivo M8a (MC25%)-300 mL.

**Cuadro 6.** Composición química del medio M8a.

Macronutrientes			
(100x) (11)	Composición	Concentración Stock (g/L)	Concentración del medio (g/L)
Stock I (P- buffer)	$\text{KH}_2\text{PO}_4^{-3}$	74	0.74
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	26	0.26
Stock II (Sales de Ca-Mg)	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	40	0.4
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.3	0.013
	$\text{KNO}_3$	-	3
Fe			
(100x) (11)	Composición	Concentración Stock (g/L)	Concentración del medio (g/L)
Stock III (Fe)	EDTA Sal férrica de sodio	11.6	0.116
	$\text{NaEDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.72	0.0372
Micronutrientes			
(100x) (11)	Composición	Concentración Stock (g/L)	Concentración del medio (g/L)
Stock IV (trazas)	$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.0062	6.18e-05
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.2980	1.30e-02
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3200	3.20e-03
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.1830	1.83e-03

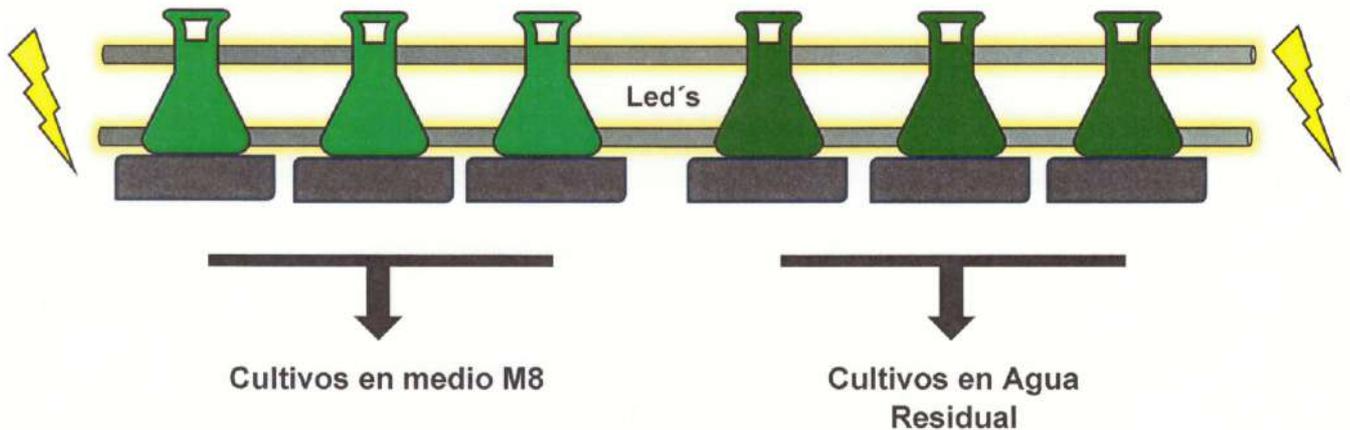
- **Crecimiento con aguas residual**

Con respecto al agua residual se emplearon 5 tratamientos distintos (AR1, AR2, AR3, AR4 y AR5). Igual que el procedimiento anterior, en un matraz de 2 L se colocaron 200 mL de inóculo (figura 1)-**concentración de  $390 \times 10^6$  cel/mL de microalga *Chlorella sorokiniana*** en 800 mL de agua residual. Esta proporción 2:8 se realiza debido a que el inóculo presenta una concentración muy alta de microalgas, lo que resulta no beneficioso para el ensayo debido a que puede haber sobrepoblación, inhibición, entre otras afectaciones.



**Figura 4.** Preparación para inóculo de *Chlorella sorokiniana* en agua residual.

Cada crecimiento en agua residual (AR1, AR2, AR3, AR4 y AR5) fue evaluado frente al crecimiento en medio control (MC25%); además, para cada crecimiento se aplicaron 3 repeticiones con análisis de pH, temperatura e iluminación en el transcurso del tiempo (días). El sistema de iluminación se operó bajo un fotoperíodo de 24 h de luz.



**Figura 5.** Crecimiento de *Chlorella sorokiniana* en medio M8a (MC25%) y agua residual (AR1, AR2, AR3, AR4 y AR5).

#### g) Crecimiento celular

La cinética de crecimiento de la microalga se evaluó de acuerdo a la cantidad de biomasa generada por día (Cuaresma y otros, 2009). Para este análisis se preparó un gráfico de ABS vs Concentración (Anexos-grafico 9).

Para realizar dicho grafico se prepararon 5 patrones con concentraciones de 20%, 40%, 60%, 80% y 100% del inóculo microalgal, a estos patrones se le evaluó los sólidos suspendidos (concentración) filtrando 10 mL de cada patrón, utilizando filtros a peso constante, los cuales posteriormente se secaron a 85 °C por 24 horas. Seguidamente a los patrones se le evaluó la ABS a una longitud de onda de 680 nm, utilizando el espectrofotómetro HACH DR3900. Una vez obtenido los datos se procedió con la elaboración del gráfico de ABS vs Concentración.

#### h) Evaluación del consumo de nutrientes

La evaluación del consumo de nutrientes de nitratos y fosfatos se realizó a través de técnicas espectrofotométricas. La concentración de nitratos se analizó mediante el método de reducción con cadmio a una  $\lambda = 500$  nm (HACH, Nitrover 5 – Rango alto y medio), se evaluó la concentración al inicio y durante la fase de crecimiento de cada ensayo según tratamiento. Los resultados fueron comparados contra una curva de calibración (1, 4, 8, 12, 16, 20 y 30 ppm), con  $R^2$  (0,9908) (Anexos-grafico 10).

El consumo de fosfatos se analizó empleando el método de azul de ácido ascórbico a  $\lambda = 880 \text{ nm}$  (Severiche y González, 2012), se evaluó la concentración al inicio y durante la fase de crecimiento de cada ensayo según tratamiento. Los resultados fueron comparados contra una curva de calibración (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0 y 3.0 ppm), con  $R^2$  (0,9995) (Anexos-grafico 11).

La eficiencia de eliminación en porcentajes se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Remoción} = \frac{\text{Conc.inicial} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) - \text{Conc.final} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right)}{\text{Conc.Inicial} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right)} * 100 \quad (\text{Ec.1})$$

#### i) Cosechado de la biomasa

3 mL de biomasa obtenida en cada ensayo se recolectó por centrifugación a 3500 rpm por 5 min. Las correspondientes pastas de biomasa se le agregó 1 mL NaCl (0.5 M), agua destilada y fueron almacenados en tubos de centrifugas de 15 MI a una temperatura de 15°C, según cada ensayo para hacer los respectivos análisis proximales.

#### j) Determinaciones analíticas a la biomasa generada (Arredondo y otros, 2017)

**Proteínas totales:** La cantidad de proteínas totales fueron medidas a través del método de Lowry con un estándar BSA (ver Anexos-punto 7.4).

**Lípidos totales:** Los lípidos fueron extraídos de una muestra por triplicado través del uso de una mezcla cloroformo: metanol (1:2; v:v) (ver Anexos-punto 7.7).

**Carbohidratos disponibles:** se analizaron a partir de la muestra, se realizarán por triplicado a través de un método espectrofotométrico (Curva de calibración con glucosa) (ver Anexos-punto 7.6):

**Clorofilas y carotenoides totales:** Se determinarán espectrofotométricamente (ver Anexos-punto 7.5).

#### **k) Análisis estadísticos**

Se llevo a cabo un análisis de varianza de un factor y prueba de tuckey para observar la presencia de diferencias significativas en el crecimiento microalgal, % de depuración y producción de biomasa. Estas herramientas para análisis estadísticos fueron manejadas bajo el software de cálculo-Microsoft Excel.

### **3.5.2 INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN**

La instrumentación utilizada para esta experiencia fueron vasos de 100 a 1000 mL(KIMAX-KIMBLE), matraces Erlenmeyer de 250 a 2000 mL (KIMAX-KIMBLE), pipetas de 5 y 10 mL, sistema de filtración al vacío (KIMBLE), filtros de membrana (Grado F, 4.7cm-Thomas Scientific). mangueras y micropipetas de 10-100 $\mu$ L (SOCOREX), 100-1000 $\mu$ L (SOCOREX) y de 1000-5000  $\mu$ L (SCIOLOGEX). Para la circulación de los medios de cultivo se utilizaron bombas Whisper 20 (Tetra, china), la temperatura y el pH fueron medidos con un medidor OAKTON 700 (OAKTON, USA). La intensidad de la luz PAR se registró usando un medidor de luz LI-250A (LI-COR Biosciences, Alemania). El honro utilizado fue un P-SELECTA (J.P. SELECTA, España), Autoclave (Tuttnauer 3870, Israel), Sonicador (Branson 2800,) y centrifuga (Hettich Mikro 220R,Alemania). El espectrofotómetro utilizado para el análisis de nitratos y proximales de biomasa fue un HACH DR3900 (HACH Company, Alemania) y para el análisis de fosfatos se utilizó un espectrofotómetro Genesys 10S Uv-Vis (Thermo Scientific, USA)

# CAPÍTULO 4

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 CRECIMIENTO DE INÓCULO DE *Chlorella sorokiniana*

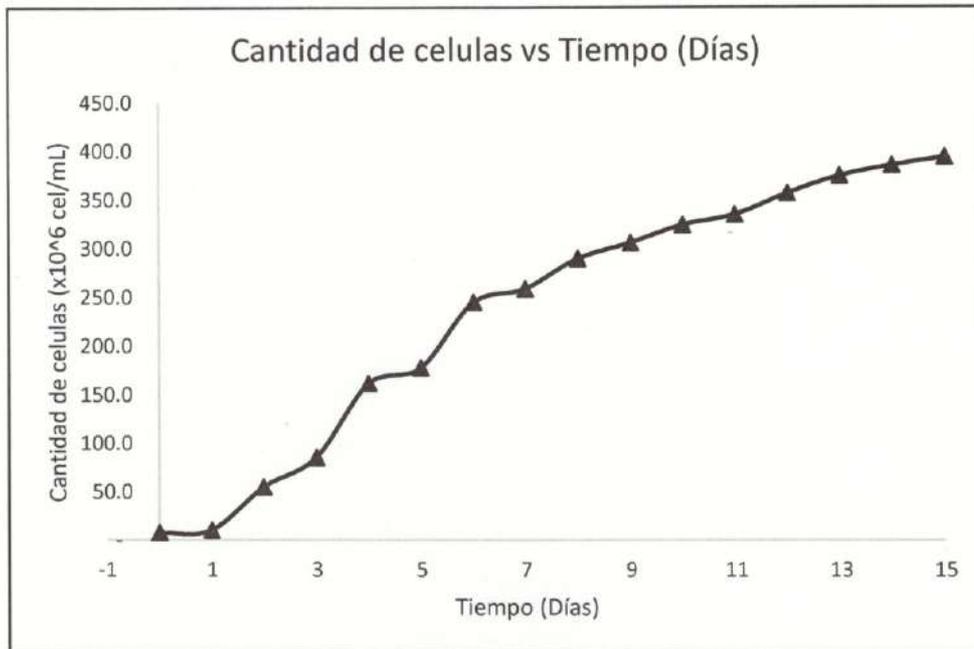


Gráfico 1. Crecimiento de inóculo de *Chlorella sorokiniana*.

### 4.2 CRECIMIENTO DE *Chlorella sorokiniana* (mg/L) EN MEDIO CONTROL (MC25%) Y AGUA RESIDUAL (AR1, AR2, AR3, AR4 y AR5).

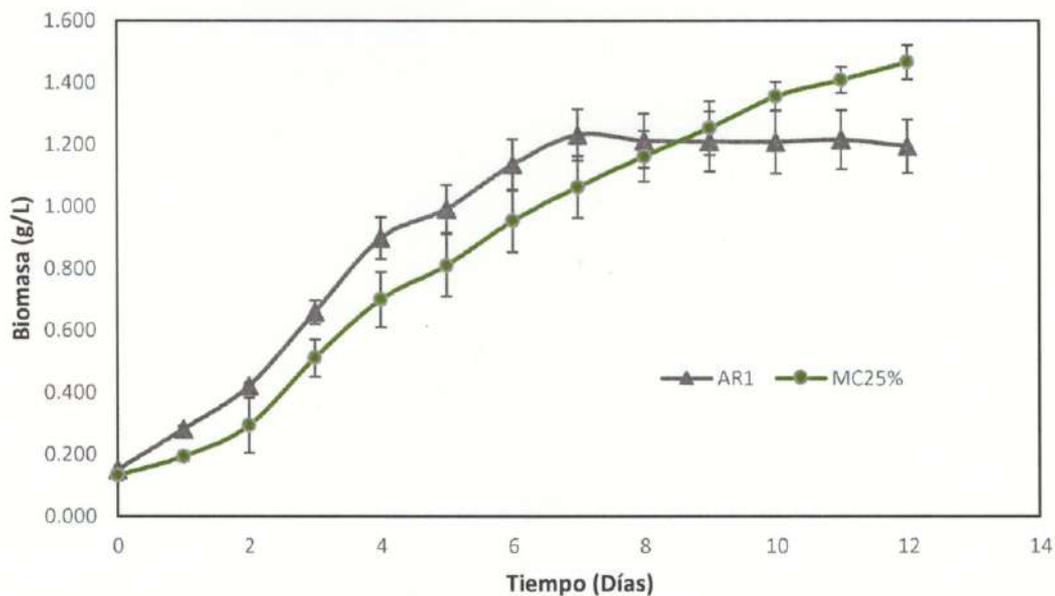
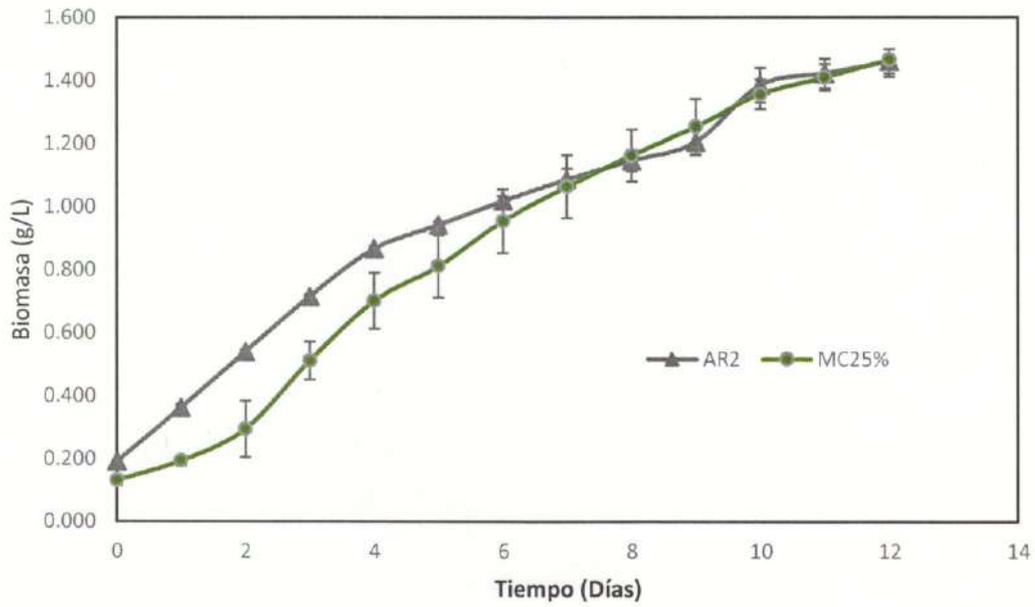
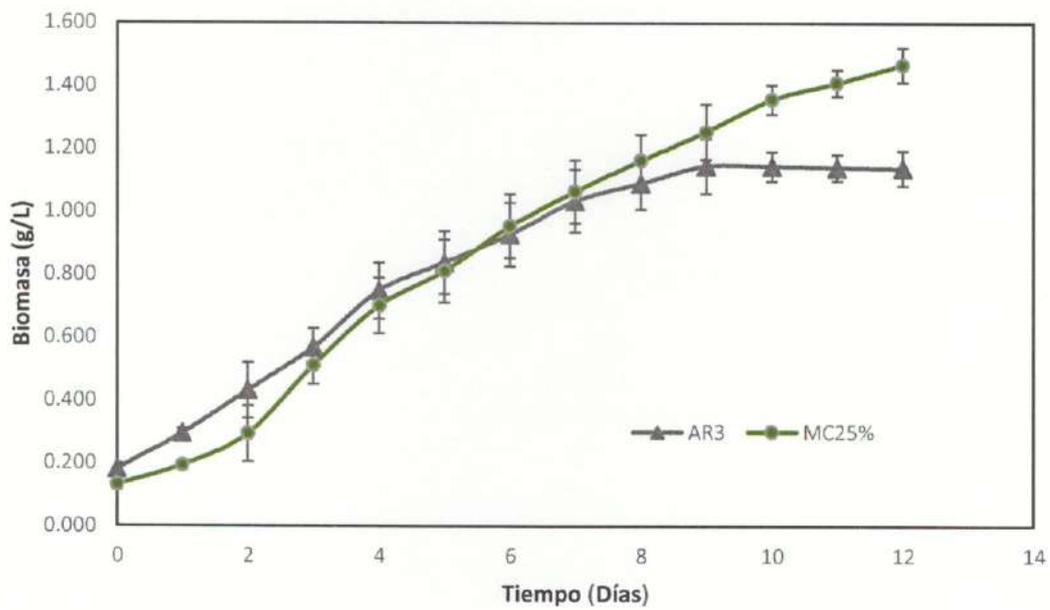


