

	GESTIÓN DE SERVICIOS ACADÉMICOS Y BIBLIOTECARIOS	CÓDIGO	FO-GS-15
	<b>ESQUEMA HOJA DE RESUMEN</b>	VERSIÓN	02
FECHA		03/04/2017	
PÁGINA		1 de 1	
<b>ELABORÓ</b>	<b>REVISÓ</b>	<b>APROBÓ</b>	
Jefe División de Biblioteca	Equipo Operativo de Calidad	Líder de Calidad	

## RESUMEN TRABAJO DE GRADO

### AUTORES:

**NOMBRES:** LEIDY PAOLA

**APELLIDOS:** SANCHEZ TOBOS

**NOMBRES:** NICOLAZ ALEJANDRO

**APELLIDOS:** CARVAJAL ALBARRACÍN

**FACULTAD:** DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

**PLAN DE ESTUDIOS:** INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

### DIRECTOR:

**NOMBRES:** JANET BIBIANA

**APELLIDOS:** GARCÍA MARTÍNEZ

**TÍTULO DEL TRABAJO:** EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA MICROALGAL UTILIZANDO EFLUENTES PISCÍCOLAS COMO MEDIO DE CULTIVO.

Esta investigación presenta la evaluación de dos fuentes de carbono inorgánicas (carbonato de sodio y bicarbonato de sodio) en diferentes concentraciones para la producción de biomasa usando efluentes piscícolas de la especie *Oreochromis sp* (tilapia roja) como medio de cultivo, así mismo, mediante un diseño de experimentos por STATISTICA 7.0 se evalúan las condiciones de N/P favorables para ajustar y enriquecer el medio con el fin de obtener valores máximos de producción.

**PALABRAS CLAVE:** Biomasa, carbono, cultivo, nutrientes, proteínas.

### CARACTERÍSTICAS:

**PÁGINAS:** 81

**PLANOS:** \_\_

**ILUSTRACIONES:** \_\_

**CD ROOM:** 1

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO PARA LA PRODUCCIÓN  
DE BIOMASA MICROALGAL UTILIZANDO EFLUENTES PISCÍCOLAS COMO MEDIO  
DE CULTIVO

LEIDY PAOLA SANCHEZ TOBOS

NICOLAZ ALEJANDRO CARVAJAL ALBARRACÍN

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA  
SAN JOSÉ CÚCUTA

2020

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO PARA LA PRODUCCIÓN  
DE BIOMASA MICROALGAL UTILIZANDO EFLUENTES PISCÍCOLAS COMO MEDIO  
DE CULTIVO

LEIDY PAOLA SANCHEZ TOBOS

NICOLAZ ALEJANDRO CARVAJAL ALBARRACÍN

Proyecto presentado como requisito para optar el título de Ingeniero Biotecnológico

Directora

*Ing. Química, MSc.* JANET BIBIANA GARCÍA MARTÍNEZ

Codirector

*Ph.D.* ANDRES FERNANDO BARAJAS SOLANO

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA  
SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2020

**ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO**

**FECHA:** 16 OCTUBRE DE 2020

**HORA:** 03:00 P.M.

**LUGAR:** CUCUTA, NORTE DE SANTANDER – EVALUACION VIRTUAL

**PLAN DE ESTUDIOS:** INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

**TITULO:** “EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA MICROALGAL UTILIZANDO EFLUENTES PISCÍCOLAS COMO MEDIO DE CULTIVO.”

**MODALIDAD:** INVESTIGACION

**JURADO:** GERMAN RICARDO GELVES ZAMBRANO  
HEBERTH MILTON MOJICA SANCHEZ  
ALINA KATIL SIGARROA RIECHE

**ENTIDAD:** UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER

**DIRECTOR:** Ing. Química, MSc. JANET BIBIANA GARCIA MARTINEZ  
**CODIRECTOR:** Ph.D. ANDRES FERNANDO BARAJAS SOLANO

NOMBRE DE LOS ESTUDIANTE	CODIGO	CALIFICACION
Leidy Paola Sanchez Tobos	1611203	4.8
Nicolaz Alejandro Carvajal Albarracin	1611066	4.8

**OBSERVACIONES:** MERITORIO.

**FIRMA DE LOS JURADOS**

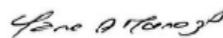


\_\_\_\_\_  
German Ricardo Gelves Zambrano

\_\_\_\_\_  
Heberth Milton Mojica Sanchez

\_\_\_\_\_  
Alina Katil Sigarroa Rieche

**Vo. Bo Coordinador Comité Curricular** \_\_\_\_\_





**CARTA DE AUTORIZACIÓN DE LOS AUTORES PARA  
LA CONSULTA, LA REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y LA PUBLICACIÓN  
ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO**

Cúcuta,

Señores  
BIBLIOTECA EDUARDO COTE LAMUS  
Ciudad

Cordial saludo:

Leidy Paola Sanchez Tobos y Nicolaz Alejandro Carvajal Albarracín, identificados con la C.C. N.º 1.094.351.575 y 1.090.504.254, autores de la tesis y/o trabajo de grado titulado EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA MICROALGAL UTILIZANDO EFLUENTES PISCÍCOLAS COMO MEDIO DE CULTIVO presentado y aprobado en el año 2020 como requisito para optar al título de Ingeniero Biotecnológico; autorizamos a la biblioteca de la Universidad Francisco de Paula Santander, Eduardo Cote Lamus, para que con fines académicos, muestre a la comunidad en general a la producción intelectual de esta institución educativa, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo de grado en la página web de la Biblioteca Eduardo Cote Lamus y en las redes de información del país y el exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad Francisco de Paula Santander.
- Permita la consulta, la reproducción, a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato CD-ROM o digital desde Internet, Intranet etc.; y en general para cualquier formato conocido o por conocer.

Lo anterior, de conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la ley 1982 y el artículo 11 de la decisión andina 351 de 1993, que establece que “**los derechos morales del trabajo son propiedad de los autores**”, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

Leidy Paola Sanchez Tobos  
C.C 1.094.351.575

Nicolaz Alejandro Carvajal Albarracín  
C.C 1.094.351.575

## Resumen

Las microalgas son organismos microscópicos fotosintéticos que pueden ser utilizadas en tratamiento de aguas residuales, con fines fundamentales como lo son la remoción de nutrientes y la producción de biomasa. Dentro de los factores de crecimiento más importantes se encuentran la fuente de carbono, la luz, el pH, la temperatura y el flujo de aireación. Esta investigación presenta la evaluación de dos fuentes de carbono inorgánicas (carbonato de sodio y bicarbonato de sodio) en diferentes concentraciones para la producción de biomasa usando efluentes piscícolas de la especie *Oreochromis* sp (tilapia roja) como medio de cultivo, así mismo, mediante un diseño de experimentos por STATISTICA 7.0 se evalúan las condiciones de N/P favorables para ajustar y enriquecer el medio con el fin de obtener valores máximos de producción. Seguidamente, se observó la influencia del ciclo Luz: oscuridad en medios con condiciones de fuente C/N/P, para lo cual, se suplementaron con 1.2 g/L de bicarbonato de sodio, 1.471 mM de Nitrato de sodio, 0.215 mM de fosfato dipotásico y 0.643 mM de fosfato monopotásico en fotoperiodos de 12:12, 16:8 y 24:0 realizando un cultivo comparable no suplementado. Se concluye que *Chlorella* sp presenta resultados viables como estrategia de tratamiento previo de este tipo de agua residual ajustando el cultivo con las condiciones adecuadas, logrando eficiencia en la producción de biomasa, eliminación de nutrientes y producción de proteínas, lo cual representa un adelanto para el desarrollo tecnológico de cultivos de microalgas en agua residual de piscicultura en Norte de Santander.

## Abstract

Microalgae are microscopic photosynthetic organisms that can be used in wastewater treatment, with fundamental purposes such as the removal of nutrients and the production of biomass. Among the most important growth factors are the carbon source, light, pH, temperature and aeration flow. This research presents the evaluation of two inorganic carbon sources (sodium carbonate and sodium bicarbonate) in different concentrations for biomass production using fish effluents of the species *Oreochromis* sp (red tilapia) as a culture medium, likewise, by means of a Design of experiments by STATISTICA 7.0, favorable N/P conditions are evaluated to adjust and enrich the medium in order to obtain maximum production values. Next, the influence of the Light: dark cycle was observed in media with source conditions C/N/P, for which, they were supplemented with 1.2 g/L of sodium bicarbonate, 1,471 mM of sodium nitrate, 0.215 mM of phosphate dipotassium and 0.643 mM monopotassium phosphate at 12:12, 16: 8 and 24: 0 photoperiods performing a comparable unsupplemented culture. It is concluded that *Chlorella* sp presents viable results as a pre-treatment strategy for this type of wastewater, adjusting the crop with the appropriate conditions, achieving efficiency in biomass production, nutrient elimination and protein production, which represents an advance for the technological development of microalgae cultures in fish farming wastewater in Norte de Santander.

## Dedicatoria

Principalmente a *Dios*, por guiarnos en este proceso de formación, por darnos la capacidad para discernir en cada obstáculo, por permitirnos lograr cada una de nuestras metas y conseguir cada uno de nuestros propósitos; Gracias a él, por darnos fortaleza, sabiduría y entendimiento a lo largo de nuestra vida y en especial durante este proceso de adquisición de conocimientos.

Con todo mi cariño a mi familia, en especial a mis padres, Alirio Sanchez y Luz Marina Tobos, a mi hermana Jennifer, a mis abuelas Evila y Bertha, a ellos por ser la luz de mi vida, la razón de mi felicidad, mi mayor motivación e inspiración. También a Sebastian, Sthefany y Andres por su apoyo incondicional, confianza en mí y a todos aquellos que me brindaron su cariño, apoyo, tiempo y conocimiento a lo largo de todo este tiempo.

*Leidy Sanchez*

Dedico este logro a mi madre Yajaira Albarracín y a mi padre Gregorio Carvajal por estar atentos y apoyarme incondicionalmente en todo mi proceso de formación, a mi nonita María Albarracín por ser ese pilar en mi vida, a mis tíos Paola Albarracín y Rafael Carvajal por su confianza y consejos. A todos ellos y a los demás les digo gracias porque me han ofrecido el amor y la calidez de la familia, los amo mucho.

*Nicolaz Carvajal*

## **Agradecimientos**

Agradecimiento especial a la Ing. Química, MSc. Janet Bibiana García y al Biólogo Ph.D. Andres Fernando Barajas, por darnos la oportunidad de realizar este proyecto bajo su orientación, por su tiempo, su disposición, y por enseñarnos a reconocer y solucionar, diferentes situaciones que se pueden presentar en nuestra vida profesional.

A nuestros compañeros, principalmente a Gabriela Leal y Michelle Galvis por ser parte de este gran equipo, por cada palabra de motivación y apoyo. De igual manera, a Jessica Hernández y Miguel Castellanos, quienes fueron parte fundamental en el desarrollo de este proyecto, gracias por compartir su conocimiento con nosotros, por su tiempo, paciencia y amistad.

A los docentes que nos acompañaron a lo largo de la carrera, que nos dejaron diferentes enseñanzas académicas y profesionales, a ellos, gracias por su paciencia y por ser parte de este proceso.

Todo esto ha sido posible gracias a ellos.

## Tabla de contenido

	<b>Pág.</b>
Introducción	16
1. Problema	18
1.1. Título	18
1.2. Planteamiento del problema	18
1.3. Formulación del problema	20
1.4. Justificación	20
1.5. Objetivos	22
1.5.1 Objetivo General	.22
1.5.2 Objetivos Específicos	22
1.6. Delimitación	23
1.6.1. Delimitación Espacial	.23
1.6.2. Delimitación Temporal	.23
2. Marco referencial	24
2.1. Antecedentes	24
2.2. Marco teórico	25
2.3. Marco legal	29
3. Metodología	31
3.1. Tipo de investigación	31
3.2. Población y muestra	31
3.3. Hipótesis	32
3.4. Variables	32

3.5. Fases de la investigación	32
3.5.1. Microorganismos	.33
3.5.2. Cultivo y mantenimiento	33
3.5.3. Recolección del agua residual de piscicultura	.33
3.5.4. Preparación de material	34
3.5.5. Análisis fisicoquímicos	.34
3.5.6. Objetivo 1: Determinar el efecto de la concentración de dos fuentes inorgánicas de carbono (carbonato y bicarbonato de sodio) en la producción de biomasa	35
3.5.6.1. <i>Preparación de inóculo para las pruebas de cultivo microalgal</i>	35
3.5.6.2. <i>Preparación de inóculo para las pruebas de cultivo para cianobacteria</i>	35
3.5.6.3. <i>Cuantificación de biomasa (Peso seco)</i>	36
3.5.6.4. <i>Cuantificación de proteínas</i>	36
3.5.6.4.1. <i>Preparación de la muestra</i>	37
3.5.6.4.2. <i>Ensayo de Lowry</i>	37
3.5.6.5. <i>Cuantificación de Nitratos (NO<sub>3</sub>)</i>	37
3.5.6.6. <i>Cuantificación de Fosfatos (PO<sub>4</sub>)</i>	38
3.5.6.7. <i>Análisis fisicoquímicos</i>	38
3.5.7. Objetivo 2: Evaluar las condiciones mínimas de la concentración de fuente de N y P para el aprovechamiento de las aguas residuales de piscicultura en la producción de biomasa	38
3.5.7.1. <i>Diseño de experimentos por STATISTICA 7.0</i>	38
3.5.7.2. <i>Evaluación de las condiciones mínimas de PO<sub>4</sub> y NO<sub>3</sub> para la                 producción de biomasa</i>	38

3.5.7.3. <i>Cuantificación de biomasa y Proteínas</i>	40
3.5.7.4. <i>Cuantificación de Nitratos y Cuantificación de Fosfatos</i>	40
3.5.8. Objetivo 3. Identificar la influencia del ciclo Luz: Oscuridad en el proceso de cultivo de los mejores resultados obtenidos de la evaluación de la fuente de C, N y P	40
3.5.8.1. <i>Ciclo Luz: Oscuridad</i>	40
3.5.8.2. <i>Cuantificación de biomasa</i>	40
4. Resultados y análisis	41
4.1 Caracterización microscópica	41
4.2 Determinación del efecto de la concentración de dos fuentes inorgánicas de carbono (carbonato y bicarbonato de sodio) en la producción de biomasa	42
4.2.1 Concentración de biomasa	.43
4.2.2 Producción de proteínas	.45
4.2.3 Cuantificación de NO <sub>3</sub> y PO <sub>4</sub>	47
4.3 Evaluación de condiciones mínimas de la concentración de fuente de N y P para el aprovechamiento de las aguas residuales de piscicultura en la producción de biomasa	52
4.3.1 <i>Chlorella</i> sp	.52
4.3.2 <i>Scenedesmus</i> sp	56
4.4 Influencia del ciclo Luz: Oscuridad en el proceso de cultivo de los mejores resultados obtenidos de la evaluación de la fuente de C, N y P	61
5. Conclusiones	66
6. Recomendaciones	68
Referencias Bibliográficas	69