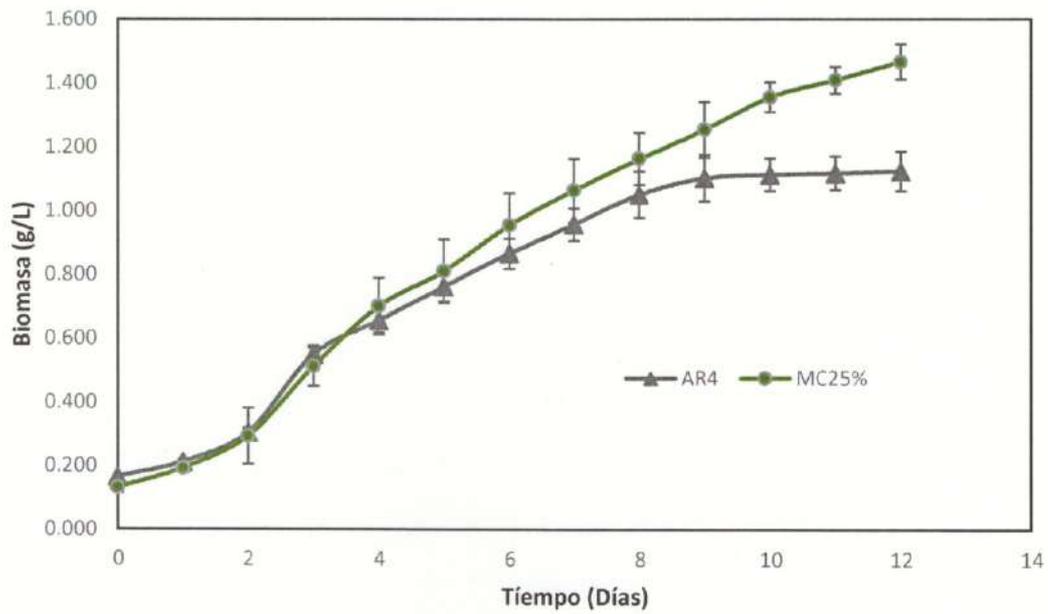
Gráfico 2. Crecimiento de *Chlorella sorokiniana* en AR1 y medio control (MC25%).



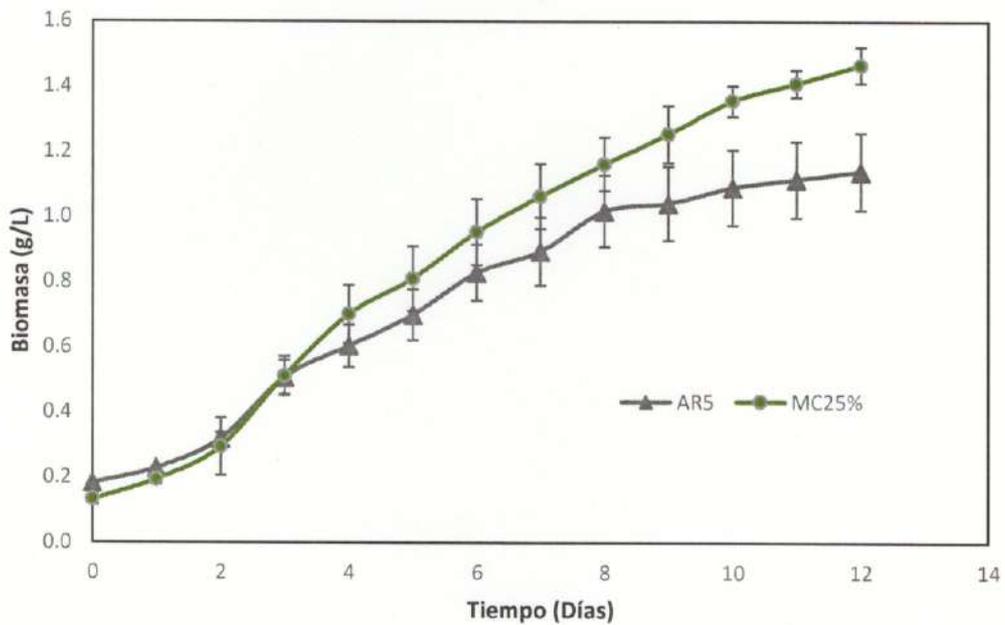
**Gráfico 3.** Crecimiento de *Chlorella sorokiniana* en AR2 y medio control (MC25%).



**Gráfico 4.** Crecimiento de *Chlorella sorokiniana* en AR3 y medio control (MC25%).



**Gráfico 5.** Crecimiento de *Chlorella sorokiniana* en AR4 y medio control (MC25%).



**Gráfico 6.** Crecimiento de *Chlorella sorokiniana* en AR5 y medio control (MC25%).

**Cuadro 7.** Biomasa final en medio control (MC25%) y en las distintas aguas residuales (AR1, AR2, AR3, AR4 y AR5).

Agua Residual	AR1	AR2	AR3	AR4	AR5	MC25%
Biomasa (g/L) n=3	1.194±0.086	1.460±0.039	1.137±0.041	1.122±0.062	1.139±0.118	1.466±0.055

**Cuadro 8.** Concentraciones iniciales de nitratos y fosfatos (mg/L) presentes en las aguas residuales utilizadas y medio control.

Agua Residual	AR1	AR2	AR3	AR4	AR5	MC25%
Nitratos (mg/L)	212.8	170.3	115.8	93.8	99	336.3
Fosfatos (mg/L)	20.42	40.5	11.8	8.13	15.52	165.12
Relación N/P	10	4.2	9.8	11.53	5.3	2.03

En el cuadro 7 se puede observar que *Chlorella sorokiniana* presentó crecimiento satisfactorio por encima de 1 g/L con diferencia significativa en al menos uno de los ensayos ( $P < 0.05$ ), las pruebas estadísticas de ANOVA de un factor y prueba de tuckey arrojaron que el resultado de crecimiento en agua residual que presenta diferencia significativa sobre los demás ensayos es el cultivo AR2 ( $P < 0.05$ ). De igual manera al comparar el crecimiento de los ensayos con agua residual (AR1, AR2, AR3, AR4 y AR5) vs el cultivo control (MC25%) se comprobó que el único que no representa diferencias significativas es el cultivo AR2 ( $P < 0.05$ ), con resultados de crecimiento bastante similares al medio control MC25%. En ambos tratamientos (Agua residual y medio control) se presentaron curvas de crecimiento de *Chlorella sorokiniana* que evidencian una rápida adaptación a estos medios cultivos. La diferencia en el crecimiento radica en gran medida en la cantidad, disponibilidad y diversidad de nutrientes que se encontraban en cada medio (Andrade y otros, 2006). Tal y como se observa en el cuadro 8, las aguas residuales utilizadas en este ensayo son de carácter urbano, alimentario, agrario, con una carga de nitratos y fosfatos elevadas contribuyendo al crecimiento de *Chlorella sorokiniana*.

Una influencia significativa en el rendimiento del tratamiento de microalgas es la composición de las aguas residuales. Para crecer y funcionar, las microalgas requieren tres nutrientes principales: C, N y P. Mohsenpour y otros (2021) mencionan que la asimilación de estos nutrientes se ve fuertemente afectada por la composición general de nutrientes que están disponibles en el medio de cultivo, muchas veces las tasas de utilización de nutrientes por parte de las microalgas están estrechamente relacionadas con su crecimiento, y un suministro limitado de un nutriente primario puede reducir significativamente su tasa de crecimiento. En este contexto, para garantizar una eficiencia óptima de eliminación de nutrientes del medio de cultivo, debe estar presente una proporción óptima de nutrientes que refleje las necesidades estequiométricas elementales de las microalgas. Mohsenpour y otros (2021) a su vez mencionan que las proporciones de nutrientes utilizados en estudios de tratamiento de aguas residuales basados en microalgas deben presentar un promedio N/P de 34/7. Estos datos son significativos ayudándonos a concluir que la relación entre las concentraciones analizadas y observadas de N/P en nuestra investigación son favorables, al comparar la relación N/P promedio de los diferentes cultivos en aguas residuales con la composición aproximada requerida por *Chlorella sorokiniana*, se puede observar que los datos se acercan bastante a la relación estequiométrica recomendable que va de 23 a 93 mg/L-N y 1.5 a 33 mg/L-P. Las microlagas

Además, el crecimiento y adaptación se puede atribuir a que a diferencia de un medio control las aguas residuales constan de grandes concentraciones de otros nutrientes importantes tales como  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_2^-$  y materia orgánica que pueden contribuir aún mejor al crecimiento de *Chlorella sorokiniana* y estabilizan la relación N/P requerida por las microalgas (Abdel-Raouf y otros, 2012); al existir una mayor concentración de nitrógeno y carbono asimilables, serán muy importantes para la microalga contribuyendo satisfactoriamente a un mejor crecimiento, una mayor producción de biomasa y la formación de muchos compuestos celulares importantes tales como aminoácidos, ácidos grasos, pigmentos, proteínas, ADN, ARN, enzimas y vitaminas, entre otros (Pérez García y otros, 2011). Se ha destacado que la microalga *Chlorella sorokiniana* prefiere el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) en vez del nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), al grado que concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  por arriba de 0.5 a 1  $\mu\text{moles/L}$  inhiben la absorción de  $\text{NO}_3^-$ ,

quizás ésto sea una forma de conservar energía debido a que el  $\text{NO}_3^-$  debe ser reducido a  $\text{NH}_4^+$  antes de incorporarlo a los aminoácidos (Ramanna y otros, 2014), este punto es importante hacerle mención ya que puede afectar directamente la eliminación de  $\text{NO}_3^-$ . Otra influencia que favorece y ayuda a comparar el crecimiento de *Chlorella sorokiniana* sobre un medio control es que en las aguas residuales también existen concentraciones elevadas de otros macronutrientes, micronutrientes y metales tales como el C, O, Mg, Mn, Cl, Zn, Fe y S que son esenciales para el crecimiento de una microalga, principalmente en los cloroplastos y la función fotosintética (Rawat y otros, 2011).

Efectos significativos en el crecimiento en agua residual por *Chlorella sorokiniana* se amerita a otros microorganismos como las bacterias, existen muchas bacterias que pueden afectar la disponibilidad de nutrientes por el efecto de competencia, reduciendo el crecimiento de *Chlorella sorokiniana*. Sin embargo, se ha reportado que las bacterias no siempre afectan el crecimiento microalgal, cuando las microalgas están asociadas a estos microorganismos se ejerce una simbiosis muy fuerte que resulta ser muy beneficiosa para el crecimiento primordialmente de las microalgas (Moranta y otros, 2006). En los sistemas de consorcios microalgas-bacterias, las microalgas pueden producir varias sustancias orgánicas que las bacterias pueden asimilar. Además, algunas especies de bacterias pueden liberar hormonas y otros compuestos para promover el crecimiento de algas. Por ejemplo, al co-inmovilizar *Chlorella vulgaris* con *Azospirillum brasilense* en perlas de alginato, poblaciones de algas, pigmentos en células de algas y tamaño de las colonias de microalgas aumentaron significativamente (Jia y Yuan, 2016). La simbiosis es muy significativa y contribuye a eliminar nutrientes de una manera más efectiva, es eficaz en el tratamiento de aguas residuales porque bacterias aerobias, son las encargadas de oxidar y eliminar los contaminantes orgánicos presentes en los efluentes para que así por otro lado, las microalgas puedan consumir de una manera más rápida nutrientes como nitrógeno y fósforo. Liu y otros (2020) informan que parte del carbono orgánico en las aguas residuales puede ser potencialmente utilizado por las algas después de la conversión en  $\text{CO}_2$  por bacterias.

El crecimiento y la producción de biomasa obtenida en los ensayos con agua residual es comparable con otros estudios, en 2020 Koutola y otros utilizaron cultivos Batch y diferentes tipos de aguas residuales para el crecimiento *Chlorella sorokiniana*, presentando crecimiento variado y una máxima producción de biomasa de 0.169 g/L en un periodo de 7 días. Chen y otros en 2019 utilizaron agua residual modificada para el crecimiento de *Chlorella sorokiniana* en cultivos batch, dicho ensayo presentó resultados variados de crecimiento y productividad de biomasa por encima de los 3 g/L en un periodo de 9 días. En otro estudio realizado por Li, Amoah y otros, 2019, se analizó el crecimiento de *Chlorella sorokiniana* en agua residual utilizando al inicio concentraciones variadas de biomasa, los resultados de crecimiento en un periodo de 7 días estuvieron entre los 0.01 a 0.6 g/L. Kobayashi y otros en 2013 obtuvieron una producción máxima de biomasa de *Chlorella sorokiniana* por 0.232 g/L cultivadas en agua residual de desecho bovino. En aguas residuales de desecho avícola también puede existir crecimiento de *Chlorella sorokiniana* con producción de biomasa por 0.313–0.387 g/L en un periodo de 16 días (Singh, y otros, 2011).

#### 4.3 CONDICIONES DE OPERACIÓN (PH, TEMPERATURA Y LUZ).

**Cuadro 9.** Temperatura, pH y Luz presente en medio control (MC25%) y los distintos cultivos de agua residual (AR1, AR2, AR3, AR4 y AR5).