## Lista de figuras

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Fotografía de las cepas (Microalgas y Cianobacterias), observadas microscópicamente. A. Chlorella sp. B. Scenedesmus sp. C Hapalosiphon sp. D. Ciano 13 sp	41
Figura 2. Fotografías: Reactores con bicarbonato de sodio A. Scenedesmus sp B. Chlorella sp	42
Figura 3. Fotografía de reactores con Scenedesmus sp y Chlorella sp con carbonato de sodio	42
Figura 4. Fotografía de reactores con Hapalosiphon sp y Ciano 13 sp con Bicarbonato de sodio	42
Figura 5. Fotografía de reactores con Hapalosiphon sp y Ciano 13 sp con Carbonato de sodio	42
Figura 6. Biomasa obtenida con dos fuentes de carbono: Bicarbonato de sodio y Carbonato de sodio. A. Chlorella sp. B. Scenedesmus sp. C Hapalosiphon sp. D. Ciano 13 sp	43
Figura 7. Fotografía de los tubos con concentración de proteínas	45
Figura 8. Concentración de proteínas obtenidas en % para las diferentes fuentes de carbono con Chlorella sp y Scenedesmus sp	46
Figura 9. Comportamiento de Chlorella sp, Scenedesmus sp, Hapalosiphon sp, Ciano 13 sp en la remoción de $\text{NO}_3$	47
Figura 10. Porcentaje de remoción de $\text{PO}_4$ para las diferentes fuentes de carbono	48
Figura 11. Fotografía de reactores del diseño de experimentos con Chlorella sp	52
Figura 12. Superficie de respuesta del modelo N/P para la producción de biomasa de Chlorella sp	52
Figura 13. Superficie de respuesta obtenida mediante el diseño de experimento con Chlorella sp. A. Modelo N/P para la remoción de $\text{NO}_3$ . B. Modelo N/P para la remoción de $\text{PO}_4$	54
Figura 14. Fotografía de reactores del diseño de experimentos con Scenedesmus sp	56

Figura 15. A. Análisis de Pareto para la producción de biomasa. B. Superficie de respuesta del modelo N/P para la producción de biomasa de <i>Scenedesmus</i> sp.	57
Figura 16. A. Análisis de Pareto para la producción de proteínas. B. Superficie de respuesta del modelo N/P para la producción de proteínas de <i>Scenedesmus</i> sp.	58
Figura 17. Superficie de respuesta obtenida mediante el diseño de experimento con <i>Scenedesmus</i> sp. A. Modelo N/P para la remoción de $\text{NO}_3$ . B. Modelo N/P para la remoción de $\text{PO}_4$	59
Figura 18. Fotografías: A. Preparación de reactores. B. Estabilización de pH e inoculación	61
Figura 19. Concentración de biomasa obtenida con <i>Chlorella</i> sp	63
Figura 20. Sistema para el tratamiento de agua residual de piscicultura	64

## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Fuentes de carbono para el cultivo de diferentes microalgas	26
Tabla 2. Agua residual para el cultivo de microalgas	28
Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos	34
Tabla 4. Concentración de las fuentes de carbono	36
Tabla 5. Diseño de experimentos	39
Tabla 6. Diseño de experimento dado por STATISTICA 7.0 para microalgas	39
Tabla 7. Condiciones de Luz: Oscuridad para la producción de biomasa	40
Tabla 8. Análisis fisicoquímicos iniciales del agua de piscicultura	49
Tabla 9. Análisis fisicoquímicos de agua post-cultivo	51

## Introducción

Las microalgas son organismos fotosintéticos unicelulares que utilizan la luz y dióxido de carbono como energía, con una producción de biomasa fotosintéticamente más eficiente que las plantas (Miao y Wu, 2006). Las microalgas son empleadas en la producción de alimentos y farmacéutica, además poseen gran potencial para la producción de biocombustibles renovables como biodiesel y biogás, ya que algunos de estos microorganismos pueden acumular 70% o más de su biomasa seca como hidrocarburos (Chisti, 2006).

Dentro de los factores de crecimiento de las microalgas, la fuente de carbono suele ser uno de los más críticos. Según Xu, Miao y Wu (2006), las microalgas pueden cultivarse en condiciones fotoautótrofas, heterótrofas y mixotróficas dependiendo de la fuente de carbono utilizada, tales como dióxido de carbono, acetato, glucosa u otros compuestos orgánicos.

Se ha demostrado que existe la posibilidad de cultivar las microalgas en aguas residuales (Li, et al., 2019) siendo eficientes en la remoción de nutrientes; lo que requiere una elección específica de la especie de microalga y de las condiciones de crecimiento (Rizwan, Mujtaba, Ahmed, Lee y Rashid, 2018). Con esto se ha logrado aumentar el rendimiento de biomasa y el beneficio del valor agregado (Lowrey, Armenta y Brooks, 2016). A nivel de laboratorio existe una amplia gama de medios de cultivos diseñados específicamente para cada cepa en particular, así como diferentes métodos desde cultivos abiertos hasta sistemas de cultivos cerrados (Sabri, Sultan y Al-Dahhan, 2018).

Estos microorganismos se encuentran en varios ambientes debido a que tienen la capacidad para crecer en aguas dulces, aguas residuales y aguas marinas. Los sistemas acuáticos funcionan gracias al papel fundamental que cumplen las microalgas, razón por la cual han sido incorporadas

a distintos procesos industriales, manteniendo así los principios básicos del equilibrio poblacional y a su vez evaluando su comportamiento con el fin de aprovechar su máximo potencial.

Las microalgas posibilitan la obtención de biomoléculas como lípidos, proteínas e hidratos de carbono, así mismo, son productoras de carotenoides (astaxantinas,  $\beta$ -carotenos y xantofilas), omega 3 y polisacáridos, de los cuales se puede obtener productos de interés aplicados a distintos sectores como aditivos alimentarios, colorantes, productos farmacéuticos y bioplásticos (Moreno-García, Adjallé, Barnabé, y Raghavan, 2017).

Se conocen diversos estudios donde son utilizadas para el tratamiento de aguas residuales de acuicultura, estas aguas son apropiadas para sustituir el agua dulce en cultivos de microalgas, según (Kuo, et al., 2016) la biomasa generada por las microalgas cultivadas en aguas residuales de acuicultura puede ser usada para producir alimento para animales sin significar ningún riesgo.

En relación con el costo de producción de las microalgas se deben tener en cuenta aspectos como los balances de masa, energía y los equipos que se utilizarán en el proceso para que en cierto modo el costo no se eleve en gran medida y que su producción sea rentable (Pandey, Lee, Chang, Chisti y Soccol, 2018).

El presente estudio se basa en la utilización de agua residual proveniente de la piscícola El Manantial en el municipio del Zulia (Norte de Santander), un estanque donde se realizan cultivos de *Oreochromis* sp (Tilapia roja) con un tiempo de sistema productivo de 6 meses, en densidades mayores de 12 tilapias por m<sup>3</sup> es necesario contar con sistemas de aireación o con alto porcentaje de recambio de agua (40-50%). Con esto, se busca determinar la fuente carbono apropiada para suplementar un medio de cultivo a partir de agua residual de piscicultura, para así lograr un alto rendimiento de la biomasa, la reducción de elementos del medio y la posible cuantificación de proteínas utilizando microalgas y cianobacterias.

## **1. Problema**

### **1.1. Título**

Evaluación del efecto de la fuente de carbono para la producción de biomasa microalgal utilizando efluentes piscícolas como medio de cultivo.

### **1.2. Planteamiento del problema**

Las fuentes hídricas están siendo afectadas por la contaminación causada por la escorrentía de las aguas residuales de piscicultura, causando uno de los principales problemas ambientales como lo es la eutrofización, ocasionada por la contaminación por nutrientes como N/P que degradan la calidad del agua y amenazan los sistemas acuáticos. Como medida de mitigación es importante realizar la remoción de nutrientes presentes en este tipo de agua residual previamente a la descarga en los medios acuáticos, la cual puede ser realizada incorporando organismos que aprovechen estos nutrientes para su crecimiento como las microalgas. Para que esto sea posible, se requiere cumplir con condiciones como: sistemas y estrategias de cultivo viables donde se aproveche al máximo el efluente, métodos de separación de biomasa a bajo costo y control de factores como luz y temperatura, concentración inicial de inoculo y contaminación por otros microorganismos, además de regular el pH, la concentración de fuente de carbono y otros nutrientes (Beltrán-Rocha, Guajardo-Barbosa, Barceló-Quintal & López-Chuken, 2017).

El crecimiento de cultivo en condiciones fotoautótrofas de las microalgas implica el uso de carbono inorgánico ya sea en forma de CO<sub>2</sub> u otras fuentes de carbono para producir energía a través de la fotosíntesis (Ren et al., 2010). Por otro lado, el carbono orgánico puede ser utilizado por algunas especies de microalgas directamente en presencia o ausencia de un suministro de luz,

esto se conoce como cultivo heterotrófico (Chojnacka y Noworyta, 2004). Los efluentes son producidos por diferentes industrias, como pueden ser, las plantas de celulosa, lácteos, alimentos y bebidas, así como también de tipo municipal, ganadero, agrícola y minero entre otras actividades. Las aguas residuales son ricas en carbono orgánico, nitrógeno (N), fósforo (P), vitaminas y metales traza, que proporciona un excelente sustrato para el crecimiento de microalgas heterotróficas / mixotróficas (Pires, Alvim-Ferraz, Martins y Simões, 2013). Dentro de las principales desventajas del cultivo heterotrófico de microalgas se pueden identificar: los costos, la producción de dióxido de carbono, la mayor posibilidad de contaminación y menor pigmentación. Sin embargo, estos factores pueden no significar desventaja al utilizar aguas residuales como sustrato para el cultivo heterotrófico, se ha identificado que el tratamiento de aguas residuales con microalgas consume N y P, por lo tanto, al descargar aguas residuales tratadas con microalgas en los ríos, arroyos y lagos locales, las posibilidades de eutrofización disminuyen (Shandilya y Pattarkine, 2019), el desarrollo varía extraordinariamente según la literatura, eventualmente debe ser por los diferentes efluentes, condiciones de cultivo y cepa seleccionada (Carvalho, Bittencourt, Ferrari, & Soccol, 2019). En general, el uso de aguas residuales para la producción de microalgas conlleva una doble ventaja, por un lado, proporciona materia prima rentable para el cultivo de microalgas y al mismo tiempo se tratan este tipo de efluentes, contribuyendo así, al medio ambiente (Wang, Fu y Pei, 2012).

Uno de los factores más importantes para lograr una producción de microalgas a escala comercial es que sea económica y ambientalmente factible, es decir, con el desarrollo de sistemas de cultivos sostenibles y rentables. La industria biotecnológica enfocada en la producción de microalgas requiere gran inversión económica en la adquisición de nutrientes especiales para el cultivo de las mismas. Una gran parte del costo se debe al consumo de carbono orgánico durante

el cultivo de microalgas, que puede compensarse si las aguas residuales se utilizan para el cultivo (Stillwell y Webber, 2014).

Los estudios deben encaminarse a sistemas integrados donde se haga utilización de gases de combustión como el CO<sub>2</sub>, Nitrógeno y fósforo presente, donde se trataría uno de los principales problemas que ha causado impacto ambiental y costos elevados en la producción microalgal (Chen, Ho, Ren, Chang y Nagarajan, 2018).

### **1.3. Formulación del problema**

¿Es posible evaluar el efecto de la fuente de carbono para la producción de biomasa microalgal aprovechando efluentes piscícolas como medio de cultivo y determinar su capacidad de biorremediar el agua post-cultivo?

### **1.4. Justificación**

El cultivo de microalgas se ha destacado en el tratamiento de diferentes tipos de efluentes, siendo ecológicamente más seguro y con menor costo. Incorporar las aguas residuales de piscicultura como medio de cultivo representa tres ventajas fundamentales como lo son: 1) La utilización del agua residual disminuye la cantidad de nutrientes que requiere un cultivo haciéndolo viable económica y ambientalmente. 2) Se da un proceso de tratamiento al agua residual para que disminuya la carga contaminante antes de regresar a las fuentes hídricas, con beneficios de recuperación y reciclaje de recursos. 3) Se evalúan las condiciones para mejorar la producción microalgal.

Las microalgas se han estudiado en los últimos años siendo una gran fuente de metabolitos con valor agregado, brindando aplicaciones para la salud humana y de animales. Además, se

conocen aplicaciones en alimentos funcionales, cosméticos de uso terapéutico, biocombustibles, entre otros. Estos organismos no compiten por el uso de tierras agrícolas, tienen la facilidad de desarrollarse en diferentes tipos de agua, a su vez captan los niveles de CO<sub>2</sub> que se presentan por las acciones del hombre dado a su organismo autotrófico (Ibañez, 2017). Dentro de las fuentes de carbono estudiadas para el crecimiento de microalgas se encuentra el bicarbonato de sodio, evidenciando aumento en el crecimiento, mejora en la división celular y en los procesos metabólicos de las microalgas (Pancha et al., 2015); además, al ser suministrado es utilizado por estos microorganismos fotosintéticos como fuente de carbono inorgánico derivando así dióxido de carbono. Se ha confirmado que el suministro de fuentes de carbono inorgánicas tiene una gran influencia en la acumulación de lípidos en microalgas marinas y de agua dulce.

Según Silva, Gris, Sforza, La Rocca y Bertucco, (2016) mediante la utilización del CO<sub>2</sub> que se encuentra en el aire se puede mitigar el impacto ambiental, pero a su vez requiere alternativas viables debido a que se utiliza un gas de combustión por lo que es necesario un diseño donde se logre el máximo aprovechamiento en todo el proceso sin que se pierda el CO<sub>2</sub>, lo que genera altos costos para la producción de microalgas. Por esta razón estos autores utilizaron bicarbonato de sodio para su posible aplicación en el cultivo de cianobacterias como fuente de carbono evaluando a *Synechococcus* PCC 7002 para la producción de carbohidratos.

Por otra parte, Mokashi, Shetty, George y Sibi, (2016) en su estudio con *Chlorella vulgaris*, emplearon medio que contenía bicarbonato de sodio como fuente de carbono inorgánico, comprobando que al añadir esta fuente de carbono se incrementa significativamente la cantidad de biomasa, lípidos y pigmentos. Por lo tanto, se requiere evaluar el cultivo de microalgas heterotróficas y mixotróficas en medios de aguas residuales, así como el efecto de la fuente de carbono, ya que puede ofrecer una mejora con respecto a los costos de producción y la obtención

de bioproductos en concentraciones más altas. Estas vías metabólicas deben explorarse utilizando especies de microalgas autóctonas que se desempeñan bien en corrientes de aguas residuales o en sistemas de cultivo de múltiples etapas para garantizar la viabilidad financiera y la sostenibilidad general (Shandilya y Pattarkine, 2019).

La adición de una fuente de carbono en medios elaborados a partir de agua de explotación piscícola, en este caso, bicarbonato de sodio y carbonato de sodio favorece la producción de biomasa de microalgas. Estas son seleccionadas porque representan menor costo de adquisición y por las ventajas que brinda en cuanto a la facilidad de manejo, transporte y presentan facilidad de disolución en el medio para que las microalgas asimilen el carbono orgánico en la forma de  $\text{CO}_2$  en el proceso fotosintético (Wang et al. 2008).

## 1.5. Objetivos

Para el desarrollo de este proyecto se plantearon los siguientes objetivos:

**1.5.1 Objetivo General.** Evaluar el efecto de la fuente de carbono para la producción de biomasa microalgal utilizando efluentes piscícolas como medio de cultivo.

**1.5.2 Objetivos Específicos.** Determinar el efecto de la concentración de dos fuentes inorgánicas de carbono (carbonato y bicarbonato de sodio) en la producción de biomasa.

Evaluar las condiciones mínimas de la concentración de fuente de N y P para el aprovechamiento de las aguas residuales de piscicultura en la producción de biomasa.

Identificar la influencia del ciclo Luz: Oscuridad en el proceso de cultivo de los mejores resultados obtenidos de la evaluación de la fuente de C, N y P.