Agua Residual	AR1	AR2	AR3	AR4	AR5	MC25%
Temperatura (°C)	22.8±0.08	22.5±0.08	23.2±0.85	21.0±0.06	21.5±0.14	22.4±0.75
pH	8.54±0.11	8.27±0.02	7.66±0.07	8.29±0.16	8.00±0.08	8.35±0.73
Luz (μmol/m <sup>2</sup> s)	91.81±7.43	83.84±4.28	82.59±7.96	57.96±0.93	59.92±2.89	97.53±8.31

Condiciones como la temperatura, el pH y la luz son muy relevantes en el crecimiento microalgal y la productividad de biomasa. Es importante saber que estas condiciones deben encontrarse en el rango aceptable para que así la *Chlorella sorokiniana* (microalga utilizada) no presente problemas de estrés ni daño celular. En el cuadro 9

se puede observar que la temperatura de los cultivos en agua residual se mantuvo entre los 21 y 23 °C, lo que representa una temperatura cercana a lo apto para *Chlorella sorokiniana*, sin mucha afectación en el crecimiento y en su proceso depurador. Ugwu, Aoyagi y Uchiyama en 2007 realizaron un estudio de crecimiento de *Chlorella sorokiniana* con variaciones de temperatura, mostrando resultados diversos de adaptación entre los rangos de 20 a 38 °C, pero con mejores crecimientos en temperaturas cercanas a los 25 °C. Otro estudio llevado a cabo por Yun, Kim y Yoon en 2020, informa que *Chlorella sorokiniana* muestra mayores tasas de crecimiento y productividad de biomasa a temperatura entre los rangos de 25 y 35 °C. Para un mejor proceso depurador y mejor eliminación de contaminantes por parte de *Chlorella sorokiniana* es recomendable temperaturas como las antes mencionadas, así se ha confirmado mediante estudios donde esta microalga presenta crecimiento incluso a temperaturas en los extremos de 20 a 38 °C (de Bashan y otros, 2008; Cui y otros, 2020), siendo esto muy relativo y favorable bajo comparación con los rangos de temperatura de nuestro país (27-32 °C). Bajas temperaturas pueden reducir muchas actividades celulares como la capacidad para utilizar energía luminosa limitando la cadena de transporte de electrones (Kumar y otros, 2014). Factores como la temperatura afectan positiva o negativamente la capacidad de los microorganismos fotosintéticos para adaptarse a altas concentraciones. Un plus sobre los efectos termoestables es el que presenta la membrana de las microalgas, una gran cantidad de evidencia establece que los fosfolípidos en las membranas de las algas son fundamentales para muchos procesos biológicos importantes, como la respuesta al estrés, la fotosíntesis, termoestabilidad (Lu y otros, 2013).

El pH es otro parámetro muy importante para el crecimiento de *Chlorella sorokiniana*, éste es una de las condiciones ambientales críticas en el cultivo de microalgas ya que determina la solubilidad y disponibilidad de CO<sub>2</sub> y nutrientes, y tiene una influencia significativa en el metabolismo de las microalgas y su crecimiento. La mayoría de las microalgas mantienen un pH citosólico neutro o ligeramente alcalino, ya que las enzimas son altamente dependientes del pH y se vuelven inactivas en pH ácidos (Kumar y otros, 2014). Nuestros cultivos de *Chlorella sorokiniana* en agua residual presentaron valores de pH entre los 7.66 y 8.54 (cuadro 9). Se ha informado que las

mayorías de las cepas de *Chlorella* presentan mejor adaptación y crecimiento a pH de 6-7 (Adamakis y otros, 2018). Estudios relacionados han comprobado dicha información, en 2017 Qiu y otros, demostraron que *Chlorella sorokiniana* presenta mejores crecimientos en pH de 5.8, seguido de un pH de 6-7 y por último a un pH de 8, pero sin variaciones de crecimiento tan significativas, observándose productividad de biomasa por encima de los 1 g/L para todos los valores de pH. De igual manera en 2020 Cui y otros analizaron el crecimiento de *Chlorella sorokiniana* en distintos niveles de pH (5, 6, 7, 8, 9), viéndose un mejor crecimiento en un pH de 7, seguido de un pH de 6 y 8. Los valores pH por encima de 8 pudieron tener influencia mínima en esta investigación, la variación de pH en los cultivos AR1, AR2, AR4 y AR5 pudo producir una disminución pequeña en las concentraciones de *Chlorella sorokiniana* sin afectar su proceso depurador. De hecho, el crecimiento celular se produjo en estos cultivos a valores de pH por encima de 8 (gráfico 2 3,4, 5 y 6), indicando que la cepa de *Chlorella sorokiniana* parece ser tolerante a tal condición y que los valores de pH en los cultivos de agua residual analizados no afectan directamente el crecimiento de *Chlorella sorokiniana*.

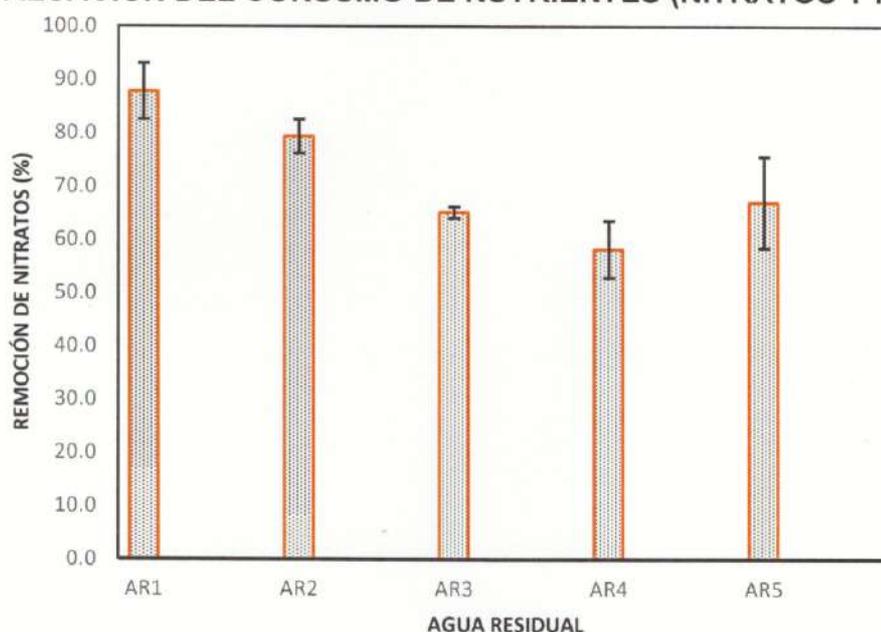
Un parámetro importante que no debe ser descartado en este tipo de cultivos es la intensidad de luz y el fotoperiodo, ya que son factores primarios relacionados con la eficiencia de remoción de nutrientes, tasa de crecimiento y productividad de biomasa. En el cuadro 9 se observa que la intensidad de luz en cada cultivo va desde los 59 a 91  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ . Con respecto a la temperatura y el pH estos valores de intensidad de luz si tienen cierto impacto sobre la *Chlorella sorokiniana* ya que son bajos en comparación a los valores aceptables (Punto de saturación: 300-400  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) para un cultivo de *Chlorella sorokiniana* (Ugwu, Aoyagi y Uchiyama, 2007) y otras microalgas del género *Chlorella* (Singh y Singh, 2015) y su correcto proceso fotosintético. Es importante hacer mención que si los valores de las intensidades lumínicas se encuentran por encima del punto de saturación va a existir fotoinhibición y un aumento del contenido de pigmentos fotoprotectores, afectando el crecimiento microalgal (Su, 2021).

La productividad de la biomasa en microalgas se ve afectada bajo la limitación de luz (Li y otros, 2019); esta información tiene concordancia con los parámetros ofrecidos en nuestros cultivos de agua residual donde se aportó poca luz ( $<100 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ), bioquímicamente hablando las reacciones luminosas bajo las condiciones adecuadas son muy relevantes, estas reacciones se llevan a cabo en las membranas tilacoidales del cloroplasto que contienen cinco complejos principales tales como: antenas captadoras de luz, Fotosistema II (PSII), citocromo b6/f, Fotosistema I (PSI) y ATP sintasa, si las condiciones de luz son bajas e inadecuadas no se podrá transferir suficiente energía lumínica al reductor bioquímico ( $\text{NADPH}_2$ ) y por consiguiente no se lleva a cabo la suficiente producción de la energía química en forma de ATP, afectando todo el funcionamiento microalgal (Su, 2021). Su (2021) también reporta que en general, solo la luz visible en el rango de 400 a 700 nm es PAR, es la que puede ser absorbida por microalgas para la fotosíntesis y la importancia para un correcto metabolismo. La energía de la luz se expresa como fotones y un fotón podría calcularse como  $E = hc/\lambda$  ( $h=6.626 \times 10^{-34} \text{ J s}$ ,  $c=3 \times 10^8 \text{ m/s}$ ,  $\lambda$ = la longitud de onda del Incidente de luz). Basado en la eficiencia cuántica de la fijación de  $\text{CO}_2$  en la fotosíntesis, al menos se requieren ocho fotones PAR para fijar una molécula de  $\text{CO}_2$  o para generar una molécula de  $\text{O}_2$  al dividir dos moléculas de agua, lo que es igual a 2,26 eV ( $3,6 \times 10^{-19} \text{ J}$ ) si se emplea como irradiación un pico de luz de 550 nm. Sin embargo, también se reporta un cuanto mínimo de 10 como la suposición más realista porque la eficiencia de la reacción de la luz puede no funcionar al 100 %

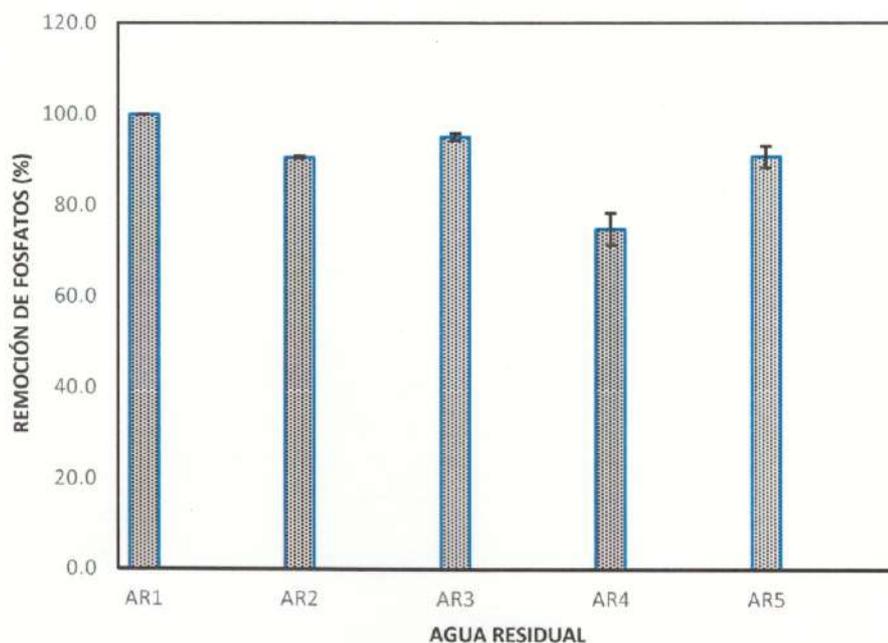
Estudios como los de Li y otros en 2011 demuestran que una mayor intensidad de luz promueve la producción de biomasa y mejora la eliminación de carbono orgánico, nitrógeno y fósforo en el tratamiento de aguas residuales, en resumen esto se debe al correcto funcionamiento de los cloroplastos dentro de las células de las microalgas, éstos orgánulos bajo correcto régimen de luz tienen un alto funcionamiento, ayudando a metabolizar correctamente el nitrógeno en moléculas importantes como los aminoácidos, las moléculas de carbono en biomoléculas de interés tales como los ácidos grasos y el fósforo para la síntesis de ATP. Estudios como los de Ma y otros en 2020 han demostrado el buen crecimiento de *Chlorella sorokiniana* en condiciones de luz por encima de los  $150\text{-}750 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  con producción de biomasa por encima de

los 2 g/L. La única manera por la cual nuestro cultivo se pudo ver favorecido por la intensidad de luz es por el fotoperiodo implementado (24 h), Sukačová, Trtílek, y Rataj en 2015 encontraron que las algas bajo una iluminación continua artificial de 24 h muestran un mejor crecimiento y una eliminación mucho mayor de fósforo total que en un régimen de 12 h de luz-12 h de oscuridad. Además, un estudio por De Bashan y otros en 2008 determinó que la microalga *Chlorella sorokiniana* presenta crecimiento en condiciones de luz extremas de 60  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ , pero estos resultados no siguen siendo significativos en comparación con los obtenidos a intensidades de luz adecuadas. Los valores de intensidad de luz tienen influencia en esta investigación, dichos valores son bajos y producen una afectación directa en el crecimiento. Con respecto a esto se recomienda y es necesario que la cepa de *Chlorella sorokiniana* esté expuesta a valores más alto de intensidad de luz.

#### 4.4 EVALUACIÓN DEL CONSUMO DE NUTRIENTES (NITRATOS Y FOSFATOS).



**Gráfico 7.** Eliminación de nitratos en agua residual (AR1, AR2, AR3, AR4 y AR5) por *Chlorella sorokiniana*.



**Gráfico 8.** Eliminación de fosfatos en agua residual (AR1, AR2, AR3, AR4 y AR5) por *Chlorella sorokiniana*.

**Cuadro 10.** Resumen para la eliminación de nutrientes (Nitratos y Fosfatos) en agua residual (AR1, AR2, AR3, AR4 y AR5).

Agua Residual	AR1	AR2	AR3	AR4	AR5
Nitratos (%)	87.8±5.2	79.4±3.2	65.9±1.1	58.2±5.4	67.1±8.6
Fosfatos (%)	100±0.0	90.5±0.3	94.9±0.8	74.7±3.6	88.9±3.2

**Cuadro 11.** Resumen de consumo final (ppm) de nitratos y fosfatos en agua residual (AR1, AR2, AR3, AR4 y AR5).

Agua Residual	AR1	AR2	AR3	AR4	AR5
Consumo de Nitratos (ppm)	186.8	134.7	75.2	55.2	65.5
Consumo de Fosfatos (ppm)	20.42	36.64	11.2	6.15	13.6

Las aguas residuales se pueden comparar con un medio control debido a las múltiples cargas de desechos que se presentan y que contiene altas concentraciones de compuesto con N y P. El nitrógeno se puede encontrar de muchas formas en el ambiente, debido a los siete estados de oxidación, en las aguas residuales las principales formas en las que se producen son: nitrógeno orgánico, nitrito, nitrato y a pH neutro el 99% del amoníaco se encuentra protonado en forma de ion amonio (Marín Galvín, 2019). Según Molina (2015), las proteínas suponen entre el 40 y el 60% de la materia orgánica de un agua residual, y junto con la urea, son los principales responsables de la presencia de nitrógeno en las aguas residuales. Las concentraciones de nitratos en aguas limpias tienen un límite de 50 mg/L en comparación con las aguas residuales donde la concentración de este compuesto en muchos casos alcanza los 300 mg/L. Al igual que el nitrógeno, el fósforo se puede encontrar en el ambiente de manera orgánica e inorgánica, debido a su reactividad no se encuentra libre en la naturaleza, por lo que principalmente se encuentra como fosfatos, específicamente ortofosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). Las concentraciones de fósforo total en agua residual provienen de los detergentes convencionales de uso doméstico (Mata y otros, 2010). En el caso de los fosfatos las concentraciones permitidas en aguas limpias son de 0.5 mg/L en comparación con las aguas residuales donde la concentración de este compuesto alcanza en algunos casos los 30 mg/L.

El cuadro 10 y los gráficos 7 y 8 muestran que la eliminación de nitratos y fosfatos en esta experiencia sobrepasa los 50% para todos los ensayos en agua residual. Para la eliminación de nitratos se comprobó bajo las pruebas estadísticas de ANOVA de un factor y prueba de Tuckey que existe diferencia significativa principalmente entre los ensayos AR1-AR4 y AR1-AR5 ( $P < 0.05$ ) en una escala de eliminación en % de AR1 > AR2 > AR5 > AR3 > AR4. La diferencia significativa entre ensayos para la eliminación de fosfatos son mayores, AR1-AR2, AR4, AR5 presentan diferencias, de igual manera AR2-AR4, AR3-AR4, AR5 y AR4-AR5 ( $P < 0.05$ ), la escala de eliminación en % para este compuesto es de AR1 > AR3 > AR2 > AR5 > AR4. Las diferencias de eliminación entre ensayos pueden deberse al tipo de agua residual al cual se expone *Chlorella sorokiniana* para llevar a cabo el proceso depurador (Larsdotter, 2006; Li y otros, 2019), algunas de las aguas utilizadas en esta experiencia tienen procedencia

de lugares donde se desechan residuos tóxicos que pueden estar asociados directamente con la afectación para el proceso depurador de nitratos y fosfatos. La poca diferencia entre ensayos para la eliminación de nitratos se debe que a pesar de las condiciones este es un nutriente vital para el crecimiento de *Chlorella sorokiniana* y por ende utilizará concentraciones significativas diariamente (Kim, Lee y Hwang, 2013; Chem, Ho y otros, 2017). Por otra parte, se ha reportado que algunas microalgas pueden asimilar el fósforo en exceso, que se almacena en las células en forma de gránulos de polifosfato, estas reservas pueden ser suficientes para un crecimiento prolongado en la ausencia de fósforo disponible (Larsdotter, 2006). Se ha comprobado también que *Chlorella sorokiniana* presenta buen crecimiento y productividad al aceptar concentraciones de nitratos entre los 200-300 mg/L y de fosfatos entre los 3-50 mg/L (Murwanashyaka y otros, 2017). La relación N/P inorgánica varía con diferentes tipos de aguas residuales, un intervalo de aproximadamente 10-6.8 se considera como en muchos estudios como una proporción N/P adecuada para el crecimiento de las microalgas, pero incluso a relaciones N/P de 40-1 puede existir crecimiento (Li y otros, 2019).

El cuadro 11 muestra el consumo total en mg/L-Nitratos y mg/L-Fosfatos, el alto consumo de estos nutrientes se debe al requerimiento y demanda que presenta *Chlorella sorokiniana* por los mismos. Mohsenpour y otros (2021) explican en detalle que las microalgas pueden utilizar N de una variedad de fuentes inorgánicas (p. ej.,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$ ) y orgánicas (p. ej., aminoácidos, urea, purinas y nucleósidos). Además, explican que las microalgas reducen el  $\text{NO}_3^-$  y el  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NH}_4^+$ , una reacción catalizada por las enzimas nitrato reductasa y nitrito reductasa, que requieren respectivamente de los reductores NADH y ferredoxina. Luego el amonio es asimilado por un grupo de proteínas transportadoras de membrana pertenecientes a la familia de transportadores de amonio, una proteína evolutivamente común expresada en bacterias, levaduras, algas y plantas superiores. Una vez translocado a través de la membrana, el  $\text{NH}_4^+$  puede incorporarse directamente a los aminoácidos necesarios para el crecimiento y otras funciones metabólicas (descritas a continuación). Mohsenpour y otros (2021) también estos investigadores explican que, en las microalgas, el fósforo es un elemento importante involucrado en innumerables vías

metabólicas, así como un componente estructural de fosfolípidos, nucleótidos e integral para la moneda de energía biológica, ATP. El P inorgánico en las aguas residuales existe en varios estados iónicos y, al igual que el carbono inorgánico, la especie específica depende del pH ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , <2.15;  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , 2.15 a 7.20;  $\text{HPO}_4^{2-}$ , 7.20 a 12.33; y  $\text{PO}_4^{3-}$ , >12,33) . El P inorgánico se considera generalmente como la forma más biodisponible de P, y se informa que las microalgas asimilan preferentemente  $\text{HPO}_4^{2-}$  y  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ . En las algas, la  $\text{PO}_4^{3-}$  ingresa a la célula mediante transporte activo a través de un canal importador con iones  $\text{H}^+$  o  $\text{Na}^+$  que proporcionan la fuerza impulsora, establecida por una bomba  $\text{H}^+$ -ATPasa de membrana plasmática. El fósforo se incorpora a los compuestos orgánicos después de la fosforilación del difosfato de adenosina (ADP). Esta es una reacción endergónica con el aporte de energía obtenido ya sea de la oxidación de sustratos respiratorios o de la cadena de transporte de electrones fotosintéticos. El ATP producido permite la transferencia del grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  a compuestos orgánicos a nivel de sustrato, como por ejemplo en la conversión de glucosa a glucosa-6-fosfato en la vía glucolítica.

Los resultados de eliminación de nitratos y fosfatos obtenidos en esta investigación son comparables con estudios como los de Eladel y otros en 2019, el cual utilizaron *Chlorella sorokiniana* para la depuración de aguas residuales municipales obteniendo eliminaciones máximas de nitratos y fosfatos por 74.2% y 78% respectivamente. En 2020 Chem y otros demostraron la eficiencia de remoción por *Chlorella sorokiniana* de Nitrógeno total y fósforo total en aguas residuales porcinas de 97,0 y 92,8%, respectivamente. Sin embargo, en otro estudio realizado por Wollmann y otros (2019) se muestra que *Chlorella sorokiniana* tiene una depuración variada al ser expuesta a un agua residual no convencional mostrando porcentajes de eliminación de nitrógeno total y fosfatos de 65% y 56% respectivamente. Solovchenko y otros en 2014 utilizaron *Chlorella sorokiniana* para eliminar nitratos y fosfatos de aguas residuales de destilería alcohólica, obteniendo resultados de eliminación pro 95% y 77% respectivamente. Kobayashi y otros en 2013 realizaron un estudio donde se utilizaron distintas cepas de *Chlorella sorokiniana*, obteniendo resultados variados de eliminación, nitratos por encima de los 80% y fosfatos entre los 50-60%.

#### 4.5 COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE BIOMASA DE *Chlorella sorokiniana* OBTENIDA.

**Cuadro 12.** Análisis bioquímico proximal de biomasa obtenida.

Agua Residual	AR1	AR2	AR3	AR4	AR5
<b>Lípidos (mg/L)</b>	0.733±0.231	1.900±0.173	1.733±0.404	1.103±0.006	1.767±0.058
<b>Proteínas (mg/L)</b>	19.240±3.235	8.053±1.667	7.343±0.896	7.250±1.140	7.250±0.682
<b>Clorofilas (µg/mL)</b>	20.153±4.295	10.910±4.984	10.187±2.154	8.825±3.797	8.720±3.521
<b>Carotenoides (µg/mL)</b>	4.585±0.969	4.385±0.431	2.543±0.990	3.495±1.718	3.095±1.237
<b>Carbohidratos (mg/L)</b>	---	18.187±1.822	20.517±2.810	15.810±1.824	15.313±1.909

En esta investigación se pudo comprobar bajo las pruebas estadísticas de ANOVA de un factor y prueba de Tuckey que existe diferencias significativas para la producción de lípidos, proteínas, pigmentos y carbohidratos ( $P < 0.05$ ) por *Chlorella sorokiniana* (**Producción de lípidos:** AR2>AR5>AR3>AR4>AR1, **Producción de Proteínas:** AR1>AR2>AR3>AR4>AR5, **Producción de clorofilas:** AR1>AR2>AR3>AR4>AR5, **Producción de carotenoides:**AR1>AR2>AR4>AR5>AR3, **Producción de Carbohidratos:**AR3>AR2>AR4>AR5. Las concentraciones de lípidos resultantes se encuentran entre valores de 0.7 mg/L a 1.9 mg/L, dichos valores son bajos en comparación a los mencionados en un reporte por Wu y otros en 2014, donde se muestra que *Chlorella sorokiniana* cultivada en agua residual logra una producción lipídica de hasta 4 mg/L al día. La baja producción lipídica se puede deber a las condiciones y tipo de agua residual al cual fue expuesta *Chlorella sorokiniana* en esta investigación (Ferreira y otros, 2019; Gupta y otros, 2017). La limitación de nutrientes es una presión ambiental eficiente para aumentar la acumulación de lípidos, Xin, Hong-Ying, Ke, y Ying-Xue (2010) mencionan que la limitación de nitrógeno causaría tres cambios: disminución del contenido celular de la membrana tilacoide, activación de acil hidrolasa y estimulación de hidrolisis de fosfolípido, estos cambios pueden

aumentar el contenido intracelular de ácidos grasos acil-CoA. Mientras tanto, la limitación de nitrógeno podría activar la diacilglicerol aciltransferasa, que convierte la acil-CoA en triglicéridos (TAG), por lo tanto, la limitación de nitrógeno podría aumentar el contenido de lípidos y TAG en las células de microalgas. Como se mencionó anteriormente, la concentración de nutrientes es un factor clave en el sistema de tratamiento avanzado de aguas residuales y producción de lípidos. En nuestro estudio (cuadro 7), las altas concentraciones de nutrientes principalmente de  $\text{NO}_3^-$  y otros compuestos con nitrógeno tuvieron un efecto negativo sobre la biosíntesis de lípidos en *Chlorella sorokiniana*.

La cantidad de proteínas es muy vista a la hora de obtener una biomasa microalgal, nuestros valores se encuentran entre los 7 mg/L y 19 mg/L siendo aceptable, pero se puede mejorar y acercar a lo reportado en tema de producción proteica para las microalgas del género *Chlorella*. Para obtener una mejor producción de proteínas en este tipo de estudios se recomienda analizar completamente el agua residual que se utilizará y ver su composición inicial respecto a los tipos de nitrógenos ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$ ), ya que aguas residuales con concentraciones elevadas principalmente de  $\text{NH}_4^+$  llevan a una mejor producción de proteínas con ahorro energético celular (Rasouli y otros, 2018). En nuestros resultados los cultivos AR1 y AR2 pudieron tener mayoría en producción de proteínas debido a la concentración inicial de nitratos presentes (cuadro 8). La mayoría de los estudios donde se analiza producción proteica por *Chlorella sorokiniana* se encuentra entre los 25-36% (Gupta y otros, 2017), 45% (rasouli y otros, 2018) y 50% (Kobayashi y otros, 2013), siendo relevantes las concentraciones de amonio y nitratos en cada agua residual utilizada.

Se analizan las clorofilas debido a que están estrechamente relacionadas con el proceso de fotosíntesis, las mismas permiten que las microalgas obtengan energía de la luz, y por ende su contenido podría reflejar el nivel fotosintético de *Chlorella sorokiniana* hasta cierto punto (Li, Amoah y otros, 2019), Reol (2003) hace referencia a lo mencionado anteriormente donde explica la función primordial de la clorofila de absorber energía lumínica. Este investigador menciona que la absorción, por tanto, depende en gran medida de la concentración de clorofila y de otros pigmentos

accesorios. Pero también depende obviamente de la cantidad de luz disponible y de la calidad de la misma, éste es, que contenga suficiente radiación comprendida en la banda de absorción. Cuando una molécula de clorofila capta un fotón de luz, un electrón pasa de su estado basal a otro excitado, de mayor nivel energético. Este estado excitado de la clorofila es estable por muy poco tiempo ( $10^{-9}$  seg.) e inmediatamente pueden suceder una de estas tres transiciones: transferir la energía a otra molécula de clorofila y así sucesivamente hasta que se alcanza el centro de reacción del fotosistema correspondiente (PSI o PSII) y el electrón pueda ser utilizado en el proceso fotoquímico, retornar a su nivel básico emitiendo la energía en forma de calor y no emitiendo ningún tipo de fotón, o en lugar de volver a su estado básico emitiendo calor emitir un fotón de mayor longitud de onda que la absorbida en un proceso que se conoce como fluorescencia. Cualquiera de estas tres transiciones tiene como consecuencia la disipación de la energía absorbida. La mayor parte de la fluorescencia que es emitida por la clorofila proviene de la clorofila a del PSII. La cantidad de fluorescencia emitida es una forma de medida de la eficiencia de la transferencia de los electrones; ésta incrementa si la transferencia o el proceso fotoquímico está limitado por algún factor o en condiciones de luz excesiva, produciéndose una sobrecarga de electrones excitados cuyo destino puede ser muy dañino para la propia célula.

Los resultados de clorofilas que se observan en el cuadro 12 son variados, las diferencias pueden depender principalmente a la intensidad de luz suministrada a cada cultivo (Cuadro 9) y a la concentración de micronutrientes (no analizados) como el Mg, Fe, Ca presente en las aguas residuales. Las bajas concentraciones de estos elementos provocan además una escasa construcción de ácidos nucleicos y otras proteínas importantes (Kumar y otros, 2014). La baja concentración de clorofilas puede ser representativo de un daño en los fotosistemas de *Chlorella sorokiniana*, un resultado importante a comparar es el publicado por solovchenko y otros en 2014, el mismo reporta un cultivo de *Chlorella sorokiniana* en aguas residuales de destilería alcohólica con producción de clorofilas de hasta 80 mg/L en ciclos variados durante 16 días, donde la buena producción dependió principalmente de las condiciones empleadas (pH, luz e intensidad de luz). Por otra parte, bajo condiciones limitadas de

luz la producción de carotenoides puede verse beneficiada, carotenoides importantes como la luteína han sido descubiertos en biomasa de *Chlorella sorokiniana* bajo condiciones de luz entre los 150-750  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  (Ma y otros, 2020). Bajo condiciones de estrés el caroteno más abundante en las algas es el  $\beta$ -caroteno y la luteína es la principal xantofila, pero hay además otras xantofilas que aún no estando en tan alta concentración como los anteriores se expresan y juegan un papel decisivo en la disipación de la energía excedente: violaxantina, anteraxantina y zeaxantina. La función más importante de los carotenos en las microalgas no es precisamente la de actuar como pigmento accesorio sino en la disipación de la energía en exceso y en la detoxificación de las formas reactivas del oxígeno que se forman durante la fotosíntesis (Reol, 2003).

Otro análisis en la biomasa obtenida fueron los carbohidratos, las concentraciones observadas en el cuadro 12 son considerables, la distinta producción se puede deber a que las aguas residuales utilizadas pudieron tener variabilidad en las fuentes de carbono (no analizado), la cual es esencial para la producción de carbohidratos. Las cuales dependen principalmente del funcionamiento celular por *Chlorella sorokiniana*. Se ha estudiado y analizado que un buen estado en los cloroplastos y sistemas fotosintéticos microalgales conllevan a que el ciclo de fijación de carbono sea correcto (Calvin Benson) y consigo la producción de carbohidratos (Tan y otros, 2016), algo a destacar es que nuestra investigación se llevó a cabo en ciclo total de luz (24 h) por consiguiente los procesos en fase oscura no se realizaron, esto sirve de indicador sobre la producción de carbohidratos. Markou, Angelidaki y Georgakakis (2012) mencionan algo importante relacionado a lo anterior y es que en reacciones de oscuridad el dióxido de carbono se reduce a carbohidratos por el ciclo de Calvin, utilizando la energía derivada del NADPH y ATP. Markou, Angelidaki y Georgakakis (2012) mencionan que en el ciclo de Calvin en oscuridad, el primer paso es la asimilación del dióxido de carbono, que es catalizada por la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco). El dióxido de carbono se utiliza para la carboxilación de un compuesto de cinco carbonos (ribulosa 1,5-bisfosfato) en dos compuestos de tres carbonos (3-fosfoglicerato), uno de los cuales se usa como sustrato para la formación de carbohidratos, mientras que el otro se usa para lograr el próximo ciclo. Los

carbohidratos se forman dentro del cloroplasto. Pero también en el citosol (en el caso de las procariotas los carbohidratos se sintetizan en el citosol). Relacionado a esto, Markou y otros en 2016 informan que las altas concentraciones de carbono inorgánico (CO<sub>2</sub>) también pueden afectar a las microalgas y la acumulación de carbohidratos; además, que las microalgas del género *Chlorella* acumulan más carbohidratos bajo el modo mixotrófico o heterótrofo que bajo fotoautótrofo. Tan y otros (2016) también informan que *Chlorella sorokiniana* es rica en la producción de carbohidratos (322.61 mg/L-d) siempre y cuando se encuentre en condiciones adecuadas (Temp: 27.1 C, Luz: 600 μmol/m<sup>2</sup>s); además, informan que niveles bajos de nitrógeno llevan a una mejor producción de carbohidratos, esto se puede relacionar con los valores de nitrógeno (nitratos) presente en nuestro estudio (cuadro 8) y la producción de carbohidrato en cada cultivo (cuadro 12).

# CAPÍTULO 5

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las distintas aguas residuales a la cual fue inoculada *Chlorella sorokiniana* presentaron características favorables, por lo que se logró adaptar y se observó productividad de biomasa relevante.

Las condiciones de temperatura y pH estudiadas fueron favorables en el estudio para el crecimiento de *Chlorella sorokiniana*. Sin embargo, la intensidad de luz aplicada no fue óptima, con posible relación directa sobre la productividad y depuración.

Para el proceso de depuración la *Chlorella sorokiniana* presentó variación entre ensayos, con resultados favorables que se encuentran por encima del 50%. Las variaciones en el proceso depurador se pudieron deber en gran medida a las condiciones y tipo de agua residual al cual fue expuesta *Chlorella sorokiniana*.