## **1.6. Delimitación**

**1.6.1. Delimitación Espacial.** Este proyecto se llevó a cabo en los laboratorios de calidad ambiental del Complejo Experimental Campos Elíseos de la Universidad Francisco De Paula Santander, Km 1 Vía Los Patios.

**1.6.2. Delimitación Temporal.** El presente trabajo de investigación tuvo una duración aproximada de 12 meses a partir de su aprobación por parte del comité curricular.

## 2. Marco referencial

### 2.1. Antecedentes

Pancha et al., (2015) en su estudio “Bicarbonate supplementation enhanced biofuel production potential as well as nutritional stress mitigation in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077”, determinaron la concentración óptima de bicarbonato de sodio para obtener una cantidad mayor de biomasa, contenido de lípidos y carbohidratos en microalgas, también evaluaron el papel de la suplementación con bicarbonato en diferentes condiciones. Los resultados que se obtuvieron reflejaron que la concentración óptima es 0.6 g/L de bicarbonato de sodio, con esto se logró aumentar la producción en comparación con las condiciones de crecimiento normales. La adición de éste al medio permite que aumente la actividad de las enzimas.

Del mismo modo, Mokashi et al., (2016) en el estudio “Sodium Bicarbonate as Inorganic Carbon Source for Higher Biomass and Lipid Production Integrated Carbon Capture in *Chlorella vulgaris*” utilizaron bicarbonato de sodio como fuente de carbono para suplementar agua residual como medio de cultivo microalgal. Se aumentó el contenido total de clorofila y la productividad de biomasa de las microalgas de manera dependiente de la dosis con la adición de bicarbonato. Los resultados mostraron que a 1 g/L de concentración de bicarbonato de sodio, se encontró una fijación máxima de CO<sub>2</sub>. Con este estudio se determinó que la adición de bicarbonato de sodio aumenta la abundancia celular, el contenido de clorofila y, en cierta medida, el contenido de lípidos.

Años después Srinivasan et., al (2018), realizaron un trabajo de investigación denominado “Bicarbonate supplementation enhances growth and biochemical composition of *Dunaliella salina* V-101 by reducing oxidative stress induced during macronutrient deficit conditions” para

evaluar el efecto de diferentes cantidades de bicarbonato para la producción de biomasa, actividad fotosintética, constituyentes bioquímicos, la absorción de nutrientes y la respuesta antioxidante de una microalga variando las condiciones de déficit de macronutrientes. Con esto, lograron aumentar significativamente la biomasa, los carotenoides, incluidos el  $\beta$ -caroteno y la luteína, los lípidos y el contenido de ácidos grasos, incrementando la actividad de las enzimas asimilatorias y anhidrasa carbónica mediante la adición de bicarbonato de sodio. Por último, se logró reducir el estrés oxidativo, lo cual disminuye el daño de la peroxidación lipídica y mejoró las actividades de las enzimas antioxidantes en cultivos bajo estrés nutricional, mediante la adición de esta fuente de carbono.

## 2.2. Marco teórico

Las microalgas son cultivadas con diversas fuentes de nutrientes indispensables para su crecimiento. La fuente de carbono influye significativamente en el medio de cultivo, por esto se han hecho investigaciones variando su concentración con el fin de obtener resultados más eficientes. Gracias a la posibilidad que ofrecen las microalgas como productoras valiosas, en la Tabla 1 se recopila información a partir de estudios basados en la utilización de diferentes fuentes de carbono para suplementar el medio de cultivo indicando los resultados obtenidos. En la biomasa microalgal se encuentra principalmente la celulosa en la pared celular y el almidón en los plástidos los cuales se pueden utilizar para la obtención de etanol mediante un proceso de fermentación de azúcares (Chen et al., 2013).

Según Becker, (2007) a partir de especies como *Arthrospira maxima*, *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* es posible obtener hasta el 70% de contenido de proteína en sus células, entre sus aplicaciones se encuentran las proteínas antibacterianas y quelantes,

antioxidantes, anticuerpos, hormonas, enlaces minerales y alimentos para animales. La transformación de biomasa por procesos termoquímicos es realizada con el fin de aprovechar la energía presente en las células de estos microorganismos convirtiendo así, los lípidos obtenidos en biodiesel, biocombustible y combustible sintético (biocrude), este último es muy estudiado por su capacidad para sustituir el petróleo. Se han reportado resultados con una producción de lípidos favorable entre el 45% y el 64% del peso seco en especies como *Botryococcus braunii*, *Desmodesmus*, *sp.*, *Nannochloropsis sp.*, *Scenedesmus* SDEC-8, *Nannochloropsis sp.* y *Sorokiniana* FCG IITG (Cheng et al., 2013; Ho, Chang, Lai y Chen, 2014a; Ho et al., 2014b; Kumar, Muthuraj, Palabhanvi, Ghoshal, y Das, 2014; Ma, Wang, Yu, Yin y Zhou, 2014; Moreno-García et al., 2017; Nobre et al., 2013; Song et al., 2014; Talukdar, Kalita y Goswami, 2013).

Tabla 1. Fuentes de carbono para el cultivo de diferentes microalgas.

Autor	Alga /Uso	Fuente de carbono	Resultado
(Barajas-Solano, Guzmán-Monsalve y Kafarov, 2016).	<i>Botryococcus braunii</i> / Producción HC	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Producción de biomasa de 1 a 2 g/L Producción de lípidos baja
(Bhattacharya, Soundarya y Mishra, 2016)	<i>Chlorella variabilis</i> / Producción biodiesel	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	Productividad de 296.33 mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> Lípidos: 28.27%
(Chandra, et al., 2016)	<i>Scenedesmus obtusus</i> / Producción Biodiesel	CO <sub>2</sub>	Biomasa: 0.05 g L <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> Lípidos :15 mg L <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> Proteínas: 34.83% Carbohidratos: 20.09% p/p Carotenoide: 7.36 µg mL <sup>-1</sup> Clorofila: 30.56 µg mL <sup>-1</sup>
(Mokashi et al., 2016)	<i>Chlorella vulgaris</i> Producción de biocombustibles	NaHCO <sub>3</sub>	Productividad de biomasa: 0.996 g d <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> Concentración de lípidos celulares: 16 mg mL <sup>-1</sup> Clorofila: 0.769 g L <sup>-1</sup>
(Silva et al., 2016)	<i>Synechococcus</i> PCC 7002	NaHCO <sub>3</sub>	Productividad de biomasa: 1.12 g L <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> Producción de biomasa: 6 g L <sup>-1</sup> de peso celular seco

			Carbohidratos: 25%
(González-Delgado, Barajas-Solano, y Ardila-Álvarez, 2017).	<i>Chlorella vulgaris</i>	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub>	Producción de biomasa: 3.72 g/L Producción de proteínas: 60%
(Kim, Heo, Kim y Han, 2017)	<i>Dunaliella salina</i>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Producción de biomasa: 2.17 g/L Producción de proteínas: 34%
Cardias, de Morais y Costa (2018).	<i>Spirulina</i> sp	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Tasa de crecimiento específica SGR 1.05 día <sup>-1</sup> Carotenoides 20.43 μg mL <sup>-1</sup> Productividad máxima 174.2 mg L <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> Proteínas 58.8 % ww <sup>-1</sup> Carbohidratos 23.7% ww <sup>-1</sup> Contenido total de lípidos: 53.9 %
(Srinivasan et al., 2018)	<i>Dunaliella salina</i>	NaHCO <sub>3</sub>	Carbohidratos: 27.1% B-caroteno: 192.8 μg/100 mg Luteína: 26.1 g /100 mg Proteínas: 56.21% ww <sup>-1</sup> Carbohidratos: 25.09% ww <sup>-1</sup> Lípidos: 16% ww <sup>-1</sup>
Deamici, Santos, y Costa, 2019).	<i>Chlorella fusca</i>	CO <sub>2</sub>	Producción de biomasa: 0.116 g DW L <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup>
(Elankovan y Premalatha, 2019).	<i>Coelastrella</i> sp	CO <sub>2</sub>	

Los sistemas de cultivos son diseñados con respecto a las condiciones que requiere el tipo de especie para su crecimiento. También requieren de condiciones lumínicas, nutricionales y resistencia al estrés, teniendo en cuenta que un sistema abierto como las aguas residuales debe ser de bajo costo de construcción y de operación para soluciones comerciales. Otro factor para tener en cuenta en la elección del medio del cultivo es la disponibilidad de recursos hídricos y de suelo (Hernández y Labbe, 2014). Recientemente ha crecido el uso de las aguas residuales como medio de cultivo de microalgas, buscando reducir los costos e integrando sistemas como, por ejemplo, la fase acuosa de algas derivadas de aguas residuales, la cual, tiene un potencial como suplemento para la producción de poli-3-hidroxibutirato (PHB), un poliéster con propiedades termoplásticas a

través del crecimiento de *Escherichia coli* recombinante (Sathish, Glaittli, Sims y Miller, 2014) y así diversas aplicaciones más.

En la Tabla 2 se muestran algunas especies de microalgas cultivadas en medios a base de diferentes tipos de agua residual. La productividad de la biomasa y el gran contenido de lípidos de diferentes microalgas se han reflejado en un valor elevado de efectividad en el proceso, trabajando con las aguas como medio reciclable, de un modo sencillo y económico, además, estos organismos, tienden a desarrollarse en aguas residuales bastante concentradas.

Las condiciones ambientales para las diferentes microalgas que se deben tener en cuenta para que la biomasa microalgal recolectada sea usada como materia prima en la elaboración de productos que sean de origen biológico, debe ser coordinada con una buena elección del medio de cultivo ya sea natural como lagunas, estanques, aguas residuales, artificiales y entre otros. (Cheng et al., 2019).

Tabla 2. Agua residual para el cultivo de microalgas.

<b>Autor</b>	<b>Alga</b>	<b>Agua residual</b>	<b>Resultado</b>
(Kothari, Prasad, Kumar y Singh, 2013)	<i>Chlamydomonas polypyrenoideum</i>	Industria láctea	Rendimiento de biomasa: 7.7 g /L Reducción de N 90% y de P 96% Nitrato: 90% Nitrito: 74%
(Wang, Yu, Lv, y Yang, 2013)	<i>Chlorella</i> sp.	Municipales	Eficiencia de remoción TN total 58.85% y TP 97.08% NH <sub>4</sub> -N: 83% PO <sub>4</sub> -P: 90%
(Ebrahimian, Kariminia y Vosoughi, 2014)	<i>Chlorella vulgaris</i>	Municipales primarias y secundarias	Biomasa: 138.76 mg/L/d Lípidos: 45.49 mg/L/d Eliminación de: 100% de amonio 82% de nitrato
(Li, Tsai, Hsu, Xie, & Chen, 2014)	<i>Chodatella</i> sp	Porcinas	Biomasa: 115 mg/L. d Lípidos: 51.4 mg/L. d (41.2%) Eficiencias de eliminación:

			TKN: 48.6% NH <sub>3</sub> -N: 99.7% TP: 75.9% Tasa de crecimiento específica: 0.17 d <sup>-1</sup>
(Gao, et al., 2016)	<i>Chlorella vulgaris</i>	Acuicultura	Biomasa: 42.6 mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> Reducción de nutrientes: TN: 86.1% TP: 82.7%
(Luo et al., 2016)	<i>Coelastrella</i> sp.	Porcinas	Biomasa: 57.46 mg L <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> Lípidos: 13.42 mg L <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> Eliminación de NH <sub>3</sub> -N (100%), TP (100%).
(Gao et al., 2018)	<i>Chlorella</i> sp.	Procesamiento de mariscos (SPW)	Biomasa: 77.7 mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> Lípidos: 20.4 mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> Tasas de eliminación de nutrientes N: 4.98 mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> P: 1.91 mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>
(Kumar et al., 2018)	<i>Chlorella vulgaris</i>	Alcantarillado	Modo continuo Biomasa: 1 g / L Eficiencia de eliminación: Nitratos (N) 91% Fosfatos (P) 55%
(Huo et al., 2019)	<i>Tribonema</i> sp.	Petroquímicas	Biomasa: 4.4 g / L Carbohidratos: 55.4% Lípidos: 36.1%
(Tripathi, Gupta y Thakur, 2019)	<i>Scenedesmus</i> sp.	Municipales	Tasas de remoción TN 96.8% y TP casi el 100% Biomasa: 1.81 g / L Reducción de TDS: 64.58% Rendimiento de lípidos (% en peso del peso seco total): 452 mg /L

### 2.3. Marco legal

De acuerdo con el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB), acordado en Río de Janeiro el 5 de julio de 1992, reafirma la soberanía de los Estados sobre sus recursos biológicos y genéticos. Al mismo tiempo, el CDB estableció el compromiso de facilitar regímenes de acceso

bajo términos mutuamente acordados. Los Estados son también los responsables de la conservación de la diversidad biológica y de su utilización sostenible. Posteriormente, en el año 2000 en Colombia se expidió el Decreto 309 sobre investigación en recursos biológicos, el cual reglamenta los permisos de estudio con fines de investigación científica sobre diversidad biológica (PEFIC). Esta norma se apoya en el principio constitucional que garantiza y promueve la libertad de enseñanza, aprendizaje e investigación, así como en el deber del Estado de proteger la diversidad e integridad del ambiente. De acuerdo con la Ley 99 de 1993 corresponde al Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial (MAVDT) coordinar y promover la investigación sobre el medio ambiente y los recursos naturales, establecer el Sistema Nacional de Información Ambiental, organizar el inventario de biodiversidad y de los recursos genéticos nacionales, así como de regular la importación y exportación de especies de flora y fauna silvestres. Se definieron estas normas porque el proyecto consistió en una formación científica- sostenible la cual incluye uno de los recursos más importantes para la vida y conservación de los ecosistemas; el agua, buscando alternativas que permitan disminuir los elementos que representan mayor impacto e incorporar nuevamente para su máximo aprovechamiento, logrando a su vez, mantener el equilibrio y producir biomasa microalgal que represente valor agregado.

### 3. Metodología

#### 3.1. Tipo de investigación

El trabajo será en modalidad de investigación de tipo experimental y explicativo. El autor Arias (2012) menciona que con la investigación explicativa se logra describir el porqué de los acontecimientos; evaluando así, la relación entre la causa y el efecto. Cada estudio que se desarrolla en el área explicativa posee la determinación de la causa; es decir, del porque se elabora este proyecto y los efectos de la investigación experimental, en esta se somete un objeto de estudio a ciertas condiciones experimentales u operaciones con el fin de conocer los cambios que se producen en el mismo. El proyecto se basa en estos dos tipos de investigación, ya que se espera determinar y describir experimentalmente las condiciones necesarias para el mejoramiento de cultivo de microalgas, a partir de la evaluación de la fuente de carbono, en aguas residuales piscícolas para la obtención de productos con valor agregado.

#### 3.2. Población y muestra

Las microalgas y cianobacterias que se emplearon durante la investigación fueron aislados de una fuente termal en San José de Cúcuta, Colombia, y almacenado en la colección de cepas de la Universidad Francisco de Paula Santander (UFPS). Las muestras recolectadas fueron cepas de *Chlorella* sp, *Scenedesmus* sp, *Ciano 13* sp y *Hapalosiphon* sp.

El agua de piscicultura será tomada de la piscícola El Manantial en el municipio del Zulia (Norte de Santander), de cultivos de *Oreochromis* sp (Tilapia).

### **3.3. Hipótesis**

Las fuentes de carbono adicionadas en las aguas residuales piscícolas afectan la productividad de biomasa microalgal y de los metabolitos de interés; por lo tanto, a partir del estudio de los parámetros fisicoquímicos del agua post-cultivo es posible su evaluación.

### **3.4. Variables**

Concentración de fuente de carbono (g/L)

Concentración de biomasa (g/L)

Concentración de Proteínas (%)

Concentración de fuente de nitrógeno (mL/L o mg/L)

Concentración de fuente de Fosfato (mL/L o mg/L)

Consumo de fuente de nitrógeno (%)

Consumo de fuente de Fosfato (%)

### **3.5. Fases de la investigación**

De acuerdo con Kin-Chung, Chi-Chung, On-Kit y Ho-Man, (2013) la producción de biomasa empleando CO<sub>2</sub> como fuente de carbono posee costos técnicos que puede en algunos casos hacer poco rentable la biomasa algal. Con la intención de determinar si es posible reemplazar el CO<sub>2</sub> por una fuente de menor costo e impacto técnico se evaluará la capacidad de las cepas para crecer en medios enriquecidos con carbonato de sodio y bicarbonato de sodio. Evaluando así, las condiciones de Nitratos y fosfatos ideales para lograr un máximo aprovechamiento del agua residual como medio de cultivo. Las concentraciones de fuente de C, N y P se seleccionaron teniendo en cuenta el medio de cultivo tradicional para estos microorganismos.

**3.5.1. Microorganismos.** *Chlorella* sp, *Scenedesmus* sp, *Ciano 13* sp y *Hapalosiphon* sp, fueron aisladas de una fuente termal en San José de Cúcuta, Colombia, y almacenadas en la colección de cepas de la Universidad Francisco de Paula Santander (UFPS). *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp se mantuvieron en medio Bold basal modificado (BBM), por otra parte, *Ciano 13* sp y *Hapalosiphon* sp en medio BG-11 (Andersen, 2005). Luego se realizó la caracterización microscópica en el laboratorio de INNOValgae para poder observar sus estructuras en el microscopio.

**3.5.2. Cultivo y mantenimiento.** Una vez adquirida la caja Petri con la cepa y las condiciones establecidas, se tomó una porción de inóculo mediante un asa microbiológica y se llevó por separado a tubos de 15 mL que contenían 10 mL de medio BBM y BG-11. Los tubos fueron colocados en un Agitador rotativo diseñado para tubos falcon de 15 mL. Luego se mantuvieron de forma axénica (mono algal) en reactores de vidrio de 500 mL con un volumen de cultivo de 250 mL y acoplado a un sistema de aireación filtrado a un flujo de 0.6 vvm. Para mantener las algas y las cianobacterias en fase exponencial, una vez cada 15 días, se re- inoculó 25 mL (10% v/v) de microalga y cianobacteria en 225 mL de medio de cultivo fresco. Con el fin de lograr una mayor concentración de las microalgas se llevaron a reactores de vidrio con un volumen de cultivo de 2.2 L de los cuales 200 mL corresponden al inóculo y 2 L a medio BBM y BG-11 respectivamente. En cada uno de los pasos programados se revisó la presencia de contaminantes en el cultivo.

**3.5.3. Recolección del agua residual de piscicultura.** La muestra de agua de piscicultura fue recolectada en recipientes plásticos estériles con capacidad de 20 L en la piscícola El Manantial, ubicada en el municipio del Zulia (Norte de Santander), estanque donde se realizan cultivos de *Oreochromis* sp (Tilapia roja).

Una vez recolectada la muestra se tomó la temperatura in situ reportando 27°C y se transportó en cavas con una temperatura controlada de 20 °C. Al llegar al laboratorio INNOValgae se registró nuevamente la temperatura reportando un valor de 20.2 °C, teniendo en cuenta la importancia de mantener las concentraciones de nitrógeno (N) y Fósforo (P) esenciales para el crecimiento microalgal se esterilizó en autoclave la muestra con el fin de remover bacterias y/o otros microorganismos que pudieran consumir N y P.

**3.5.4. Preparación de material.** Todo el material por utilizar fue previamente lavado con solución de hipoclorito de sodio durante 20 minutos, luego se realizó limpieza y desinfección utilizando ultrasonido instrumental, por último, se colocaron en solución de Extran® MA 02 y se retiró con agua destilada. El agua residual de piscicultura se esterilizó en frascos de vidrio en autoclave. Para realizar los respectivos montajes los frascos de vidrio con desprendimiento fueron colocados en luz ultravioleta (UV) en la cabina de flujo laminar Airstream de la marca ESCO durante 1 hora, por otro lado, los frascos sin desprendimiento se esterilizaron en autoclave.

**3.5.5. Análisis fisicoquímicos.** Después de que la muestra de agua de piscicultura fue recolectada, se evaluó inicialmente la calidad del agua a partir de los parámetros fisicoquímicos presentes en la Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos.

Parámetros	Unidades	Fuente
pH	Unidades de pH	Standard Methods 4500B
Turbidez	FAU	Standard Methods 2130B
Temperatura	°C	Standard Methods 2550
Demanda bioquímica de oxígeno (DBO <sub>5</sub> )	mg/L	Standard Methods 5210B
Demanda química de oxígeno (DQO)	mg/L	Standard Methods 5220B
Alcalinidad Total	mg/L CaCO <sub>3</sub>	Standard Methods 2320B
Acidez	mg/L CaCO <sub>3</sub>	Standard Methods 2310B
Dureza Total	mg/L CaCO <sub>3</sub>	Standard Methods 2340B

Dureza Cálctica	mg/L CaCO <sub>3</sub>	Standard Methods 2340C
Nitratos	mg/L NO <sub>3</sub>	Standard Methods 4500C
Fosfatos	mg/L PO <sub>4</sub>	Standard Methods 4500 P

**3.5.6. Objetivo 1: Determinar el efecto de la concentración de dos fuentes inorgánicas de carbono (carbonato y bicarbonato de sodio) en la producción de biomasa.**

**3.5.6.1. Preparación de inóculo para las pruebas de cultivo microalgal.** Se emplearon las cepas *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp evaluando su capacidad para crecer en medios diseñados con agua residual de piscicultura, enriquecidos con carbonato y bicarbonato de sodio como fuente de carbono. Se diseñaron los montajes variando la concentración de la fuente de carbono como se describe en la Tabla 4, para lo cual, se emplearon frascos de vidrio previamente esterilizados inoculando al 10% cada microalga. Todos fueron acoplados a un sistema de aireación filtrado con flujo constante y luz: oscuridad 12:12. Terminado el montaje se iniciaron los análisis cada 10 días durante un periodo de 30 días evaluando la producción de biomasa, proteínas y el consumo de N/P.

**3.5.6.2. Preparación de inóculo para las pruebas de cultivo para cianobacterias.** Se emplearon las cepas *Ciano 13* sp y *Hapalosiphon* sp evaluando la capacidad de las dos cianobacterias para crecer en medios diseñados con agua residual de piscicultura y enriquecidos con carbonato y bicarbonato de sodio como fuente de carbono. Se diseñó el montaje variando las concentraciones descritas en la Tabla 4 para las dos cepas, empleando frascos de borosilicato con tapa GL-45 previamente esterilizados, los cuales fueron inoculados al 10% con *Ciano 13* sp y *Hapalosiphon* sp adicionando como medio agua piscícola.

Los reactores se acoplaron a un sistema de aireación filtrado a un flujo constante y un ciclo de luz oscuridad 12:12. Terminado el montaje se realizaron los análisis mencionados anteriormente.

Tabla 4. Concentración de las fuentes de carbono.

<b>Microorganismo</b>	<b>Fuente De Carbono</b>	<b>Concentración(g/L)</b>			
<i>Chlorella</i> sp	Carbonato de Sodio Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .	0	0.8	1.2	1.6
<i>Scenedesmus</i> sp					
<i>Ciano 13</i> sp	Bicarbonato de Sodio Na <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub> .	0	0.8	1.2	1.6
<i>Hapalosiphon</i> sp					

Como controles se evaluaron cultivos sin carbono extra (solo aire comprimido) tanto para estudios con microalgas como con cianobacterias, los cuales corresponden a 0 g/L de Carbonato y Bicarbonato de sodio.

**3.5.6.3. Cuantificación de biomasa (Peso seco).** Para determinar la concentración de biomasa una vez cada 10 días fueron pre-combustionados durante 24 horas a 60°C filtros de microfibras de vidrio Whatman GF/C, se mantuvieron en el desecador por 1 hora y se procedió a pesar en una Balanza analítica Radwag AS 220.X2 cada uno. Se tomaron 20 mL de medio de cultivo de cada uno de los reactores para llevar a cabo la filtración por membrana. Una vez terminado el proceso, los filtros se depositaron de forma individual en cajas de Petri con silica gel y aluminio, para ser llevados al horno durante 24 horas a 60°C (Borowitzka y Moheimani, 2013). Transcurrido este tiempo se tomó el peso del filtro con biomasa para luego determinar su concentración con la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de biomasa } \left(\frac{g}{L}\right) = \frac{\text{peso del filtro con biomasa (g)} - \text{peso del filtro (g)}}{\text{Volumen filtrado (L)}}$$

**3.5.6.4. Cuantificación de proteínas.** La determinación de proteínas se realizó con base en el método Modificado de Lowry, Rosebrough, Farr y Randall, (1951) y adaptado por Slocombe, Ross, Thomas, McNeill y Stanley, (2013).

*3.5.6.4.1. Preparación de la muestra.* En este paso se realizó la extracción de proteínas de los filtros con biomasa seca, realizando una destrucción mecánica en tubos cónicos para centrifuga Falcon de 15 mL, donde, se adicionó 3 mL de Ácido tricloroacético (TCA) al 24% homogeneizando en Vortex durante 5 minutos. Las muestras fueron calentadas en baño maría con una temperatura de 95°C durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se adiciono a cada tubo 9 mL de agua ultra pura y se llevó a centrifuga a 4°C con 3500 rpm por 20 minutos. El sobrenadante se descartó y se resuspendió el pellet en 0.5 mL de reactivo de Lowry D logrando homogeneizar en Vortex durante 5 minutos. Cada uno de los tubos se colocaron en baño maría a 55°C por 1 hora, se llevó a centrifuga nuevamente a las mismas condiciones y se guardó el sobrenadante para su posterior análisis de cuantificación de proteínas.

*3.5.6.4.2. Ensayo de Lowry.* Se colocó 175 µL de sobrenadante y se añadió 3.325 mL de reactivo de Lowry D realizando inmediatamente inversión 3 veces. Se incubaron las muestras durante 10 minutos a temperatura ambiente y se adiciono 350 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu (FCR). Cada una de las muestras se llevaron a Vortex durante 5 minutos y se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente para luego leer la ABS a 600 nm y conocer la concentración presente de proteínas para cada experimento. Para determinar la concentración de Nitratos y Fosfatos en el periodo de evaluación en cada uno de los reactores se aplicó la metodología descrita en el protocolo de microalgas del laboratorio de INNOValgae.

*3.5.6.5. Cuantificación de Nitratos (NO<sub>3</sub>).* Se determinó la concentración de NO<sub>3</sub> presente en los cultivos de cada biorreactor, para esto se utilizaron tubos tapa rosca de vidrio con capacidad de 20 mL, el protocolo indica que para el análisis se requiere tomar 5 mL de cada muestra filtrada y 100 µL de HCl agitando vigorosamente.

Luego, cada tubo se dejó en reposo durante 15 minutos para leer la ABS a una longitud de onda de 220 y 275 nm. En muestras con concentraciones altas en nitratos se debía realizar la dilución antes de añadir el reactivo con el fin de lograr obtener resultados dentro del rango de la curva.

**3.5.6.6. Cuantificación de Fosfatos ( $PO_4$ ).** Para este análisis se emplearon tubos cónicos para centrífuga Falcon™ de 15 mL, en cada uno se agregó 3 mL de la muestra filtrada, 1 mL de la solución de Molibdato-Metavalanato y por último 1 mL de agua destilada. Se dejó en reposo durante 15 minutos y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 470 nm en el espectrofotómetro.

**3.5.6.7. Análisis físicoquímicos.** Para determinar las condiciones finales en el agua post-cultivo se realizan los análisis de la Tabla 3 mencionados anteriormente.

**3.5.7. Objetivo 2: Evaluar las condiciones mínimas de la concentración de fuente de N y P para el aprovechamiento de las aguas residuales de piscicultura en la producción de biomasa.**

**3.5.7.1. Diseño de experimentos por STATISTICA 7.0.** Para lograr lo anterior se empleó un sistema no factorial con superficie de respuesta bajo un diseño de experimentos  $3^2$  (3 niveles, 2 factores) donde, los niveles corresponden a las diferentes concentraciones dadas al software STATISTICA 7.0 y los factores aplicados son la fuente de  $NO_3$  y  $PO_4$  (Statsoft, 2004). La metodología anterior permitirá conocer estadísticamente cuál de las dos variables ejerce una influencia positiva (o negativa) en la producción de biomasa, proteínas y en su capacidad de biorremediar el agua post-cultivo.

**3.5.7.2. Evaluación de las condiciones mínimas de  $PO_4$  y  $NO_3$  para la producción de biomasa.** Las condiciones iniciales se presentan en la Tabla 5, cada uno de los experimentos se desarrolló en frascos de vidrio con un volumen de trabajo de 1 L.

Tabla 5. Diseño de experimentos.

Variable	Nivel		
	-1	0	1
NaNO <sub>3</sub> (mM)	1.471	2.059	2.647
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (mM)	0.215	0.301	0.387
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (mM)	0.643	0.900	1.157

Tabla 6. Diseño de experimento dado por STATISTICA 7.0 para microalgas.

Experimento	Componente		
	NaNO <sub>3</sub> (mM)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (mM)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (mM)
<b>1</b>	1.471	0.387	1.157
<b>2</b>	2.647	0.215	0.643
<b>3</b>	2.059	0.423	1.264
<b>4</b>	1.227	0.301	0.900
<b>5</b>	2.059	0.180	0.536
<b>6</b>	2.891	0.301	0.900
<b>7</b>	1.471	0.215	0.643
<b>8</b>	2.647	0.387	1.157
<b>9</b>	2.059	0.301	0.900

A cada reactor se agregó 900 mL de agua residual de actividad piscícola estéril, seguidamente se modificó las concentraciones de fuente N y P, tomando como base el medio Bold Basal modificado (BBM), con el fin de identificar las mejores concentraciones que maximizan la productividad de biomasa. Para esto, se añadió cada uno de los componentes Nitrato de sodio (NaNO<sub>3</sub>), Fosfato dipotásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) y Fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) en diferentes concentraciones como se ilustra en la Tabla 6. Finalmente, se inoculo al 10% con *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp, todos los reactores se acoplaron a un sistema de aireación filtrado a un flujo de 0.6 vvm controlado por electroválvula y ciclos de luz: oscuridad 12:12 con una duración de cultivo de 30 días.

**3.5.7.3. Cuantificación de biomasa y Proteínas.** Se realizó la cuantificación de biomasa y proteínas teniendo en cuenta los métodos mencionados anteriormente.

**3.5.7.4. Cuantificación de Nitratos y Cuantificación de Fosfatos.** La cuantificación de  $\text{NO}_3$  y  $\text{PO}_4$  se desarrolló con base en los métodos mencionados anteriormente con el fin de conocer el porcentaje de remoción transcurridos los 30 días de cultivo.