Las concentraciones de lípidos, proteínas, pigmentos y carbohidratos fueron muy variables, ésto se debe principalmente a las concentraciones de nutrientes presentes en el agua residual y la intensidad lumínica suministrada a cada cultivo.

Se recomienda realizar un análisis más completo de las aguas residuales, ya que concentraciones de amonio, materia orgánica y micronutrientes se deben conocer debido a su influencia en crecimiento y funcionamiento de *Chlorella sorokiniana*.

Otra recomendación sería el uso de cepas de microalgas nativas y observar su capacidad de adaptación y crecimiento en medios a base de aguas residuales

# CAPÍTULO 6

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., y Ibraheem, I. B. M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(3), pp. 257-275.
2. Acién, F. G., Gómez-Serrano, C., Morales-Amaral, M. D. M., Fernández-Sevilla, J. M., y Molina-Grima, E. (2016). Wastewater treatment using microalgae: how realistic a contribution might it be to significant urban wastewater treatment?. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(21), 9013-9022.
3. Adamakis, I. D., Lazaridis, P. A., Terzopoulou, E., Torofias, S., Valari, M., Kalaitzi, P., y Triantafyllidis, K. S. (2018). Cultivation, characterization, and properties of *Chlorella vulgaris* microalgae with different lipid contents and effect on fast pyrolysis oil composition. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(23), 23018-23032.
4. Andrade, C., Chacón, C., Cárdenas, C., y Avendaño, E. M. (2006). Remoción de nitrógeno y fósforo de aguas residuales urbanas por la microalga *Chlorella* sp. en condiciones de laboratorio. *Ciencia*, 14(1), pp 57-62
5. Asadi, P., Rad, H. A., y Qaderi, F. (2019). Comparison of *Chlorella vulgaris* and *Chlorella sorokiniana* pa. 91 in post treatment of dairy wastewater treatment plant effluents. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(28), 29473-29489.
6. Asano, T., Burton, F. L., Leverenz, H. L., y Tsuchihashi, R. G. Tchobanoglous. (2007). Water Reuse: Issues, Technologies, and Applications. *Metcalf and Eddy/AECOM-McGraw Hill Companies*, 77-83.
7. Ayala, S. (2015). Microalgas: aplicaciones e innovaciones en el tratamiento de aguas contaminadas y la producción de biocombustibles. Universidad de los Andes-Colombia
8. Béchet, Q., Muñoz, R., Shilton, A., y Guieysse, B. (2013). Outdoor cultivation of temperature-tolerant *Chlorella sorokiniana* in a column photobioreactor under low power-input. *Biotechnology and bioengineering*, 110(1), 118-126.
9. Brar, A., Kumar, M., Singh, R. P., Vivekanand, V., y Pareek, N. (2020). Phycoremediation coupled biomethane production employing sewage wastewater: Energy balance and feasibility analysis. *Bioresource Technology*, 123292.
10. Cadwell, D. (1946). Sewage oxidation ponds performance, operation and design. *Sewage Works J.*, 18, pp. 433-458.
11. Cai, T., Park, S. Y., y Li, Y. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 19, 360-369.
12. Calvachi, G. L. C., y Ortiz, I. A. S. (2013). Nitrógeno en aguas residuales: orígenes, efectos y mecanismos de remoción para preservar el ambiente y la salud pública. *Universidad y salud*, 15(1).
13. Centeno Calderón, L. G., Quintana Díaz, A., y López Fuentes, F. L. (2019). Efecto de un consorcio microbiano en la eficacia del tratamiento de aguas residuales, Trujillo, Perú. *Arnaldoa*, 26(1), 433-446.

14. Chen, C. Y., Ho, S. H., Liu, C. C., y Chang, J. S. (2017). Enhancing lutein production with *Chlorella sorokiniana* Mb-1 by optimizing acetate and nitrate concentrations under mixotrophic growth. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 79, 88-96.
15. Chen, J. H., Kato, Y., Matsuda, M., Chen, C. Y., Nagarajan, D., Hasunuma, T., y Chang, J. S. (2019). A novel process for the mixotrophic production of lutein with *Chlorella sorokiniana* MB-1-M12 using aquaculture wastewater. *Bioresource technology*, 290, 121786.
16. Chen, C. Y., Kuo, E. W., Nagarajan, D., Ho, S. H., Dong, C. D., Lee, D. J., y Chang, J. S. (2020). Cultivating *Chlorella sorokiniana* AK-1 with swine wastewater for simultaneous wastewater treatment and algal biomass production. *Bioresource technology*, 302, 122814.
17. Chevalier, P., y de la Noüe, J. (1985). Wastewater nutrient removal with microalgae immobilized in carrageenan. *Enzyme and microbial technology*, 7(12), pp.621-624.
18. Chinnasamy, S., Bhatnagar, A., Hunt, R. W., y Das, K. C. (2010). Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresource technology*, 101(9), 3097-3105.
19. Craggs, R. J., McAuley, P. J., y Smith, V. J. (1997). Wastewater nutrient removal by marine microalgae grown on a corrugated raceway. *Water Research*, 31(7), pp.1701-1707.
20. Cuaresma, M., Janssen, M., Vílchez, C., & Wijffels, R. H. (2009). Productivity of *Chlorella sorokiniana* in a short light-path (SLP) panel photobioreactor under high irradiance. *Biotechnology and bioengineering*, 104(2), 352-359.
21. Cui, H., Ma, H., Chen, S., Yu, J., Xu, W., Zhu, X. y Li, R. (2020). Mitigating excessive ammonia nitrogen in chicken farm flushing wastewater by mixing strategy for nutrient removal and lipid accumulation in the green alga *Chlorella sorokiniana*. *Bioresource Technology*, 303, 122940.
22. de-Bashan, L. E., Trejo, A., Huss, V. A., Hernandez, J. P., y Bashan, Y. (2008). *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, sunlight-tolerant microalga with potential for removing ammonium from wastewater. *Bioresource technology*, 99(11), 4980-4989.
23. Empanan, Q., Jye, Y. S., Danquah, M. K., y Harun, R. (2020). Cultivation of *Nannochloropsis* sp. microalgae in palm oil mill effluent (POME) media for phycoremediation and biomass production: Effect of microalgae cells with and without beads. *Journal of Water Process Engineering*, 33, 101043.
24. Eladel, H., Abomohra, A. E. F., Battah, M., Mohmmed, S., Radwan, A., y Abdelrahim, H. (2019). Evaluation of *Chlorella sorokiniana* isolated from local municipal wastewater for dual application in nutrient removal and biodiesel production. *Bioprocess and biosystems engineering*, 42(3), 425-433.
25. Fan, J., Chen, Y., Zhang, T. C., Ji, B., y Cao, L. (2020). Performance of *Chlorella sorokiniana*-activated sludge consortium treating wastewater under light-limited heterotrophic condition. *Chemical Engineering Journal*, 382, 122799.

26. Ferreira, G. F., Pinto, L. R., Maciel Filho, R., y Fregolente, L. V. (2019). A review on lipid production from microalgae: Association between cultivation using waste streams and fatty acid profiles. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 109, 448-466.
27. Ferro, G., y Lentini, E. (2012). Infraestructura y equidad social: Experiencias en agua potable, saneamiento y transporte urbano de pasajeros en América Latina. División de Recursos Naturales e Infraestructura, *Naciones unidas*. pp.5-55.
28. Filip, D. S., Peters, V. T., Adams, E. D., y Middlebrooks, J. (1979). Residual heavy metal removal by an algae-intermittent sand filtration system. *Water Research*, 13(3), pp. 305-313.
29. Garbisu, C., Hall, D. O., Llama, M. J., y Serra, J. L. (1994). Inorganic nitrogen and phosphate removal from water by free-living and polyvinyl-immobilized *Phormidium laminosum* in batch and continuous-flow bioreactors. *Enzyme and microbial technology*, 16(5), pp. 395-401.
30. Gonçalves, A. L., Pires, J. C., y Simões, M. (2017). A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Research*, 24, 403-415.
31. Gupta, S. K., Ansari, F. A., Nasr, M., Rawat, I., Nayunigari, M. K., y Bux, F. (2017). Cultivation of *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus obliquus* in wastewater: fuzzy intelligence for evaluation of growth parameters and metabolites extraction. *Journal of Cleaner Production*, 147, 419-430.
32. Gupta, S. K., Ansari, F. A., Shrivastav, A., Sahoo, N. K., Rawat, I., y Bux, F. (2016). Dual role of *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus obliquus* for comprehensive wastewater treatment and biomass production for bio-fuels. *Journal of Cleaner Production*, 115, pp.255-264.
33. Gupta, S., Pawar, S. B., y Pandey, R. A. (2019). Current practices and challenges in using microalgae for treatment of nutrient rich wastewater from agro-based industries. *Science of the total environment*, 687, 1107-1126.
34. Hernández Sánchez, J. P. (2004). Evaluación de un sistema de microalgas y bacterias para la eliminación de nutrientes de las aguas residuales domésticas (Tesis Doctoral, Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas), pp.1-31.
35. Horan, N.J., (1990). *Biological Wastewater Treatment Systems. Theory and operation*. John Wiley and Sons Ltd. Baffins Lane, Chichester. West Sussex PO 191 UD, England.
36. Jia, H., y Yuan, Q. (2016). Removal of nitrogen from wastewater using microalgae and microalgae-bacteria consortia. *Cogent Environmental Science*, 2(1), 1275089.
37. Kangas, P., y Mulbry, W. (2014). Nutrient removal from agricultural drainage water using algal turf scrubbers and solar power. *Bioresource technology*, 152, 484-489.
38. Kobayashi, N., Noel, E. A., Barnes, A., Watson, A., Rosenberg, J. N., Erickson, G., y Oyler, G. A. (2013). Characterization of three *Chlorella sorokiniana* strains in anaerobic digested effluent from cattle manure. *Bioresource technology*, 150, 377-386.

39. Kotoula, D., Iliopoulou, A., Irakleous-Palaiologou, E., Gatidou, G., Aloupi, M., Antonopoulou, P., y Stasinakis, A. S. (2020). Municipal wastewater treatment by combining in series microalgae *Chlorella sorokiniana* and macrophyte *Lemna minor*: Preliminary results. *Journal of Cleaner Production*, 271, 122704.
40. Kim, T. H., Lee, Y., Han, S. H., y Hwang, S. J. (2013). The effects of wavelength and wavelength mixing ratios on microalgae growth and nitrogen, phosphorus removal using *Scenedesmus* sp. for wastewater treatment. *Bioresource technology*, 130, 75-80.
41. Khalid, A. A. H., Yaakob, Z., Abdullah, S. R. S., y Takriff, M. S. (2019). 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*, 210, 673-686.
42. Kumar, K., Dasgupta, C. N., y Das, D. (2014). Cell growth kinetics of *Chlorella sorokiniana* and nutritional values of its biomass. *Bioresource technology*, 167, 358-366.
43. Ma, R., Zhang, Z., Ho, S. H., Ruan, C., Li, J., Xie, Y., y Chen, J. (2020). Two-stage bioprocess for hyper-production of lutein from microalga *Chlorella sorokiniana* FZU60: Effects of temperature, light intensity, and operation strategies. *Algal Research*, 52, 102119.
44. Marín Galvín, R. (2019). *Fisicoquímica y microbiología de los medios acuáticos: tratamiento y control de calidad de aguas*. Ediciones Díaz de Santos.
45. Martins, A. A., Mata, T. M., de Sá Caetano, N., Morais Junior, W. G., Gorgich, M., y Corrêa, P. S. (2020). Microalgae for biotechnological applications: Cultivation, harvesting and biomass processing.
46. Markou, G., Angelidaki, I., y Georgakakis, D. (2012). Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Applied microbiology and biotechnology*, 96(3), 631-645.
47. Mata, T. M., Martins, A. A., y Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(1), pp. 217-232.
48. Mateo-Sagasta, J., Raschid-Sally, L., y Thebo, A. (2015). Global wastewater and sludge production, treatment and use. In *Wastewater* (pp. 15-38). Springer, Dordrecht.
49. Massoud, MA, Tarhini, A. y Nasr, JA (2009). Enfoques descentralizados para el tratamiento y la gestión de aguas residuales: aplicabilidad en países en desarrollo. *Revista de gestión ambiental*, 90 (1), 652-659.
50. Masud, R. A., Yeasmin, F., Hasan, M. M., y Kamruzzaman, M. (2022). Reuse of Treated Wastewater through Emerging Technologies. In *Wastewater Treatment* (pp. 123-138). CRC Press.
51. Mazzeo, N., Clemente, J., García-Rodríguez, F., Gorga, J., Kruk, C., Larrea, D., & Scasso, F. (2002). Eutrofización: causas, consecuencias y

- manejo. *Perfil Ambiental del Uruguay. Montevideo: Nordan-Comunidad*, pp. 39-56.
52. Miyawaki, B., Mariano, A. B., Vargas, J. V. C., Balmant, W., Defrancheschi, A. C., Corrêa, D. O., y Kava, V. M. (2020). Microalgae derived biomass and bioenergy production enhancement through biogas purification and wastewater treatment. *Renewable Energy*.
  53. Mohsenpour, S. F., Hennige, S., Willoughby, N., Adeloje, A., y Gutierrez, T. (2021). Integrating micro-algae into wastewater treatment: A review. *Science of the Total Environment*, 752, 142168.
  54. Molina, P. (2015). Planta demostración de depuración de aguas residuales con microalgas.
  55. Molinuevo-Salces, B., Riaño, B., Hernández, D., y García-González, M. C. (2019). Microalgae and wastewater treatment: advantages and disadvantages. In *Microalgae biotechnology for development of biofuel and wastewater treatment* (pp. 505-533). Springer, Singapore.
  56. Moronta, R., Mora, R., & Morales, E. (2006). Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 23(1), pp.27-41.
  57. Muñoz, R., Guieysse, B., & Mattiasson, B. (2003). Phenanthrene biodegradation by an algal-bacterial consortium in two-phase partitioning bioreactors. *Applied microbiology and biotechnology*, 61(3), 261-267.
  58. Murwanashyaka, T., Shen, L., Ndayambaje, J. D., Wang, Y., He, N., y Lu, Y. (2017). Kinetic and transcriptional exploration of *Chlorella sorokiniana* in heterotrophic cultivation for nutrients removal from wastewaters. *Algal Research*, 24, 467-476.
  59. Nagarajan, D., Lee, D. J., Chen, C. Y., y Chang, J. S. (2020). Resource recovery from wastewaters using microalgae-based approaches: A circular bioeconomy perspective. *Bioresource technology*, 302, 122817.
  60. Larsdotter, K. (2006). Tratamiento de aguas residuales con microalgas: revisión de la literatura. *Vatten*, 62 (1), 31.
  61. Lau, P. S., Tam, N. F. Y., y Wong, Y. S. (1995). Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater. *Environmental Pollution*, 89(1), pp. 59-66.
  62. Li, D., Amoah, P. K., Chen, B., Xue, C., Hu, X., Gao, K., y Deng, X. (2019). Feasibility of growing *Chlorella sorokiniana* on cooking cocoon wastewater for biomass production and nutrient removal. *Applied biochemistry and biotechnology*, 188(3), 663-676.
  63. Li, K., Liu, Q., Fang, F., Luo, R., Lu, Q., Zhou, W., y Chen, P. (2019). Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: A review. *Bioresource Technology*, 291, 121934.
  64. Li, S., Zhao, S., Yan, S., Qiu, Y., Song, C., Li, Y., y Kitamura, Y. (2019). Food processing wastewater purification by microalgae cultivation associated with high value-added compounds production—A review. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 27(12), 2845-2856.