**3.5.8. Objetivo 3. Identificar la influencia del ciclo Luz: Oscuridad en el proceso de cultivo de los mejores resultados obtenidos de la evaluación de la fuente de C, N y P.**

**3.5.8.1. Ciclo Luz: Oscuridad.** El efecto del tiempo de exposición a la luz se determinó de acuerdo con los experimentos propuestos en la Tabla 7, incluyendo, además, un cultivo comparable sin adición de nutrientes con fotoperiodo 12:12. Todos los experimentos se realizaron por duplicado empleando frascos de vidrio con capacidad de 3.5 L, con un volumen de cultivo de 1.8 L, para lo cual se adicionó 1.620 L de agua residual de piscicultura estéril y suplementando el medio con la fuente de C/N/P seleccionadas con base en los ensayos anteriores. Seguidamente, se estabilizó el pH en 7 para cada biorreactor, para así, adicionar un 10% de inóculo y, por último, acoplarlos a un flujo de aire estéril 0.6 vvm durante un periodo de 30 días.

Tabla 7. Condiciones de Luz: Oscuridad para la producción de biomasa.

<b>Experimentos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Luz (Horas)</b>	12	16	24
<b>Oscuridad (Horas)</b>	12	8	0

**3.5.8.2. Cuantificación de biomasa.** Se realizó la cuantificación de biomasa teniendo en cuenta el método mencionado anteriormente.

## 4. Resultados y análisis

### 4.1 Caracterización microscópica

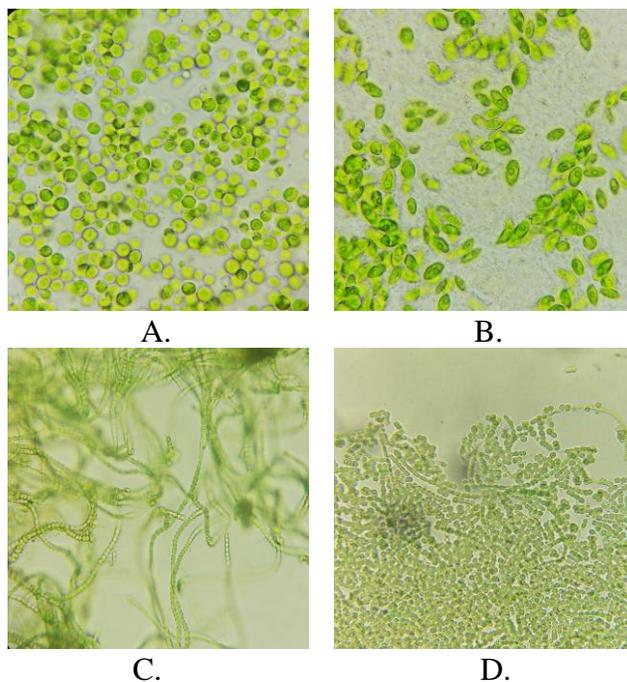


Figura 1. Fotografía de las cepas (Microalgas y Cianobacterias), observadas microscópicamente. A.

*Chlorella* sp. B. *Scenedesmus* sp. C *Hapalosiphon* sp. D. *Ciano 13* sp.

Se realizó la caracterización microscópica preliminarmente de *Chlorella* sp, *Scenedesmus* sp, *Hapalosiphon* sp, *Ciano 13* sp observándose en los objetivos 100X y 40X. En la figura 1A se observa *Chlorella* sp de forma esférica, agrupadas en colonias o de manera individual, como lo mencionan Barboríková et al., (2019) en su estudio. Por el contrario, *Scenedesmus* sp tiene estructuras alargadas de forma oblongas u ovadas tal como lo indican Song et al., (2014) lo cual se observa en la Figura 1B. Por otra parte, las cianobacterias *Hapalosiphon* sp, *Ciano 13* que se muestran en la Figura 1C-D poseen ramificaciones verdaderas (análogas al orden Stigonematales), éstas son filamentosas y capaces de dividirse en diferentes planos según como lo expresan Tan et al., (2016).

## 4.2 Determinación del efecto de la concentración de dos fuentes inorgánicas de carbono (carbonato y bicarbonato de sodio) en la producción de biomasa

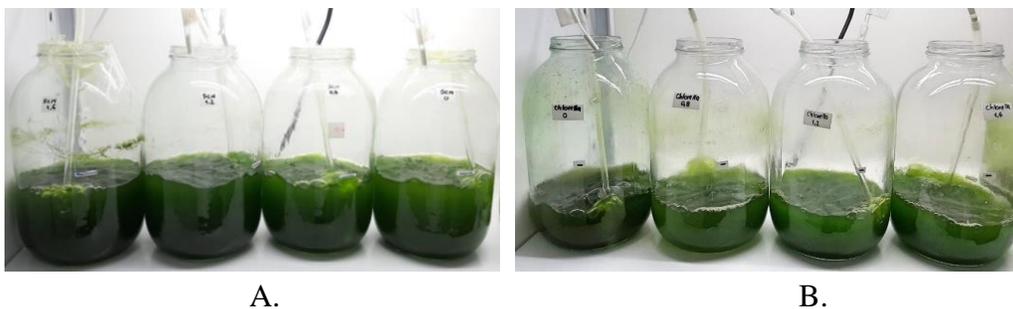


Figura 2. Fotografías: Reactores con bicarbonato de sodio A. *Scenedesmus* sp B. *Chlorella* sp.



Figura 3. Fotografía de reactores con *Scenedesmus* sp y *Chlorella* sp con carbonato de sodio.



Figura 4. Fotografía de reactores con *Hapalosiphon* sp y *Ciano 13* sp con Bicarbonato de sodio.



Figura 5. Fotografía de reactores con *Hapalosiphon* sp y *Ciano 13* sp con Carbonato de sodio.

Con el fin de evaluar el efecto de la fuente de carbono para cuatro microorganismos, se cultivaron durante un periodo de 30 días como se ilustra en las anteriores figuras. Estos se enriquecieron con diferentes concentraciones de bicarbonato y carbonato de sodio en un ciclo de luz: oscuridad de 12:12 acoplados a un sistema de aireación de 0.6 vvm.

#### 4.2.1 Concentración de biomasa.

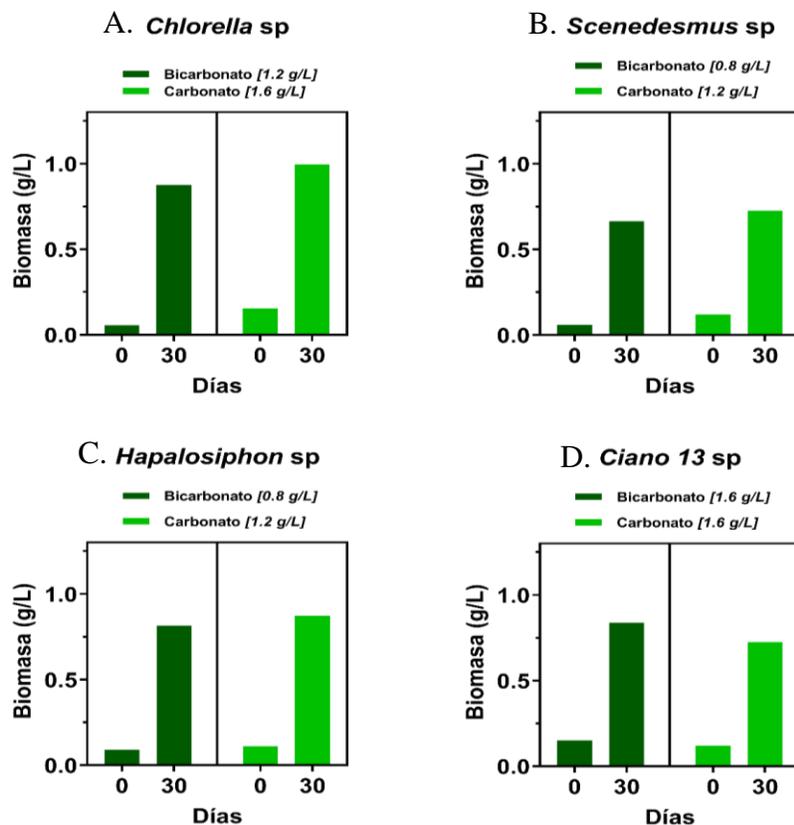


Figura 6. Biomasa obtenida con dos fuentes de carbono: Bicarbonato de sodio y Carbonato de sodio. A. *Chlorella* sp. B. *Scenedesmus* sp. C *Hapalosiphon* sp. D. *Ciano 13* sp.

Liang, Sarkany y Cui (2009) afirman que para el crecimiento quimiorgánico-heterótrofico de las microalgas, éstas son alimentadas con una fuente externa de carbono orgánico, como glucosa, acetato y glicerol, dando por resultado mayor producción de biomasa. A fin de evaluar otras fuentes que actúen como fuente de energía primaria para su metabolismo se emplearon en este estudio carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) y bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ).

Los resultados presentados en la Figura 6, muestran el crecimiento de las diferentes cepas de microalgas y cianobacterias. En el primer caso, con *Chlorella* sp Figura 6A se emplearon concentraciones iniciales de biomasa desde 0.05 hasta 0.19 g/L; al utilizar  $\text{NaHCO}_3$  como fuente de carbono en concentración de 1.2 g/L, se obtuvo una producción de biomasa de 0.88 g/L, siendo esta la mayor producción con respecto a las diferentes concentraciones de  $\text{NaHCO}_3$ . De forma similar, al emplear 1.6 g/L de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  se obtuvo una producción de biomasa de 1 g/L. Sin embargo, al comparar el aumento en el crecimiento de *Chlorella* sp desde su concentración inicial se encontró diferencias insignificantes, ambas de 0.8 g/L de biomasa.

Lo anterior, da la posibilidad de elegir  $\text{NaHCO}_3$  como fuente de carbono para este tipo de medio de cultivo con *Chlorella* sp, ya que se obtuvo el mismo crecimiento de biomasa favoreciendo así, la reducción de sustrato, además puede representar reducción de costos porque comercialmente es más económico el  $\text{NaHCO}_3$ .

Mokashi et al., (2016) mencionan que la adición de  $\text{NaHCO}_3$  presentó efectos significativos en la producción de biomasa de *Chlorella vulgaris* en un rango de 0.237 a 0.996 g/L, también resaltan que se redujo la producción de biomasa para concentraciones bajas de bicarbonato.

De acuerdo con los resultados reportados por Geider y La Roche (2002), la solubilidad de los minerales, así como la distribución de las formas inorgánicas de carbono como lo son:  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y ácido carbónico influye directa e indirectamente en el metabolismo de las microalgas. En relación con los estudios anteriores, se evidenció que *Chlorella* sp presentó una reacción directa considerando que, a mayor concentración de fuente de carbono, mayor producción de biomasa.

Seguidamente, en la Figura 6B se evaluó el crecimiento microalgal de *Scenedesmus* sp para lo cual se emplearon concentraciones iniciales de biomasa desde 0.06 hasta 0.19 g/L; al utilizar

0.8 g/L de  $\text{NaHCO}_3$  como fuente de carbono se produjo 0.66 g/L de biomasa. De igual manera, en el medio con 1.2 g/L de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  se obtuvo una producción de 0.73 g/L.

En el estudio realizado con *Hapalosiphon* sp en ambas fuentes de carbono se utilizaron concentraciones iniciales entre 0.09 a 0.11 g/L de biomasa, para una producción máxima de 0.81 g/L en cantidad de 0.8 g/L de  $\text{NaHCO}_3$  como se ilustra en la Figura 6C, obteniendo así, un crecimiento de 0.72 g/L desde el valor inicial; de modo similar, en 1.2 g/L de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  se obtuvo una producción final de 0.87 g/L, lo cual significa que aumento 0.76g/L desde su valor inicial. Se observó que en concentración de 1.6 g/L de ambas fuentes de carbono no es viable el cultivo, los valores de biomasa obtenidos empleando esta concentración fueron inferiores en comparación a los demás.

En la Figura 6D se observa que, para los cultivos con *Ciano 13* sp suplementados con bicarbonato y carbonato de sodio, la mayor producción de biomasa se encuentra en cantidades de 1.6 g/L, con valores iniciales de biomasa de 0.15 y 0.12 g/L presentando un aumento en la concentración de biomasa de 0.69 y 0.6 g/L produciendo así, una concentración final de biomasa de 0.84 y 0.72 g/L respectivamente. El crecimiento de esta cianobacteria es más eficiente en medios de cultivo enriquecidos con  $\text{NaHCO}_3$ , puesto que, la producción en las diferentes concentraciones es mayor en comparación a los experimentos realizados con carbonato.

#### 4.2.2 Producción de proteínas.



Figura 7. Fotografía de los tubos con concentración de proteínas.

A partir de la biomasa que se obtiene de los cultivos con microalgas se realizó la extracción de proteínas por el método de Lowry y son visualizadas de color azul como se ilustra en la Figura 7.

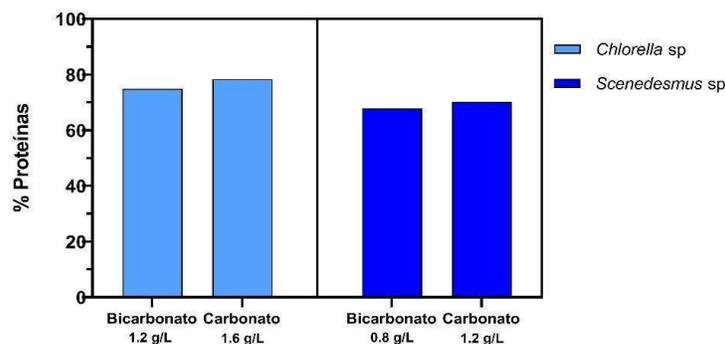


Figura 8. Concentración de proteínas obtenidas en % para las diferentes fuentes de carbono con *Chlorella sp* y *Scenedesmus sp*.

La figura 8 representa los valores más significativos de la evaluación de bicarbonato y carbonato de sodio para la producción de proteínas. *Chlorella sp*, presentó resultados altos principalmente en concentraciones altas de  $\text{NaHCO}_3$  con 1.2 g/L se reportó 75% de proteínas correspondiente a 0.88 g/L de biomasa. Al mismo tiempo, en medio con 1.6 g/L de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  se obtuvo 78.4% de proteínas a partir de 1 g/L de biomasa de *Chlorella sp*.

Del mismo modo, *Scenedesmus sp* bajo concentraciones de 0.8 g/L de  $\text{NaHCO}_3$  mostró una producción de proteínas de 67.9%, por otro lado, se obtuvo hasta un 70.3% de proteínas en medios con 1.2 g/L de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Se encontró que en medios sin fuente de carbono la producción de proteínas es menor del 50%.

Soto, Stoykova, y Nikolov (2018) demostraron que en un cultivo con *Chlorella vulgaris* se logró un equilibrio entre el contenido de proteínas y la densidad de biomasa, utilizaron como fuente de carbono el  $\text{NaHCO}_3$ , obtuvieron un porcentaje de proteínas del 87.5% y una producción de biomasa de hasta el 4.5 g/L.

**4.2.3 Cuantificación de NO<sub>3</sub> y PO<sub>4</sub>.** El análisis de NO<sub>3</sub> se realizó por espectrofotometría, para así poder observar el comportamiento de las cepas y su capacidad para remover la carga contaminante presente.

En general, la remoción de NO<sub>3</sub> en cada uno de los casos estudiados con bicarbonato y carbonato de sodio estuvo por encima del 90%.