65. Li, T., Zheng, Y., Yu, L., y Chen, S. (2013). High productivity cultivation of a heat-resistant microalga *Chlorella sorokiniana* for biofuel production. *Bioresource technology*, 131, 60-67.
66. Li, Y., Zhou, W., Hu, B., Min, M., Chen, P., y 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.
67. Lim, S. L., Chu, W. L., y Phang, S. M. (2010). Use of *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater. *Bioresource Technology*, 101(19), pp.7314-7322.
68. Liu, K., Li, J., Qiao, H., Lin, A., y Wang, G. (2012). Immobilization of *Chlorella sorokiniana* GXNN 01 in alginate for removal of N and P from synthetic wastewater. *Bioresource technology*, 114, pp. 26-32.
69. Liu, X., Fujiwara, M., Kodera, T., Watanabe, K., Akizuki, S., Kishi, M., y Ban, S. (2020). Conditions for continuous cultivation of *Chlorella sorokiniana* and nutrient removal from anaerobic digestion effluent of aquatic macrophytes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 149, 104923.
70. Liu, J., Sun, Z., y Gerken, H. (2014). Recent advances in microalgal biotechnology. *OMICS Group International, Henderson*. pp 4-12.
71. Lizzul, A. M., Hellier, P., Purton, S., Baganz, F., Ladommatos, N., y Campos, L. (2014). Combined remediation and lipid production using *Chlorella sorokiniana* grown on wastewater and exhaust gases. *Bioresource technology*, 151, pp.12-18.
72. López, J. A. P., y García, M. E., (1999). Estudio sanitario del agua. Universidad de Granada.
73. Lu, S., Wang, J., Ma, Q., Yang, J., Li, X., y Yuan, Y. J. (2013). Phospholipid metabolism in an industry microalga *Chlorella sorokiniana*: the impact of inoculum sizes. *PLoS One*, 8(8), e70827.
74. Ogbonna, J. C., Yoshizawa, H., y Tanaka, H. (2000). Treatment of high strength organic wastewater by a mixed culture of photosynthetic microorganisms. *Journal of Applied Phycology*, 12(3-5), pp. 277-284.
75. Olguín, EJ (2003). Phycoremediation: cuestiones clave para los procesos rentables de eliminación de nutrientes. *Avances en biotecnología* , 22 (1-2), pp 81-91.
76. Olguín, E. J., y Sánchez-Galván, G. (2019). Phycoremediation: Challenges and Applications. *Comprehensive Biotechnology (Third Edition)*, 6, pp 253-260.
77. Oswald, W., y Gotaas, H. (1957) Photosynthesis in sewage treatment. *American Society of Civil Engineers*, p.2849.
78. Oyebamiji, O. O., Boeing, W. J., Holguin, F. O., Ilori, O., y Amund, O. (2019). Green microalgae cultured in textile wastewater for biomass generation and biodetoxification of heavy metals and chromogenic substances. *Bioresource Technology Reports*, 7, 100247.
79. Paskuliakova, A., McGowan, T., Tonry, S. y Touzet, N. (2018). Fitorremediación de lixiviados de vertederos con la clorofita

- Chlamydomonas* sp. SW15aRL y evaluación de toxicidad pre y post tratamiento. *Ecotoxicología y seguridad ambiental*, 147, 622-630.
80. Passos, F., Uggetti, E., Carrère, H., & Ferrer, I. (2014). Pretreatment of microalgae to improve biogas production: a review. *Bioresource technology*, 172, 403-412.
  81. Pérez García, R. O. (2009). Eliminación de nutrientes para el tratamiento biológico de agua residual usando un sistema inmovilizado microalga-bacteria en crecimiento autotrófico, heterotrófico y mixotrófico.
  82. Perez-García, O., Escalante, F. M., de-Bashan, L. E., y Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water research*, 45(1), pp.11-36.
  83. Pinzón Castañeda, G. P., y Gómez Sierra, H. (2013). Análisis de la mitigación del impacto ambiental en el lago del parque La Florida, por fitorremediación usando buchón de agua. pp.9-26.
  84. Qiu, R., Gao, S., Lopez, P. A., y Ogden, K. L. (2017). Effects of pH on cell growth, lipid production and CO<sub>2</sub> addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Algal research*, 28, 192-199.
  85. Ramanna, L., Guldhe, A., Rawat, I., y Bux, F. (2014). The optimization of biomass and lipid yields of *Chlorella sorokiniana* when using wastewater supplemented with different nitrogen sources. *Bioresource technology*, 168, pp.127-135.
  86. Ramsundar, P., Guldhe, A., Singh, P., y Bux, F. (2017). Assessment of municipal wastewaters at various stages of treatment process as potential growth media for *Chlorella sorokiniana* under different modes of cultivation. *Bioresource technology*, 227, 82-92.
  87. Rasouli, Z., Valverde-Pérez, B., D'Este, M., De Francisci, D., y Angelidaki, I. (2018). Nutrient recovery from industrial wastewater as single cell protein by a co-culture of green microalgae and methanotrophs. *Biochemical Engineering Journal*, 134, 129-135.
  88. Rawat, I., Kumar, R. 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), pp.3411-3424.
  89. Renuka, N., Sood, A., Prasanna, R. y Ahluwalia, A.S. (2015). Phycoremediation of wastewaters: a synergistic approach using microalgae for biorremediation and biomass generation. *International Journal of Environment, Science and Technology*, 12, pp.1443-1460.
  90. Reol, E. M. (2003). Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz para la fotosíntesis. *Ecosistemas*, 12(1).
  91. Rodríguez Herrera, F. (2000). Realidades y perspectivas de las aguas residuales en el estado de Zacatecas, una alternativa de desarrollo ante el nuevo milenio. In *Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales*, 12, pp. 1-5. FEMISCA.

92. Ruiz Martínez, A. (2011). Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente.
93. Serdarevic, A., y Dzibur, A. (2018). Importance and practice of operation and maintenance of wastewater treatment plants. In *International Symposium on Innovative and Interdisciplinary Applications of Advanced Technologies* (pp. 121-137). Springer, Cham.
94. Severiche Sierra, C., y González García, H. (2012). Determinación de Fosfatos en Aguas por Método Colorimétrico. Validación del Método. *Química Hoy*, 2(3).
95. Singh, A. K., Rana, H. K., Yadav, R. K., y Pandey, A. K. (2020). Dual role of microalgae: phycoremediation coupled with biomass generation for biofuel production. In *Restoration of wetland ecosystem: a trajectory towards a sustainable environment* (pp. 161-178). Springer, Singapore.
96. Singh, M., Reynolds, D. L., y Das, K. C. (2011). Microalgal system for treatment of effluent from poultry litter anaerobic digestion. *Bioresource technology*, 102(23), 10841-10848.
97. Singh, S. P., y Singh, P. (2015). Effect of temperature and light on the growth of algae species: a review. *renewable and sustainable energy reviews*, 50, 431-444.
98. Silva, J., Alves, C., Pinteus, S., Reboleira, J., Pedrosa, R., y Bernardino, S. (2019). Chlorella. In *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements* (pp. 187-193). Academic Press.
99. Solovchenko, A., Pogosyan, S., Chivkunova, O., Selyakh, I., Semenova, L., Voronova, E., y Lobakova, E. (2014). Phycoremediation of alcohol distillery wastewater with a novel Chlorella sorokiniana strain cultivated in a photobioreactor monitored on-line via chlorophyll fluorescence. *Algal Research*, 6, pp.234-241.
100. Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., y Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(2), pp.87-96.
101. Stewart, I., Webb, P. M., Schluter, P. J., y Shaw, G. R. (2006). Recreational and occupational field exposure to freshwater cyanobacteria—a review of anecdotal and case reports, epidemiological studies and the challenges for epidemiologic assessment. *Environmental Health*, 5(1), 6.
102. Su, Y. (2021). Revisiting carbon, nitrogen, and phosphorus metabolisms in microalgae for wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 762, 144590.
103. Sukačová, K., Trtílek, M., y Rataj, T. (2015). Phosphorus removal using a microalgal biofilm in a new biofilm photobioreactor for tertiary wastewater treatment. *Water research*, 71, 55-63.
104. Tan, F., Wang, Z., Zhouyang, S., Li, H., Xie, Y., Wang, Y., y Li, Q. (2016). Nitrogen and phosphorus removal coupled with carbohydrate production by five microalgae cultures cultivated in biogas slurry. *Bioresource technology*, 221, 385-393.

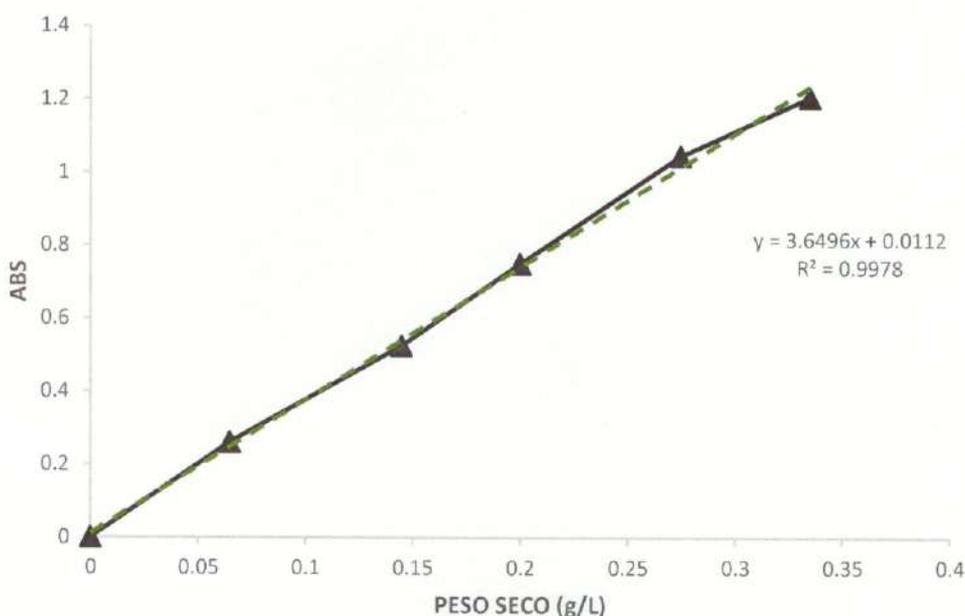
105. Tam, N. F. Y., y Wong, Y. S. (1989). Wastewater nutrient removal by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus* sp. *Environmental Pollution*, 58(1), pp.19-34.
106. Torres-Franco, A., Passos, F., Figueredo, C., Mota, C., & Muñoz, R. (2021). Current advances in microalgae-based treatment of high-strength wastewaters: challenges and opportunities to enhance wastewater treatment performance. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 20(1), 209-235.
107. Ugwu, C. U., Ogbonna, J. C., y Tanaka, H. (2005). Characterization of light utilization and biomass yields of *Chlorella sorokiniana* in inclined outdoor tubular photobioreactors equipped with static mixers. *Process Biochemistry*, 40(11), pp.3406-3411.
108. United Nations (2012). World population prospects: the 2012 revision. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division, NY.
109. U.S. Environmental Protection Agency., (1975). Process design manual for nitrogen control Office of technology transfer. Washington DC.
110. Ugwu, CU, Aoyagi, H. y Uchiyama, H. (2007). Influencia de la irradiancia, la concentración de oxígeno disuelto y la temperatura en el crecimiento de *Chlorella sorokiniana*. *Photosynthetica* , 45 (2), 309-311.
111. Witt, V., y Borchardt, J. A. (1960). The removal of nitrogen and phosphorus from sewage effluents through the use of algal culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 2(2), pp.187-203.
112. Wollmann, F., Dietze, S., Ackermann, J. U., Bley, T., Walther, T., Steingroewer, J., y Krujatz, F. (2019). Microalgae wastewater treatment: Biological and technological approaches. *Engineering in Life Sciences*, 19(12), 860-871.
113. Wu, L. F., Chen, P. C., Huang, A. P., y Lee, C. M. (2012). The feasibility of biodiesel production by microalgae using industrial wastewater. *Bioresource Technology*, 113, 14-18.
114. Wu, Y. H., Hu, H. Y., Yu, Y., Zhang, T. Y., Zhu, S. F., Zhuang, L. L., y Lu, Y. (2014). Microalgal species for sustainable biomass/lipid production using wastewater as resource: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 33, 675-688.
115. Xin, L., Hong-Ying, H., Ke, G., & Ying-Xue, S. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource technology*, 101(14), 5494-5500.
116. Yun, H. S., Kim, Y. S., y Yoon, H. S. (2020). Characterization of *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella vulgaris* fatty acid components under a wide range of light intensity and growth temperature for their use as biological resources. *Heliyon*, 6(7), e04447.

# ANEXOS

### 7.1 CRECIMIENTO CELULAR-CURVA DE ABS VS CONCENTRACIÓN

La cinética de crecimiento de la microalga se evaluó de acuerdo a la cantidad de biomasa generada por día (Cuaresma y otros, 2009). Para este análisis se preparó un gráfico de ABS vs Concentración.

Para realizar dicho gráfico se prepararon 5 patrones con concentraciones de 20%, 40%, 60%, 80% y 100% del inóculo microalgal, a estos patrones se le evaluó los sólidos suspendidos (concentración) filtrando 10 mL de cada patrón, utilizando filtros a peso constante, los cuales posteriormente se secaron a 85 °C por 24 horas. Seguidamente a los patrones se le evaluó la ABS a una longitud de onda de 680 nm, utilizando el espectrofotómetro HACH DR3900. Una vez obtenido los datos se procedió con la elaboración de la curva de calibración.



**Gráfico 9.** Curva de calibración para análisis de crecimiento celular.

## 7.2 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA ANÁLISIS DE NITRATOS

### Preparación de Patrón de Nitrato 1000 mg/L

- Pureza de  $\text{KNO}_3 = 99\%$
- $\text{PM} = 101,11 \text{ g/mol}$

$$(1000 \text{ mg/L}) \left( \frac{1 \text{ g NO}_3}{1000 \text{ mg NO}_3} \right) \left( \frac{101,4 \text{ g KNO}_3}{62,02 \text{ g NO}_3} \right) = 1,63 \text{ g KNO}_3 \text{ puros}$$

$$1,63 \text{ g KNO}_3 = 100\%$$

$$X = 99\%$$

$X = 1,65 \text{ g KNO}_3$ , Disolver en 1000 mL de agua destilada para obtener un patrón de 1000 ppm

### Preparación de disolución patrón 50ppm

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(1000 \text{ ppm})V_1 = (50 \text{ ppm})(250 \text{ mL})$$

$$V_1 = \frac{(50 \text{ ppm})(250 \text{ mL})}{1000 \text{ ppm}}$$

$V_1 = 12,5 \text{ mL}$  de disolución de 1000 ppm, aforar con agua destilada a un volumen de 250 mL. Para obtener una solución patrón de 50 ppm.

### Preparación de las disoluciones de la curva estándar

Patrón	[NO <sub>3</sub> ] ppm	Vol (mL)	
		mL solución madre	H <sub>2</sub> O mL
blanco	1	1	49
1	4	4	46
2	8	8	42
3	12	12	38
4	16	16	34
5	20	20	30
6	30	24	26

### Cálculos

- Patrón 1

$$V_f = \frac{(1 \text{ mg/L})(50 \text{ ml})}{50 \text{ mg/L}} = 1 \text{ mL}$$

- Patrón 2

$$V_f = \frac{(4 \text{ mg/L})(50 \text{ ml})}{50 \text{ mg/L}} = 4 \text{ mL}$$

- Patrón 3

$$V_f = \frac{(8 \text{ mg/L})(50 \text{ ml})}{50 \text{ mg/L}} = 8 \text{ mL}$$

- Patrón 4

$$V_f = \frac{(12 \text{ mg/L})(50 \text{ ml})}{50 \text{ mg/L}} = 12 \text{ mL}$$

- Patrón 5

$$V_f = \frac{(16 \text{ mg/L})(50 \text{ ml})}{50 \text{ mg/L}} = 16 \text{ mL}$$

- Patrón 6

$$V_f = \frac{(20 \text{ mg/L})(50 \text{ ml})}{50 \text{ mg/L}} = 20 \text{ mL}$$

Para el análisis de concentración de nitratos se utiliza el reactivo HACH (HACH, Nitrover 5 – Rango alto y medio), La determinación de nitratos se realizó a través del método por reducción por cadmio, en este método el cadmio metálico reduce a nitritos los nitratos de la muestra, el ion de nitrito reacciona en un medio ácido con ácido sulfanílico para formar una sal intermedia de diazonio, esta sal se une al ácido genticico para formar el producto de color ámbar el cual presenta una absorbancia a una longitud de onda de 500 nm (HACH Company, 2000).