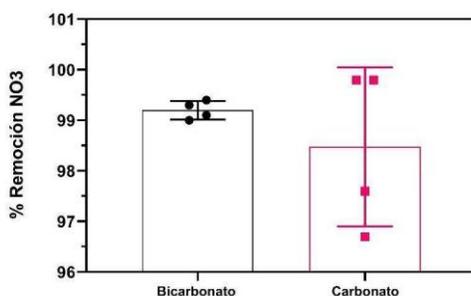


Figura 9. Comportamiento de *Chlorella* sp, *Scenedesmus* sp, *Hapalosiphon* sp, *Ciano 13* sp en la remoción de NO<sub>3</sub>.

Se encontró que *Scenedesmus* sp y *Hapalosiphon* sp en concentración de 0.8 g/L de NaHCO<sub>3</sub> lograron un porcentaje de remoción de NO<sub>3</sub> del 99.1 y 99.4%, *Chlorella* sp en medio con 1.2 g/L de NaHCO<sub>3</sub> removió el 99.3% de NO<sub>3</sub> y *Ciano 13* sp alcanzó un porcentaje de eliminación de NO<sub>3</sub> del 99% en medio con 1.6 g/L de NaHCO<sub>3</sub> como se ilustra en la Figura 9. De manera similar, en medios con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp mostraron porcentajes de remoción de NO<sub>3</sub> del 96.7 y 97.6% en concentraciones de 1.6 y 1.2 g/L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Así mismo, ambas cianobacterias removieron hasta el 99.8% de NO<sub>3</sub> en medios con 1.2 y 1.6 g/L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Cabe resaltar que los resultados mencionados representan los máximos de cada experimento.

Otros estudios con *Chlorella* sp, reportan una eficiencia de remoción de N y P muy buena, con una viabilidad de remoción de nutrientes del 80 al 100% de N y del 83.2 al 92% de P (Kumar et al., 2019; Núñez, Aymerich, Sancho y Refardt, 2020). Resultados similares a los alcanzados por este estudio.

La cuantificación de fosfatos se realizó durante los días de cultivo obteniéndose un valor promedio de absorbancia a una longitud de onda de 470 nm.

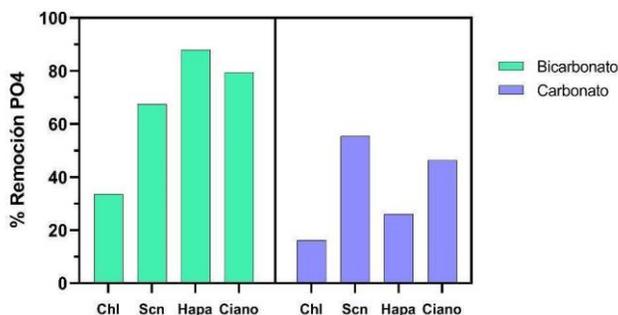


Figura 10. Porcentaje de remoción de PO<sub>4</sub> para las diferentes fuentes de carbono.

En la Figura 10, se puede observar que la concentración de NaHCO<sub>3</sub> ejerce un efecto significativo positivo en la remoción de PO<sub>4</sub>, de tal manera que, *Chlorella* sp en el reactor con 1.2 g/L de NaHCO<sub>3</sub> alcanzo una remoción del 33.5%, simultáneamente *Scenedesmus* sp, *Hapalosiphon* sp y *Ciano 13* sp en medios con 0.8 g/L NaHCO<sub>3</sub> alcanzaron un porcentaje de remoción de PO<sub>4</sub> del 67.5%, 88% y 79.5% respectivamente.

Por el contrario, el Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> como fuente de carbono tiene una influencia significativa negativa, debido a que solo *Hapalosiphon* sp logró remover el 26% de PO<sub>4</sub> en el reactor con 1.2 g/L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, en los demás estudios realizados con adición de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> no represento viabilidad para la remoción de PO<sub>4</sub> en el proceso. Sin embargo, en el control de cada cepa se observa que, tanto *Chlorella* sp como *Scenedesmus* sp y *Ciano 13* lograron un porcentaje de remoción de PO<sub>4</sub> del 16.1, 55.4 y 46.3% respectivamente, lo cual demuestra que estos microorganismos aprovecharon la fuente de PO<sub>4</sub> presente en el agua piscícola para su crecimiento.

Según de Carvalho, Sydney, Assú-Tessari y Soccol (2019), el proceso de producción de biomasa en este medio reduce la carga, antes de regresar a los cuerpos de agua contribuyendo con el medio ambiente. Con los resultados obtenidos en este estudio, se destaca la eficiencia en la

remoción de  $\text{NO}_3$  y  $\text{PO}_4$  al incorporar el cultivo de microalgas y cianobacterias en aguas residuales de piscicultura.

En la Tabla 8, se representan los valores fisicoquímicos iniciales del agua residual de piscicultura, la cual se recolectó de un estanque donde cultivan peces de origen africano (Tilapia roja) y de allí se evaluó la calidad del agua antes y después del tratamiento.

Tabla 8. Análisis fisicoquímicos iniciales del agua de piscicultura.

<b>Parámetros</b>	<b>Unidades</b>	<b>Resultado</b>
pH	Unidades de pH	8
Turbidez	FAU	27
Temperatura	°C	20-25
Demanda bioquímica de oxígeno ( $\text{DBO}_5$ )	mg/L	25.3
Demanda química de oxígeno (DQO)	mg/L	41
Alcalinidad Total	mg/L $\text{CaCO}_3$	80,88
Acidez	mg/L $\text{CaCO}_3$	6
Dureza Total	mg/L $\text{CaCO}_3$	90
Dureza Cálcica	mg/L $\text{CaCO}_3$	62.5
Nitratos	mg/L $\text{NO}_3$	5.5
Fosfatos	mg/L $\text{PO}_4$	16

Según Liu et al., (2019) para el tratamiento de aguas residuales de actividad piscícola por fitorremediación con microalgas se debe regular las concentraciones iniciales de nutrientes en el medio, así como también, la concentración de inóculo ya que son dos variables que afectan significativamente en la eliminación de contaminantes.

En la Tabla 9, se ilustran los análisis fisicoquímicos realizados al terminar el tratamiento. La actividad de la piscicultura no se encuentra en ningún sector, por lo cual, para este estudio, se tomaron como base los límites permisibles de vertimiento puntual de agua residual que se indican en el sector de otras actividades, en la resolución 631 del 17 de marzo de 2015. En general, los valores obtenidos cumplen con los parámetros y se encuentran dentro de los límites permisibles, lo que permite que el agua resultante después del tratamiento se pueda reutilizar en el sistema de producción de peces-microalgas reduciendo el uso de la fuente hídrica.

Beigbeder., et al (2019) mencionan que los tratamientos de aguas residuales con microalgas disminuyen costos operativos y a su vez es considerado este tratamiento, en comparación a los métodos de tratamiento tradicionales, también mencionan la eficiencia de la fitorremediación y la alta producción de biomasa.

Zhuang, Li y Ngo (2020), mencionan que un factor importante para el cultivo de microalgas y cianobacterias es la tasa de carga contaminante la cual depende del tipo de agua residual que se esté usando, como pueden ser, aguas residuales de lácteos (Castro-Ceseña., et al 2016), aguas residuales de bodegas (Danaee et al., 2018), aguas residuales sintéticas (Zhang et al., 2018), aguas residuales de campos petrolíferos (Zheng y Ke, 2017), aguas residuales de la etapa de acabado del cuero en las curtidurías (Pena, Agustini, Trierweiler y Gutterres, 2020), aguas residuales de la agroindustria (Konur, 2020), aguas residuales municipales y porcinas (de Souza Leite, 2019), aguas residuales de cervecería (Song et al., 2020), aguas residuales del procesamiento de alimentos (Li et al., 2019) y aguas residuales textiles (Kumar, Huy, Bakonyi, Bélafi-Bakó y Kim, 2018) entre otras, las cuales han sido tratadas por estos microorganismos obteniéndose resultados significativos en producción de biomasa y metabolitos.

Guldhe, Ansari, Singh, y Bux (2017) mencionan que para reutilizar este tipo de agua residual o su liberación al medio ambiente se debe realizar un tratamiento previo con el fin de evitar la eutrofización, lo cual disminuye la productividad del sistema ya que no solo generan costos extras, sino que incluso puede ocasionar la presencia de subproductos tóxicos.

La investigación demostró que el uso de este tipo de agua residual en el cultivo de microalgas y cianobacterias funciona como un proceso de fitorremediación, ya que los niveles de N y P causantes de la eutrofización son consumidos en porcentajes de hasta el 99% y 88% de  $\text{NO}_3$  y  $\text{PO}_4$  respectivamente, lo que hace que esta agua residual después del proceso de cultivo pueda ser vertida sin ningún inconveniente a una fuente hídrica o pueda reutilizarse para el cultivo de peces.

Tabla 9. Análisis fisicoquímicos de agua post-cultivo.

	[g/L]	pH	Turbiedad (FAU)	T (°C)	DBO5 (mg/L)	DQO (mg/L)	Alcalinidad (mg/L CaCO <sub>3</sub> )	Acidez (mg/L CaCO <sub>3</sub> )	Dureza total (mg/L CaCO <sub>3</sub> )	Dureza cálcica (mg/L CaCO <sub>3</sub> )	Nitratos (mg/L)	Fosfatos (mg/L)	
Chlorella sp	Carbonato	0	9,0	27,0	23	2,0	20,5	215,6	0	118,0	44,7	5,2	32,7
		0,8	9,6	30,0	23	30,7	70,0	1150,2	0	85,0	32,0	5,7	44,6
		1,2	8,0	34,0	23	18,0	41,0	938,8	0	58,0	24,0	5,6	44,4
	Bicarbonato	1,6	9,8	37,0	23	14,0	90,6	1894,0	0	56,0	24,0	6,0	43,6
		0	7,9	11,0	23	31,5	70,0	84,9	0	41,3	22,5	28,5	35,5
		0,8	8,7	13,0	23	13,5	56,4	324,9	0	36,3	23,8	43,7	29,5
	Carbonato	1,2	8,9	15,0	23	9,0	41,0	467,4	0	31,3	22,5	1,4	26,4
		1,6	9,1	18,0	23	9,0	32,5	511,8	0	31,3	20,0	4,7	31,3
		0	8,9	11,0	23	6,0	64,9	174,4	0	58,0	24,0	3,6	17,4
Scenedesmus sp	Carbonato	0,8	9,6	14,0	23	14,0	54,7	843,0	0	56,0	29,0	3,9	24,5
		1,2	9,7	20,0	23	2,0	30,8	1415,2	0	47,0	25,0	4,3	43,0
		1,6	9,8	22,0	23	2,0	32,5	3935,0	0	56,0	21,0	20,8	47,2
	Bicarbonato	0	7,9	4,0	23	36,0	6,8	230,9	0	51,3	4,3	3,0	1,5
		0,8	8,8	22,0	23	57,0	20,5	905,3	0	88,8	32,5	1,8	14,1
		1,2	9,0	5,0	23	51,0	18,8	1098,6	0	60,0	37,5	6,6	15,9
	Carbonato	1,6	9,0	10,0	23	54,0	32,5	1206,3	0	43,8	32,5	7,8	22,0
		0	7,9	10,0	22	9,0	133,3	93,8	0	42,5	30,0	1,0	5,6
		0,8	8,5	15,0	22	9,0	116,2	608,8	0	25,0	22,5	1,2	8,4
Hapalosiphon sp	Carbonato	1,2	8,9	13,0	22	36,0	136,7	409,0	0	27,5	20,0	0,2	5,2
		1,6	8,9	16,0	22	45,0	105,9	1066,8	0	22,5	17,5	0,6	10,6
		0	8,0	7,0	22	36,0	3,4	92,5	0	45,0	20,0	0,2	1,5
	Bicarbonato	0,8	8,5	7,0	22	27,0	112,8	455,5	0	40,0	12,5	0,5	0,8
		1,2	8,7	8,0	22	15,0	99,1	624,0	0	27,5	12,5	0,5	1,3
		1,6	8,7	7,0	22	33,0	13,7	721,8	0	25,0	17,5	0,6	1,1
	Carbonato	0	8,2	9,0	22	27,0	10,3	98,5	0	52,5	42,5	0,3	4,0
		0,8	8,6	12,0	22	33,0	47,8	550,5	0	25,0	20,0	1,1	7,0
		1,2	8,9	10,0	22	33,0	54,7	976,3	0	25,0	22,5	1,3	7,4
Ciano 13 sp	Carbonato	1,6	9,0	15,0	22	42,0	109,3	1048,8	0	22,5	15,0	0,2	8,5
		0	7,8	12,0	22	27,0	3,4	77,3	0	47,5	25,0	0,1	1,3
		0,8	8,5	11,0	22	30,0	3,4	429,8	0	45,0	20,0	1,0	1,3
	Bicarbonato	1,2	8,7	10,0	22	48,0	10,3	608,3	0	35,0	25,0	0,8	2,0
		1,6	8,8	7,0	22	33,0	17,1	780,5	0	20,0	15,0	0,8	2,1

### 4.3 Evaluación de condiciones mínimas de la concentración de fuente de N y P para el aprovechamiento de las aguas residuales de piscicultura en la producción de biomasa

#### 4.3.1 *Chlorella* sp.



Figura 11. Fotografía de reactores del diseño de experimentos con *Chlorella* sp.

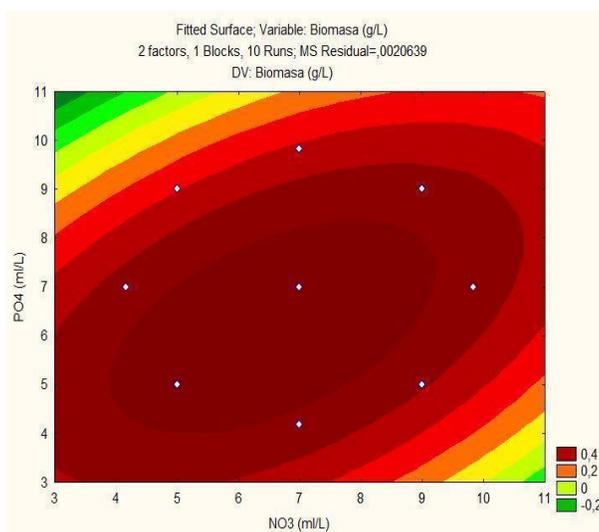


Figura 12. Superficie de respuesta del modelo N/P para la producción de biomasa de *Chlorella* sp.

La metodología de la superficie de respuesta (RSM) ilustrado en la Figura 12, presenta los requerimientos de  $\text{PO}_4$  y  $\text{NO}_3$  para obtener la máxima concentración de biomasa a partir de *Chlorella* sp, estos se encuentran entre cantidades de 4 a 6 mL/L de fuente de  $\text{PO}_4$  y 4 a 8 mL/L de fuente  $\text{NO}_3$ .

Guldhe et al., (2017) en su estudio, emplearon aguas residuales de acuicultura suplementadas con diferentes concentraciones de  $\text{NaNO}_3$  (200,400,600,1500) mg/L con *Chlorella*

*sorokiniana*, observando eficiencias de eliminación de 84.5% y 73.3% para  $\text{NO}_3$  y  $\text{PO}_4$  respectivamente. Además, afirman que la suplementación con  $\text{NaNO}_3$  mejoró la producción de biomasa y metabolitos. Esto es comparable con los resultados obtenidos a partir de este estudio, ya que también, se adicione al medio diferentes concentraciones de  $\text{NaNO}_3$ , tales concentraciones fueron 104.3, 125, 175, 225 y 245.7 mg/L demostrando la eficiencia del medio para el crecimiento microalgal.

La concentración inicial de *Chlorella* sp osciló entre 0.05 y 0.08 g/L, los resultados se reflejan en cada uno de los puntos que se observan en el diagrama (Figura 12), al modificar las condiciones de fosfato dipotásico, fosfato monopotásico y Nitrato de sodio como fuente de  $\text{PO}_4$  y  $\text{NO}_3$  respectivamente.