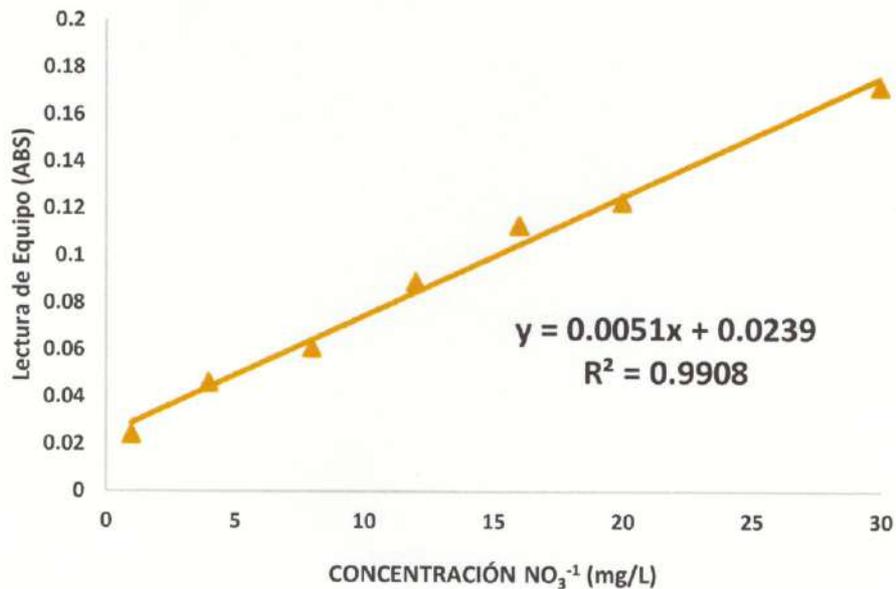


Gráfico 10. Curva de calibración para la determinación de Nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-1</sup>).

### 7.3 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA ANÁLISIS DE FOSFATOS

Patrón de fosfato 1000 mg/L

#### Preparación de disolución patrón 50 ppm

$$C_1V_1=C_2V_2$$

$$(1000 \text{ ppm})V_1 = (50 \text{ ppm}) (500 \text{ mL})$$

$$V_1 = \frac{(50 \text{ ppm})(500 \text{ mL})}{1000 \text{ ppm}}$$

$V_1 = 25 \text{ mL}$  de disolución de 1000 ppm, aforar a un volumen de 500 mL.

#### Preparación de las disoluciones de la curva estándar

Patrón	[PO <sub>4</sub> ] ppm	Vol (mL)	
		ml solución madre	H <sub>2</sub> O (Aforo)-mL
blanco	1	0	50
1	4	0.2	49.8
2	0.4	0.4	49.6
3	0.6	0.6	49.4
4	0.8	0.8	49.2
5	1.0	1.0	49
6	1.5	1.5	48.5
7	2.0	2.0	48
8	3.0	3.0	47

#### **Preparación del reactivo combinado**

- Peso del Ácido Ascórbico 0,1 M = 1,7630, Disolver con 100 mL de agua destilada hasta el aforo.
- Peso del Tartrato de antimonio y potasio= 1,3715 g, Disolver con 500 mL de agua destilada hasta el aforo.
- Peso del molibdato 3%= 3,0030 g
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5N= 70 mL -500 mL

#### Volumenes de reactivos para Reactivo mixto para 50 ml (patrones)

- 50 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

- 5 mL Tartrato de antimonio y potasio
- 15 mL molibdato de amonio
- 30 mL Ácido Ascórbico
- **Agregar 8 mL de este reactivo a cada muestra**

### Cálculos

- Patrón 1

$$V_f = \frac{(0.2 \text{ mg/L})(50 \text{ mL})}{50 \text{ mg/L}} = 0.2 \text{ mL}$$

- Patrón 2

$$V_f = \frac{(0.4 \text{ mg/L})(50 \text{ mL})}{50 \text{ mg/L}} = 0.4 \text{ mL}$$

- Patrón 3

$$V_f = \frac{(0.6 \text{ mg/L})(50 \text{ mL})}{50 \text{ mg/L}} = 0.6 \text{ mL}$$

- Patrón 4

$$V_f = \frac{(0.8 \text{ mg/L})(50 \text{ mL})}{50 \text{ mg/L}} = 0.8 \text{ mL}$$

- Patrón 5

$$V_f = \frac{(1 \text{ mg/L})(50 \text{ mL})}{50 \text{ mg/L}} = 1 \text{ mL}$$

- Patrón 6

$$V_f = \frac{(1.5 \text{ mg/L})(50 \text{ mL})}{50 \text{ mg/L}} = 1.5 \text{ mL}$$

- Patrón 7

$$V_f = \frac{(2.0 \text{ mg/L})(50 \text{ mL})}{50 \text{ mg/L}} = 2.0 \text{ mL}$$

- Patrón 8

$$V_f = \frac{(3.0 \text{ mg/L})(50 \text{ mL})}{50 \text{ mg/L}} = 3.0 \text{ mL}$$

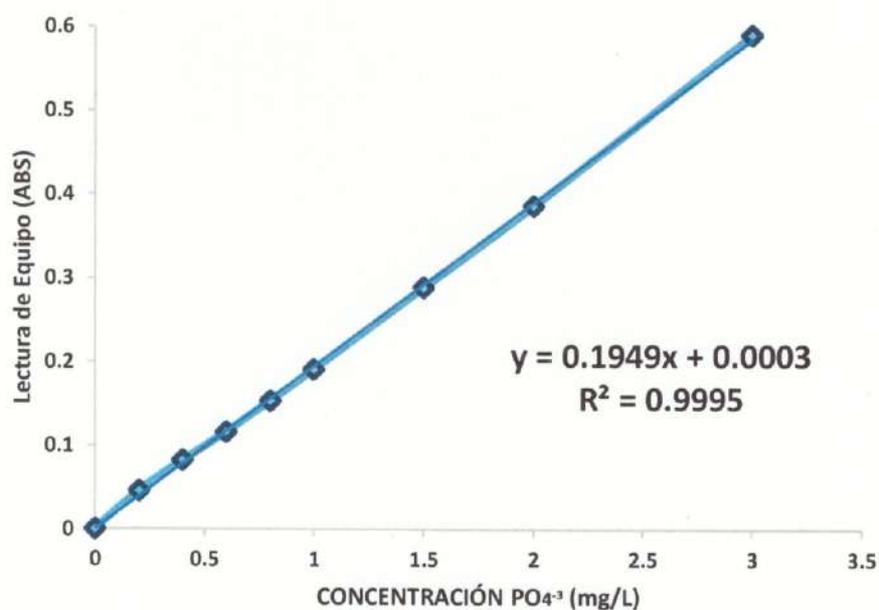
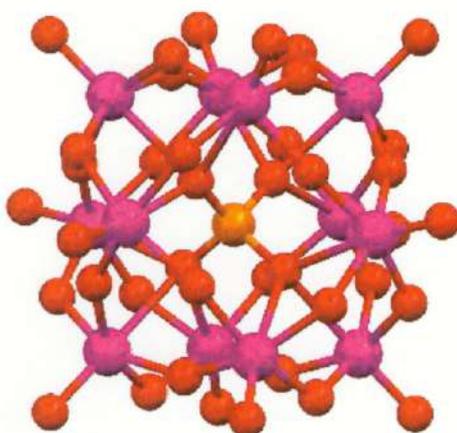


Gráfico 11. Curva de calibración para la determinación de fosfatos (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>).

La determinación de fosfatos se realizó, a través del método de azul de ácido ascórbico debido a su sensibilidad y simplicidad (Severiche y González, 2012). El principio de este método se basa en lo siguiente, en medio ácido el molibdato de amonio y el tartrato de antimonio reaccionan con el fosfato con formación de un heteropoliácido fosfomolibdico el cual tiene una estructura de keggin (Figura 6) (que se autoasambla en soluciones acuosas acidas), la estructura de keggin facilita la reducción por parte del ácido ascórbico a azul de molibdeno, complejo intensamente coloreado el cual presenta una absorbancia a una longitud de onda de 880 nm (Severiche y González, 2012).



**Figura 6.** Estructura de Keggin con el átomo de fósforo central en naranja, los átomos de molibdeno en violeta y los de oxígeno en rojo.

#### 7.4 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS TOTALES

Se colocaron 3 mL de cultivo fresco de la microalga en tubos de centrifuga, se centrifugó a 4000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante. Los tubos con la biomasa húmeda se les adicionaron aproximadamente 2 mL de NaOH 1N, se sonicaron y se colocaron en un baño térmico a una temperatura entre 95 y 100 °C por 1 hora. Posteriormente se centrifugó la mezcla y se colocó una alícuota de ésta en un nuevo tubo de vidrio junto con porciones de NaOH 1N y agua. A esta mezcla se le adicionó el reactivo 3 (solución de Cu-tartrato saturada), se mezcló y se dejó reaccionar por 10 min. Seguidamente se adicionó el reactivo 4 (Folin-Ciocalteu diluido), se mezcló y se dejó reaccionar por 30 min a temperatura ambiente. La absorbancia de las muestras se leyó a 750 nm y se correlacionó con una curva de calibración con el estándar de BSA para determinar el contenido de proteínas.

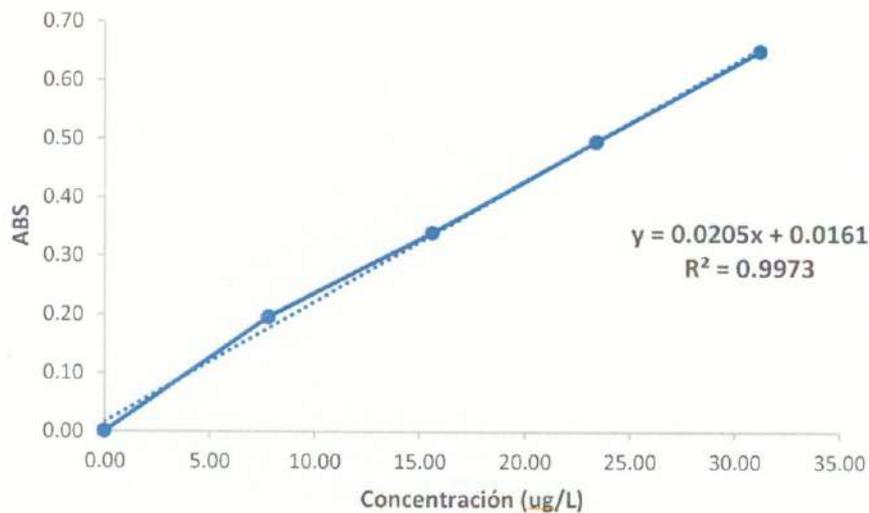


Gráfico 12. Curva de calibración obtenida para análisis de proteínas

#### 7.5 ANÁLISIS DE PIGMENTOS TOTALES (CLOROFILAS Y CAROTENOIDES). PROTOCOLO:

- Para el caso de cultivos poco concentrados, colocar de 30 a 45 mL en tubos cónicos de plástico. Para cultivos concentrados usar 15 mL.
- Centrifugar a 2,200 xg de 2 a 10 min (dependiendo de la microalga). Si se trata de diatomeas y rodofíceas de 6 a 10 min; y si son dinoflagelados, 2 min a 15°C.
- Desechar el sobrenadante con una pipeta Pasteur y/o en el caso de que la pastilla celular esté muy compacta, decantar.

- d) Colocar la pastilla celular en un tubo de vidrio limpio con tapón de rosca y cubrir con papel aluminio para evitar la fotooxidación.
- e) Añadir 3 mL de acetona al 90% o 100% (según la microalga) y agitar en el vortex para permitir la extracción de los pigmentos.
- f) Sonicar en baño de hielo dos ciclos durante 5 min. Dejar las muestras en reposo a 4°C durante la noche (12 a 16 h).
- g) Volver a sonicar en las condiciones anteriores.
- h) Centrifugar a 5000 rpm por 10 min a 15°C. Separar el extracto de pigmentos con una pipeta Pasteur limpia y colocarlo en otro tubo limpio y protegido de la luz.
- i) Colocar los pigmentos en una celda de cuarzo y leerlos en un espectrofotómetro previamente calibrado con acetona al 90% o 100% a las longitudes indicadas en las ecuaciones

Ecuaciones propuestas por Jeffrey y Humphrey (1975) y Humphrey (1979) para el análisis de pigmentos en microalgas verdes.

$$\text{Clorofila a} = C_a = 11.97 A_{664} - 1.93 A_{647} \quad (\text{Ec 2})$$

$$\text{Clorofila b} = C_b = 20.36 A_{647} - 5.50 A_{664} \quad (\text{Ec 3})$$

$$\text{Carotenoides} = 7.6 (A_{480} - A_{510}) \quad (\text{Ec 4})$$

## 7.6 ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS

### PROTOCOLO:

#### Curva de calibración

La curva de concentración se obtiene usando un gradiente de concentraciones de glucosa anhidra preparada a partir de una solución de 120 µg mL<sup>-1</sup>.

Volumen de glucosa (µL)	Volumen de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (µL)	Vol. Total (µL)	Glucosa (µg mL <sup>-1</sup> )	A <sub>485</sub> nm promedio
0	1000	1000	0	0
200	800	1000	24.08	0.190
400	600	1000	48.16	0.415
600	400	1000	72.24	0.617
800	200	1000	96.32	0.793
1000	0	1000	120.40	0.888

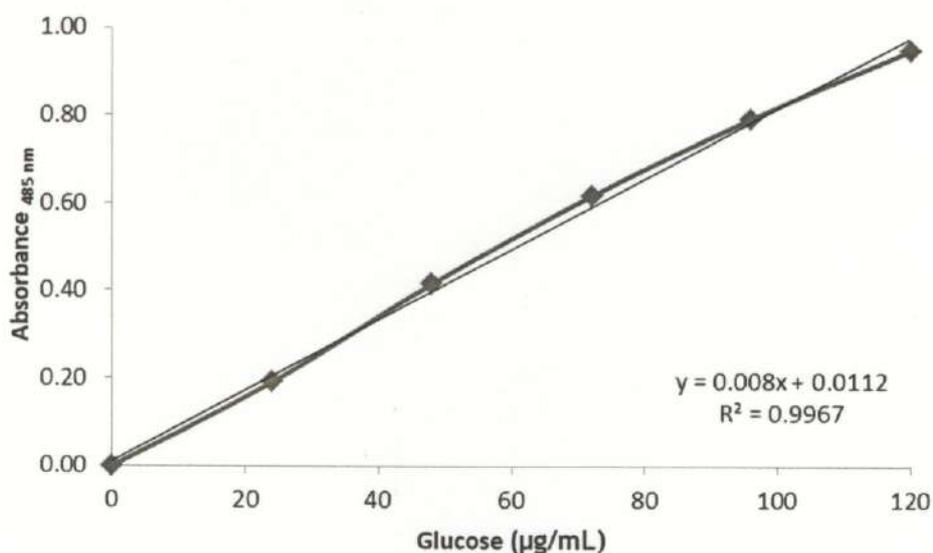
Una vez que se tienen las diferentes concentraciones se continúa la curva de calibración utilizando los reactivos que se describen a partir del inicio del apartado **Análisis de muestra**.

Los datos se grafican y se ajustan por mínimos cuadrados a una ecuación de segundo grado, obteniendo la r<sup>2</sup>, el valor de la pendiente (m), utilizando el intercepto (b) igual a cero. El valor de r deberá ser superior a 0.98, si se obtiene un valor inferior la curva se debe repetir.

#### Análisis de muestra

- a) Tomar 3 mL de muestra y centrifugar a 6000 rpm.