Durante los primeros 10 días de cultivo se alcanzó hasta 0.3 g/L, siendo ésta la producción máxima de *Chlorella* sp en cantidades de 4.17 mL/L de fuente de  $\text{PO}_4$  y 7 mL/L de  $\text{NO}_3$  en el experimento 5 y en condiciones de 5 mL/L de fuente de  $\text{PO}_4$  y  $\text{NO}_3$  en el experimento 7.

Después del cultivo, se obtuvo que la mayor producción de biomasa de *Chlorella* sp fue alrededor de 0.5 g/L en 3 experimentos; el cultivo 5 con 4.17 mL/L de fuente de  $\text{PO}_4$  y 7 de  $\text{NO}_3$ , el cultivo 7 con 5 mL/L de fuente de  $\text{PO}_4$  y  $\text{NO}_3$ , además del cultivo 9 con 7 mL/L de  $\text{PO}_4$  y  $\text{NO}_3$ . Por el contrario, en condiciones de 9.828 mL/L de  $\text{PO}_4$  y 7 mL/L de  $\text{NO}_3$  se produjo 0.27 g/L de biomasa siendo este valor bajo en comparación a los demás resultados.

Se observó que en condiciones de 5 mL/L de fuente de  $\text{PO}_4$  y  $\text{NO}_3$  (Experimento 7), la productividad de *Chlorella* sp fue mayor a los 20 días de cultivo, siendo esta de  $26.87 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  en cambio a estas mismas condiciones con 30 días de cultivo se obtuvo una productividad inferior de  $15.26 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , debido a que, la producción de biomasa no tuvo un valor significativo del día 20 al día 30 de cultivo.

Kuo et al., (2016) afirman que al incluir gases de combustión de caldera y aguas residuales de una piscifactoría en el cultivo de *Chlorella* sp, se logra reutilizar el recurso hídrico disminuyendo, además, la emisión de CO<sub>2</sub>, siendo adecuado complementar con nutrientes.

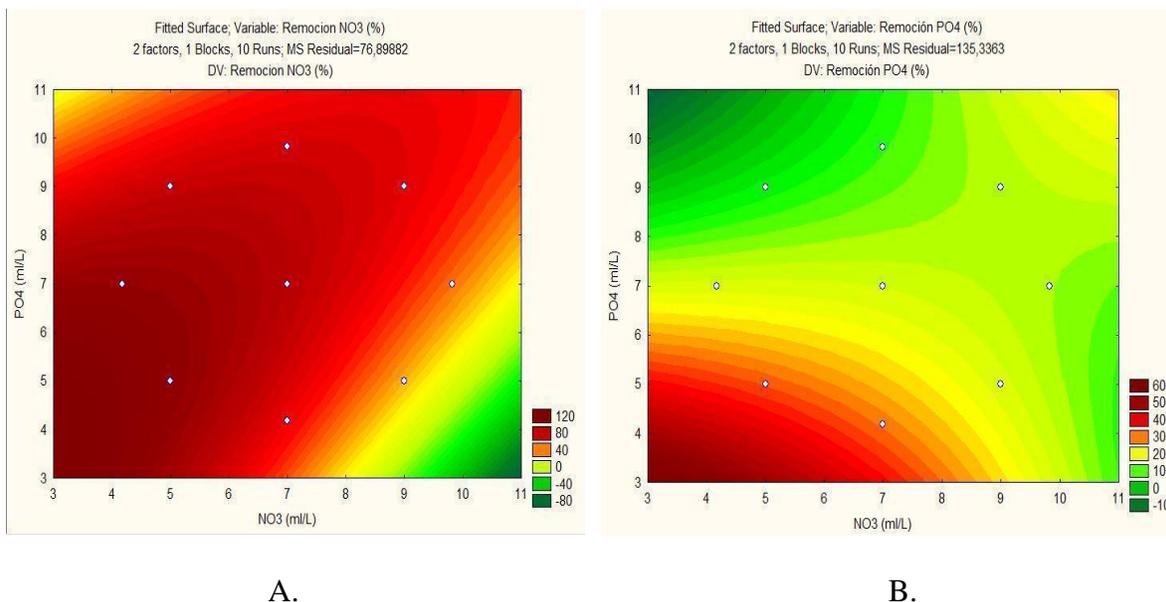


Figura 13. Superficie de respuesta obtenida mediante el diseño de experimento con *Chlorella* sp.

A. Modelo N/P para la remoción de NO<sub>3</sub>. B. Modelo N/P para la remoción de PO<sub>4</sub>.

Se realizaron los diagramas de superficie de respuesta ilustrados en la Figura 13 de acuerdo con los resultados obtenidos, con el fin de conocer las concentraciones que permiten obtener un mayor porcentaje de remoción tanto de NO<sub>3</sub> como de PO<sub>4</sub>.

En la metodología de la superficie de respuesta (RSM) ilustrado en la Figura 13A, se presenta el modelo N/P para la remoción de NO<sub>3</sub> a partir de *Chlorella* sp, donde las mejores condiciones para lograr un porcentaje alto de eliminación de NO<sub>3</sub> son cantidades de 3 a 7 mL/L de fuente de PO<sub>4</sub> y 3 a 5 de NO<sub>3</sub>. Se obtuvieron porcentajes de hasta el 98% de remoción de NO<sub>3</sub> en los experimentos 4 y 7, mientras que el experimento 2 mostró el porcentaje más bajo de remoción de NO<sub>3</sub> del 18%.

En general, con *Chlorella* sp se observó un comportamiento positivo en cuanto al aprovechamiento de  $\text{NO}_3$ , alcanzando un porcentaje de remoción alto, esto demuestra que se pueden establecer sistemas de producción microalgal, evitando costos de producción, manteniendo un sistema productivo sostenible, donde se controlen los flujos de aireación y las concentraciones de nutrientes, de tal manera que, la microalga tenga la suficiente cantidad de estos para su crecimiento y producción de metabolitos.

Ansari, Singh, Guldhe y Bux, (2017) argumentan que para la generación integrada de biomasa y eliminación de nutrientes es prometedor suplementar el medio con 600 mg/L de  $\text{NaNO}_3$ , ya que su estudio demostró eficiencias de eliminación  $>75\%$  de  $\text{NO}_3$  y  $>98\%$  de  $\text{PO}_4$  y productividad de biomasa con *C. sorokiniana* de  $157.04 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  resultado que es comparable en este estudio, con la productividad de  $26.87 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  obtenida con *Chlorella* sp empleando solo 125 mg/L de  $\text{NaNO}_3$ .

Putri y Hung, (2020) mencionan en su estudio que a partir de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus quadricauda* se han disminuido el nitrógeno y el fósforo en intervalos de porcentaje entre 20.7-99.7% y 15.8-99.7% respectivamente.

En la Figura 13B se ilustra el modelo N/P para la remoción de  $\text{PO}_4$ , mostrando así que, en medios suplementados con condiciones iguales o inferiores a 5 mL/L de nitrato de sodio, fosfato dipotásico y fosfato monopotásico se logra que *Chlorella* sp alcance mayores porcentajes de remoción de  $\text{PO}_4$ . Se logró obtener porcentajes de remoción de  $\text{PO}_4$  de hasta 33.1% y 36.3% en los experimentos 5 y 7 respectivamente. Los resultados obtenidos permiten afirmar que *Chlorella* sp requiere cantidades equilibradas tanto de fosfatos como de nitratos debido a que, en el experimento 8 con condiciones de 9 mL/L de fuente de  $\text{PO}_4$  y  $\text{NO}_3$  se obtuvo el porcentaje de remoción de  $\text{PO}_4$  menor al 4%.

En relación con los aspectos de importancia, producción de biomasa, remoción de  $\text{NO}_3$  y  $\text{PO}_4$  se encontró que *Chlorella* sp dio los mejores resultados en las condiciones del experimento 7.

En el estudio realizado por Kothari et al., (2013) empleando agua residual, lograron remover el 90%  $\text{NO}_3$  y el 96% de  $\text{PO}_4$ , por otro lado, Wang et al., (2013) disminuyeron en un 90% la concentración de  $\text{PO}_4$  y Huo et al., (2019) mostraron una tasa de remoción de Nitrógeno total del 96.8% y casi que el 100% de Fósforo total en aguas residuales, demostrando la eficiencia de las microalgas en este tipo de tratamientos.

Se observó que a medida que los nutrientes y la capacidad de crecimiento de las microalgas estaban relacionadas directamente, los experimentos con mayor consumo de fuente de N y P representaban la producción más alta de biomasa. Según Huang, Lou, Luo, y Wang, (2021) las vías metabólicas de las algas se ven influenciadas por la fuente de N en comparación con el P, así mismo, afirma que el acoplamiento entre el N/P dentro del cultivo influye en la absorción de nutrientes para el crecimiento de las microalgas.

#### 4.3.2 *Scenedesmus* sp.



Figura 14. Fotografía de reactores del diseño de experimentos con *Scenedesmus* sp.

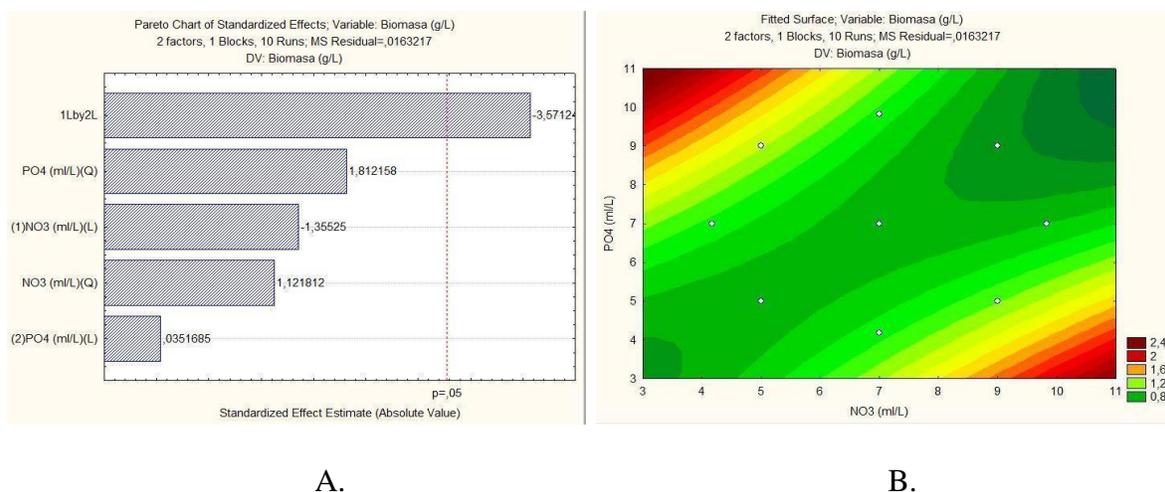


Figura 15. A. Análisis de Pareto para la producción de biomasa. B. Superficie de respuesta del modelo N/P para la producción de biomasa de *Scenedesmus* sp.

A partir del diagrama de Pareto presentado en la Figura 15A, se determinan las variables influyentes para el sistema, donde, la interacción entre NO<sub>3</sub> y PO<sub>4</sub> en el medio de cultivo ejerce una influencia significativa negativa (-3.5712), mientras que, de forma individual, estos compuestos no afectan significativamente la producción de biomasa. González-Delgado et al., (2017) en su estudio del diseño de medios de cultivo selectivos afirman que la producción de biomasa está directamente relacionada con la cantidad de nitrato de sodio y fosfato de potasio.

El sistema no factorial con superficie de respuesta que se observa en la Figura 15B, la intensificación del color rojo indica que las mejores condiciones para la producción de biomasa son medios suplementados con cantidades de 3 a 4 mL/L de NO<sub>3</sub> y 9 a 11 mL/L de fuente de PO<sub>4</sub> o 9 a 11 mL/L de NO<sub>3</sub> y 3 a 4 mL/L PO<sub>4</sub>. En otras palabras, el medio se puede acondicionar con NaNO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en unidades de mM, (0.882-1.177, 0.387- 0.474, 1.157-1.415) o (2.647-3.236, 0.129-0.172, 0.386- 0.514) respectivamente.

Para este estudio, se emplearon concentraciones iniciales entre 0.015 a 0.105 g/L de *Scenedesmus* sp, cada punto en el diagrama (Figura 15B) hace referencia a los experimentos

realizados. Después de 20 días de cultivo, se observó una producción de biomasa de hasta 1.13 g/L de en las condiciones del experimento 5, por lo cual es favorable cultivar *Scenedesmus* sp en estas condiciones durante solo 20 días.

Después de los 30 días de cultivo, los experimentos 1 y 2 en concentraciones de (5mL/L de NO<sub>3</sub>, 9 mL/L de PO<sub>4</sub>) y (9 mL/L de NO<sub>3</sub>, 5mL/L de PO<sub>4</sub>) mostraron una producción final de 1.3 y 1.07 g/L, es decir, aumentaron 1.2 y 0.96 g/L respectivamente. En general, en condiciones de baja concentración de fosfatos y altas de nitratos, al igual que concentraciones altas de fosfatos y bajas de nitratos, se logra mayor productividad de biomasa.

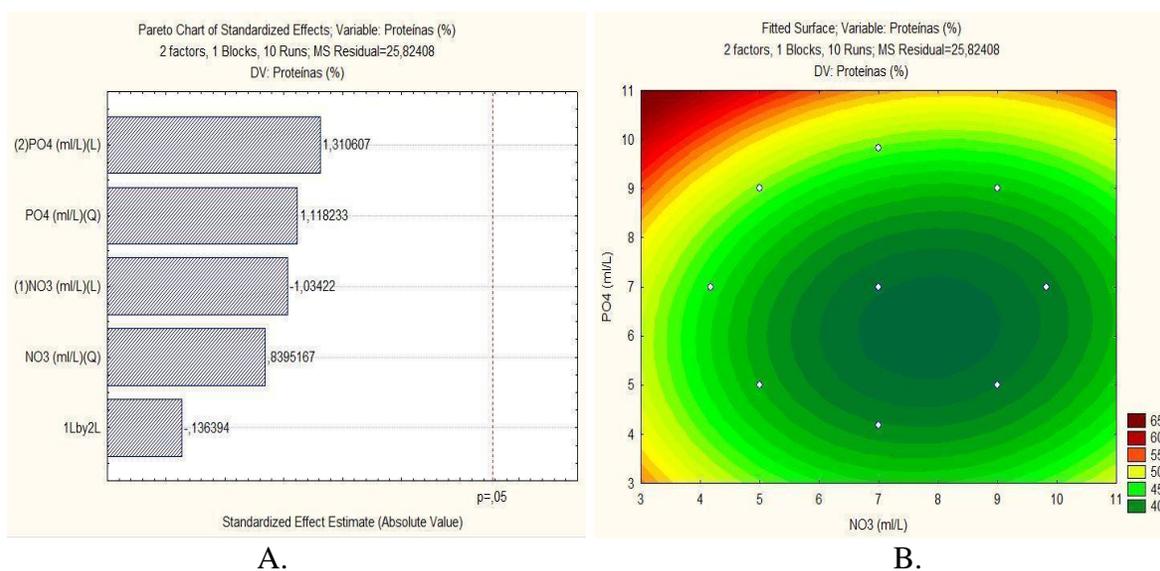


Figura 16. A. Análisis de Pareto para la producción de proteínas. B. Superficie de respuesta del modelo N/P para la producción de proteínas de *Scenedesmus* sp.