- b) Una vez terminada la centrifugación, decantar el líquido sobrenadante para solo utilizar la biomasa suspendida en el tubo de centrifuga.
- c) Agregar 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0 M (Whyte, 1987) y mantener a temperatura ambiente hasta que todos los tubos contengan el ácido.
- d) Agregar otros 4 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0 M (Total 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).
- e) Colocar los tubos tapados individualmente con papel aluminio en un termo baño a 100°C durante 1 h.
- f) Retirar los tubos del baño y dejar en reposo hasta que alcancen la temperatura ambiente.
- g) Centrifugar a 1,200 g por 15 min.
- h) Separar el extracto ácido con una pipeta Pasteur limpia, teniendo cuidado de no resuspender la pastilla celular adherida al fondo del tubo; medir el volumen total y pasarlo en un tubo limpio.
- i) Agregar 1 mL de fenol al 5% y mezclar.
- j) Dejar reposar por 40 min.
- k) Agregar lentamente 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado.
- l) Enfriar a temperatura ambiente.
- m) Leer a 485 nm, calibrando el espectrofotómetro calibrando el espectrofotómetro con un blanco que se prepara de la misma manera, sustituyendo el extracto ácido de la muestra con 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M.



**Gráfico 13.** Curva de calibración obtenida para análisis de carbohidratos.

## 7.7 ANÁLISIS DE LÍPIDOS

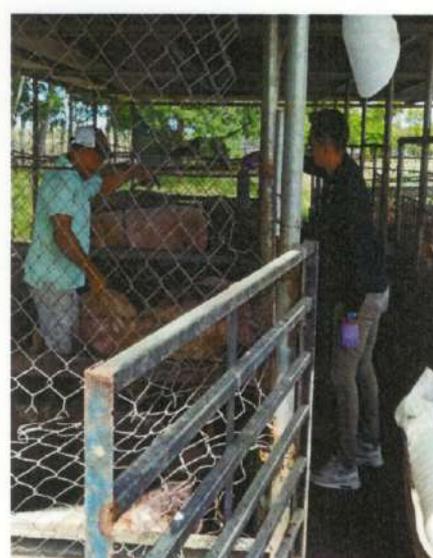
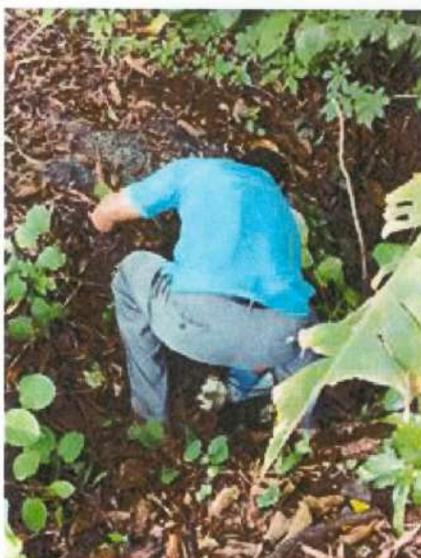
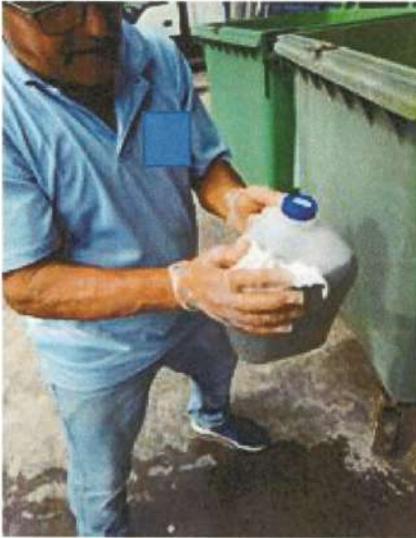
Nota: es importante mantener tubo con rosa a peso constante para el análisis de lípidos, esta condición es importante para el cálculo final.

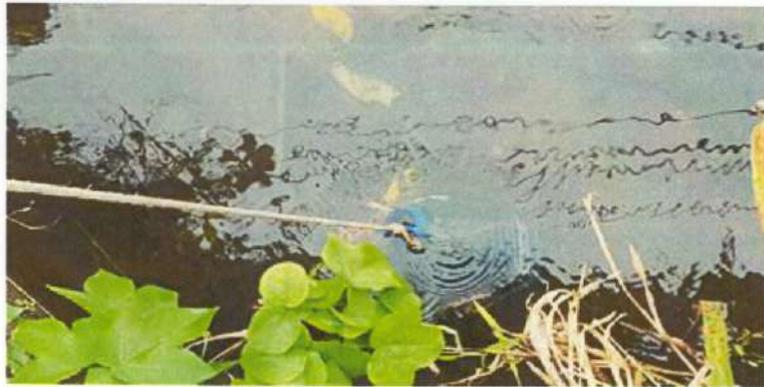
- a) Pesar entre 5 y 50 mg de microalgas liofilizada en un tubo de vidrio de 15 mL (tubo 1). Si es muestra fresca debe determinarse la proporción de humedad para referir los resultados a peso seco.
- b) Adicionar 3 mL de una mezcla de solventes cloroformo: metanol (1:2) sin agua, método de Bligh y Dyer, (1959) modificado para microalgas.
- c) Sonicar por 15 minutos (3 ciclos) en frío en un baño de agua con hielo.
- d) Incubar los tubos al menos 24 h a 4 °C y protegidos de la luz, de esa manera se favorece la extracción completa de los lípidos.
- e) Sonicar otros 15 minutos (3 ciclos) en frío antes de centrifugar
- f) Centrifugar a 5000 rpm por 20 min. a 5 °C. Recuperar el extracto con una pipeta Pasteur y pasarlo a un tubo de vidrio de 15 ml (tubo 2). Agregar 1.5 mL de CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH (1:2 V:V) a la biomasa residual y centrifugar nuevamente a 5000 rpm por 20 min a 5 °C, recuperando el extracto (tubo 2).
- g) Agregar 2 ml de agua destilada al tubo 2, que contiene el extracto y agitar con vortex. Eliminar el exceso de agua de la capa superior y centrifugar a 5000 rpm por 10 min a 5 °C y separar la fase inferior formada de cloroformo y lípidos.
- h) Agregar 1 ml de cloroformo y separar la fase inferior (CHCl<sub>3</sub>: lípido), introduciendo con cuidado una pipeta Pasteur y burbujeando aire hasta el fondo del tubo. Colocar la fase CHCl<sub>3</sub>: lípido en un tubo de 10 ml (tubo3, tubo a peso constante necesario para cálculo de peso final e inicial).
- i) Lavar la fase acuosa con 1 mL de CHCl<sub>3</sub>, mezclar con el vortex y centrifugar nuevamente a 5000 rpm durante 10 minutos, recuperar la fase inferior (CHCl<sub>3</sub>: lípido) y colocarlo en el tubo 3.
- j) En la campana de extracción, secar la fase CHCl<sub>3</sub>: lípido (tubo 3) con nitrógeno gaseoso.
- k) Proceder a la cuantificación de lípidos totales.

Cantidad de lípidos:  $\frac{(\text{peso final del tubo} - \text{peso inicial del tubo})}{\text{volumen de muestra utilizad}}$

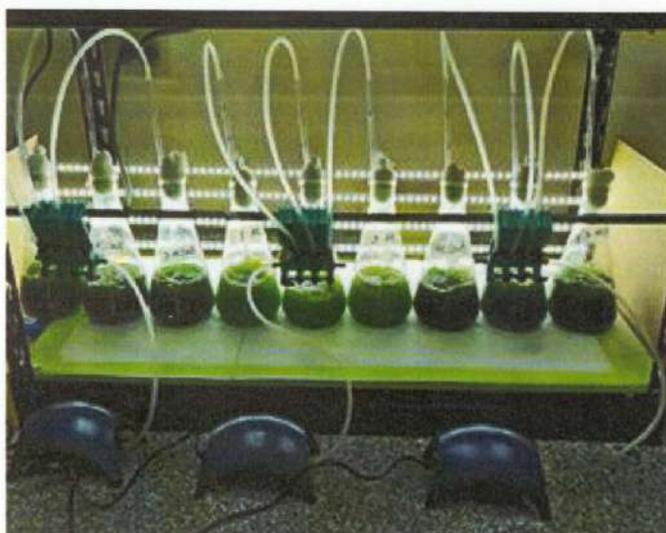
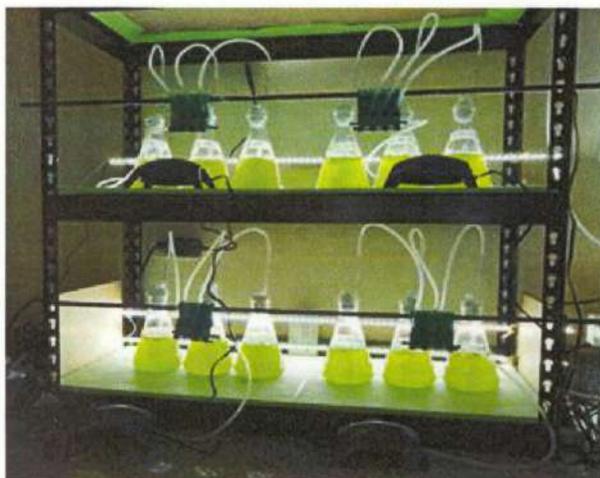
(Ec 5)

7.8 MUESTREO SIMPLE DEL AGUA RESIDUAL PARA LLEVAR A CABO LOS EXPERIMENTOS.

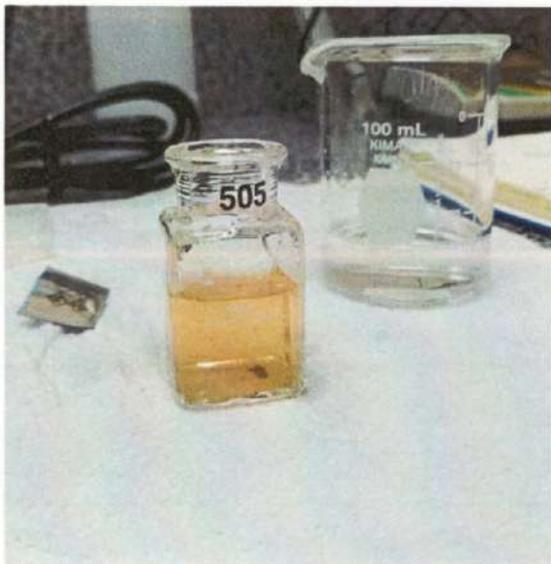




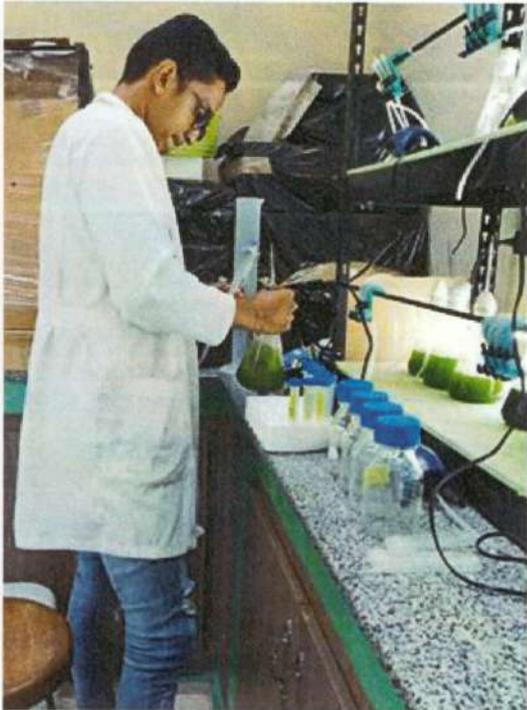
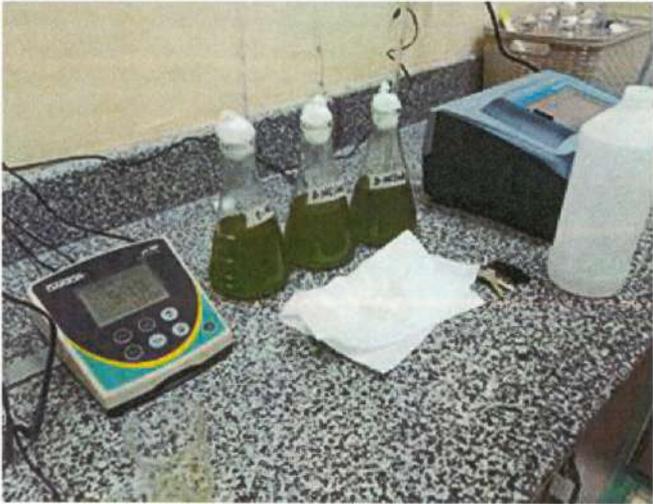
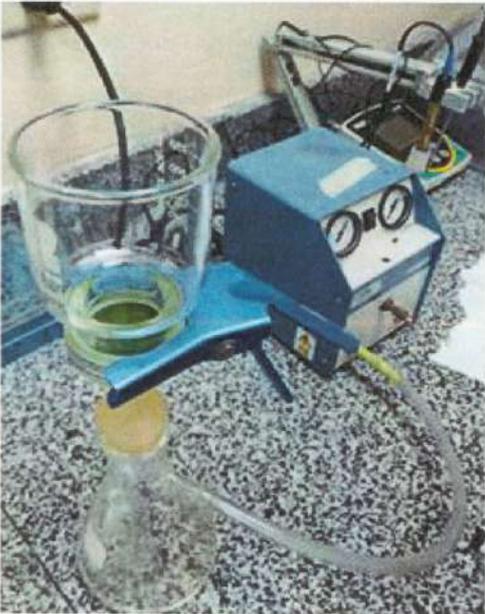
7.9 ESTABLECIMIENTO DE LOS EXPERIMENTOS Y CRECIMIENTO DE *Chlorella sorokiniana*, APLICANDO AGUA RESIDUAL Y UN MEDIO CONTROL (M8a).



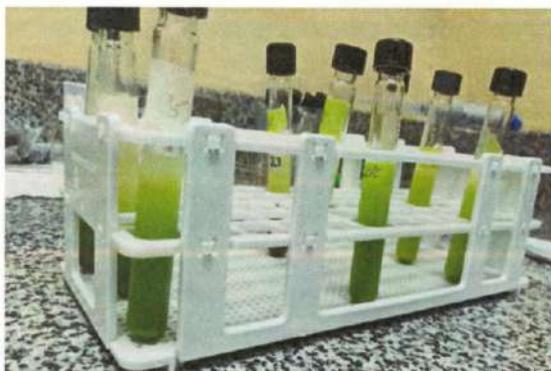
7.10 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRATOS Y FOSFATOS EN LOS CULTIVOS CON AGUA RESIDUAL, MÉTODO DE REDUCCIÓN POR CADMIO (IZQUIERDA) Y MÉTODO DE AZUL DE ÁCIDO ASCÓRBICO (DERECHA).



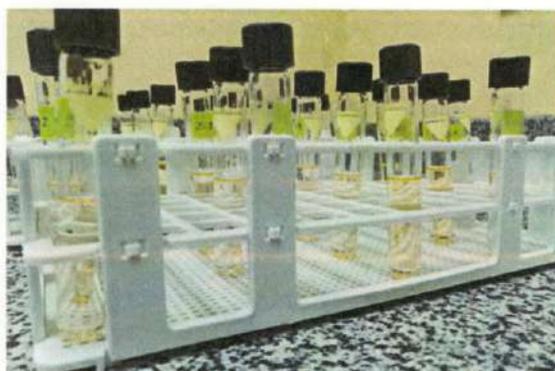
7.11 EVALUACIÓN DE CRECIMIENTO CELULAR, PRODUCTIVIDAD DE BIOMASA Y PH.



**7.12 DETERMINACIONES ANALÍTICAS A LA BIOMASA GENERADA: HUMEDAD, PROTEÍNAS TOTALES, LÍPIDOS TOTALES, CARBOHIDRATOS DISPONIBLES, PIGMENTOS.**



**Lípidos**



**Carbohidratos**



**Pigmentos**



**Proteínas**