Se evaluó mediante un diagrama de Pareto (Figura 16A) si variables tales como: cantidad de fosfatos, nitratos o la interacción de estas dos afectaban el proceso y se determinó que ninguna tuvo una influencia significativa para la producción de proteínas.

Según los resultados obtenidos a partir de *Scenedesmus* sp, con condiciones de 9 a 11 mL/L de fuente de PO<sub>4</sub> y 3 a 4 mL/L de NO<sub>3</sub> como se muestra en la Figura 16B es posible obtener

mayor producción de proteínas. Mediante la extracción y cuantificación de proteínas se logró obtener porcentajes de hasta el 45.8%. En la mayor parte de los experimentos (1,2,3,4,7,8) se encontraron porcentajes de producción de proteínas alrededor del 40%.

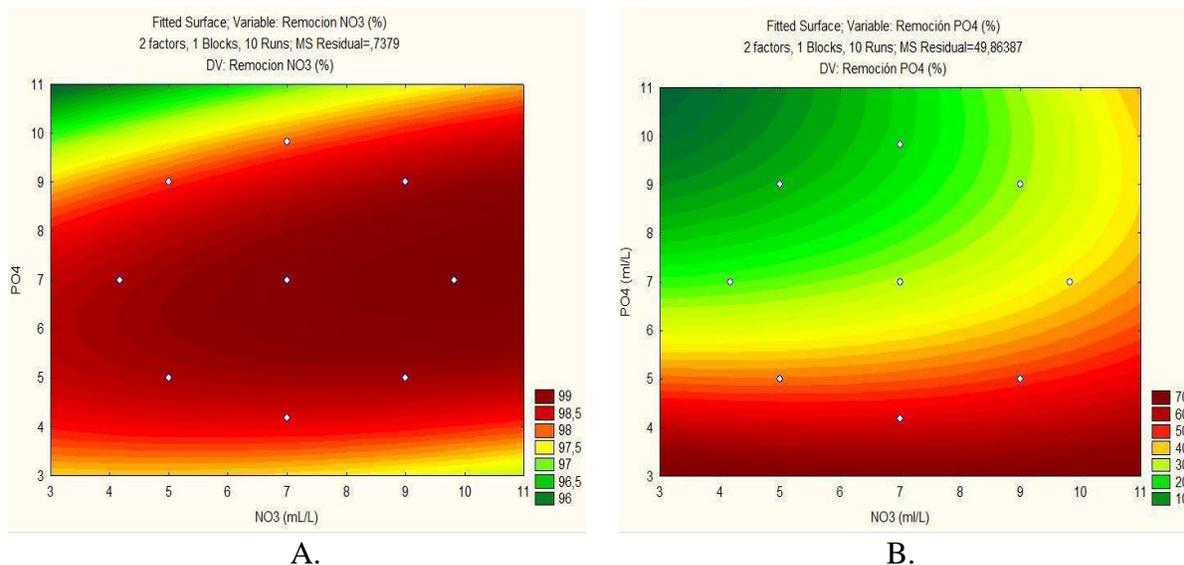


Figura 17. Superficie de respuesta obtenida mediante el diseño de experimento con *Scenedesmus* sp. A. Modelo N/P para la remoción de NO<sub>3</sub>. B. Modelo N/P para la remoción de PO<sub>4</sub>.

En la figura 17A, se observó mediante RSM que con valores de 7 a 10 mL/L de NO<sub>3</sub> y 5 a 9 mL/L de PO<sub>4</sub>, se logra un porcentaje de remoción por encima del 99%, por consiguiente, el medio se puede suplementar con NaNO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en unidades de mM, (2.059-2.942, 0.215- 0.387, 0.643-1.157) respectivamente. Todos los experimentos realizados muestran un rango de remoción entre 97.5 al 99.8% donde el valor más alto para la remoción corresponde al experimento 4 con condiciones de 1.227 mM NaNO<sub>3</sub>, 0.301 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0.9 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Se afirma que *Scenedesmus* sp aprovechó al máximo la cantidad de nitratos del efluente, así como también, la concentración suplementada.

Por otra parte, la Figura 17B representa el modelo N/P para la remoción de PO<sub>4</sub> con base en los resultados obtenidos con *Scenedesmus* sp, donde se observa que las mejores condiciones

para lograr un porcentaje alto de remoción de  $\text{PO}_4$  son: 3 a 5 mL/L de fuente de  $\text{PO}_4$ , es decir, 0.129-0.172 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.386-0.514 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y todo el espectro de  $\text{NO}_3$  analizado por STATISTICA, concentraciones en el rango de 0.882 a 3.236 mM de  $\text{NaNO}_3$ ; no se observó que la concentración de  $\text{NO}_3$  afectará la remoción de  $\text{PO}_4$ . Se alcanzaron porcentajes de remoción de  $\text{PO}_4$  de hasta 47.3 y 60.4% en las condiciones de los experimentos 2 y 5 respectivamente, representando así los porcentajes máximos obtenidos en el estudio. En cambio, en el experimento 1 con concentraciones de 1.471 mM  $\text{NaNO}_3$ , 0.387 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y 1.157 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  se obtuvo un porcentaje bajo de eliminación de  $\text{PO}_4$  de 8.3%, aunque a estas mismas condiciones del experimento 1 se obtuvo un 97.5% de remoción de nitratos, lo ideal es que el medio cumpla con condiciones que permitan que la microalga tenga la mayor producción de biomasa y sea eficiente la remoción de N y P, por ende, no es viable emplear estas concentraciones.

En relación con los aspectos de importancia, producción de biomasa, producción de proteína, remoción de  $\text{NO}_3$  y  $\text{PO}_4$  *Scenedesmus* sp dio mejores resultados en las condiciones del experimento 2.

Especies del género *Chlorella* y *Scenedesmus* no solo se han empleado en cultivos de aguas residuales de actividad piscícola, sino que también, en efluentes de tipo municipal en los cuales se han incorporado como nutrientes diferentes concentraciones de sulfato, nitrato, y fosfato, logrando eliminar con *C. vulgaris* 68% de  $\text{NO}_3$  y 94% de  $\text{PO}_4$  empleando una relación de N/P de 7:1 y con *S. obliquus* 4:1, eliminando el 59% de  $\text{NO}_3$  y 90% de  $\text{PO}_4$ , además de, una producción de biomasa a partir de *C. vulgaris* y *S. obliquus* de hasta 0.41 g/L y 0.69 g/L respectivamente (Ajala y Alexander, 2020).

Los resultados presentados se asemejan a los de estudios anteriores ya que la producción de biomasa al incorporar N y P en el medio fue mayor con *Scenedesmus* sp que con *Chlorella* sp.

En otro estudio, Zhang et al., (2018) manifiestan que en un experimento a gran escala la adición de  $K_2HPO_4$  puede ser fundamental para incrementar la productividad de biomasa y lípidos al utilizar cierto tipo de efluente como medio de cultivo.

Algunas especies de microalgas representan una doble función, adaptándose a condiciones de cultivo diferente, produciendo biomasa con alto contenido de valor y a su vez son atractivas en tratamiento de aguas residuales. Este es el caso de *C. sorokiniana* y *S. obliquus*, según Gupta et al. (2016), éstas se han seleccionado por su tolerancia a mayores cantidades de carga orgánica y estrés fisiológico sin necesidad de realizar un tratamiento previo a la inoculación. En su estudio, disminuyeron un 86.93% y 68.24% de N/P utilizando *C. sorokiniana*, mientras que, con *S. obliquus* se observó un mayor potencial de eliminación con 98.54% y 97.99% de N/P.

#### 4.4 Influencia del ciclo Luz: Oscuridad en el proceso de cultivo de los mejores resultados obtenidos de la evaluación de la fuente de C, N y P.



Figura 18. Fotografías: A. Preparación de reactores. B. Estabilización de pH e inoculación.

En la Figura 18 se ilustra, que el montaje se llevó a cabo en dos zonas diferentes, la primera es la zona de preparación de reactores con sus respectivos nutrientes (Figura 18A) y la segunda zona es donde se efectuó la estabilización del pH y la inoculación de *Chlorella* sp como se observa en la Figura 18B, con el fin de mantener las condiciones asépticas posibles ya que la microalga se extrajo de un reactor madre y se debían mantener libre de otros contaminantes.

Khalid, Yaakob, Abdullah y Takriff (2019) realizaron un análisis donde determinan que la intensidad de luz, el tamaño del inóculo y el fotoperiodo son factores críticos para la absorción de nutrientes. En otro estudio, Suparmaniam et al., (2019) mencionan que los requisitos generales de crecimiento para microalgas son los nutrientes, la salinidad, la temperatura y la luz, con todo esto se pueden obtener mejores eficiencias empleando ciertas condiciones.

Por esta razón, para la selección de este experimento se tuvo en cuenta los anteriores estudios, seleccionando así, los mejores resultados en crecimiento para elección del microorganismo, la fuente de carbono y, a su vez, experimentos que representaron los porcentajes más altos de remoción de  $\text{NO}_3$  y  $\text{PO}_4$ .

Es de importancia variar las condiciones de Luz: Oscuridad en el cultivo de microalgas para determinar cómo influyen en la producción de biomasa y así mismo, determinar cuál es mejor en este tipo de cultivo. Por esto, en este estudio se emplearon fotoperiodos de 12:12, 16:8 y 24:0 horas de Luz: Oscuridad con *Chlorella* sp. El medio se suplemento con condiciones de fuente de C/N/P adicionando 1.2 g/L de bicarbonato de sodio, 1.471 mM de  $\text{NaNO}_3$ , 0.215 mM de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y 0.643 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Así mismo, se realizaron cultivos en medio sin adición de estos para realizar análisis comparativo. Por último, se ajustó a pH de 7 todos los reactores.

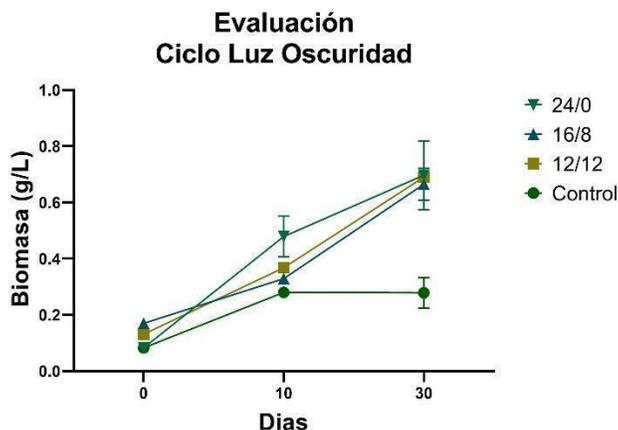


Figura 19. Concentración de biomasa obtenida con *Chlorella* sp.

Los cultivos inicialmente contenían entre 0.08g/L hasta 0.17 g/L de biomasa como se puede observar en la Figura 19, durante los primeros 10 días se observó una producción de 0.479 g/L en el reactor de 24:0 y 0.368 g/L en 12:12 Luz: Oscuridad. Al finalizar el cultivo, *Chlorella* sp mostró la producción más baja con el control con una producción de biomasa de 0.28 g/L, por el contrario, se observó que la biomasa aumentó notoriamente en ciclos Luz: oscuridad de 24:0, 16:8 y 12:12 al incluir la concentración de C, N y P seleccionadas obteniendo un incremento en la biomasa de  $0.56 \pm 0,059$  g/L para una producción final de 0.7, 0.67 y 0.69 g/L respectivamente. Debido a que los resultados obtenidos en estos últimos fueron similares, este estudio postula la utilización de ciclos Luz: Oscuridad de 12:12 para reducir costos energéticos.

Fan et al., (2020) mencionan que el fotoperiodo se torna un factor importante en el crecimiento microalgal y afirman que *Chlorella* sp presenta resultados viables con fotoperiodos de 24:0 y 12:12 Luz: oscuridad, con una tasa de crecimiento de 0,79 g/L. Por otro lado, Ansari et al., (2017) expresan la importancia de las concentraciones de nutrientes en agua residual ya que podría limitar la penetración de la luz debido a la turbidez, el efluente debe contener una gama intermedia para que se pueda utilizar de forma directa para el cultivo microalgal, así mismo

manifiestan que en otros tipos de agua residuales es necesario incluso realizar dilución antes de su uso como medio de crecimiento y recomiendan ciclos luz: oscuridad de 16:8. Con respecto a lo anterior, el efluente empleado garantiza su potencial gracias a la eficiencia de eliminación obtenida.

Guldhe et al (2017) propone utilizar fase oscura completa, ya que en su estudio obtuvieron una productividad de  $498,14 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$  suplementando con  $400 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_3$ . Por otro lado, Ansari et al., (2019) mencionan que la utilización de aguas residuales presenta beneficios ambientales y crea un proceso económicamente viable, además señalan que en condiciones luz: oscuridad 16:8, se obtuvo eficiencias altas de remoción de N y P luego del proceso de fitorremediación. El éxito en el establecimiento y crecimiento de estos microorganismos depende del adecuado control de parámetros como temperatura, concentración de nutrientes, intensidad de luz y pH (González-Delgado et al., 2017).

### Diseño propuesto para el aprovechamiento de aguas residuales de piscicultura mediante el uso de microalgas.

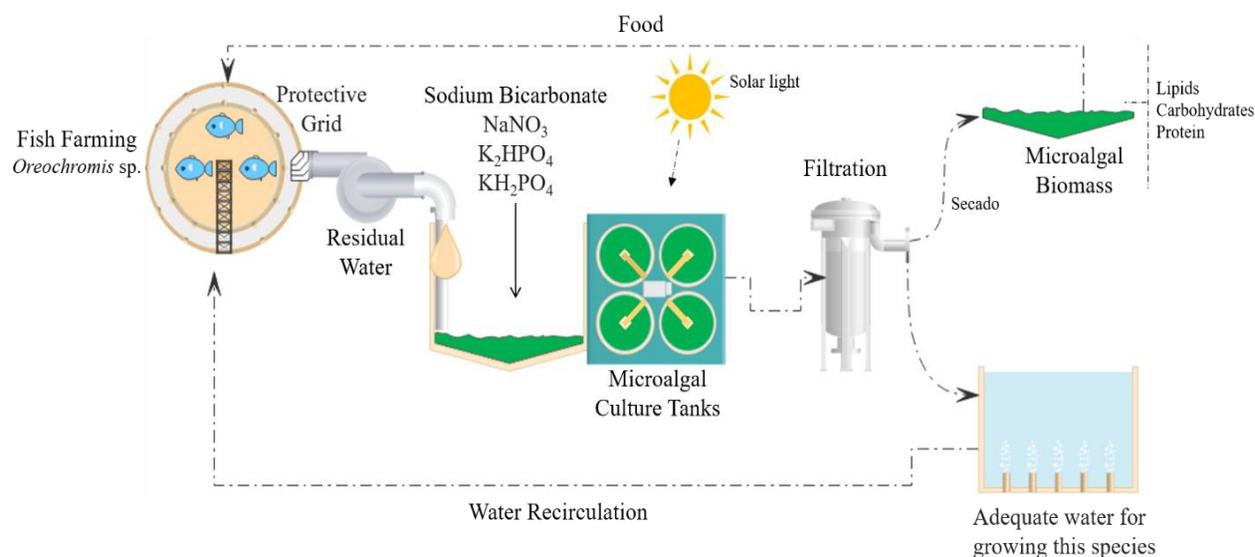


Figura 20. Sistema para el tratamiento de agua residual de piscicultura.

El tratamiento de agua residual que se ilustra en la Figura 20, inicia desde el cultivo de *Oreochromis* sp (tilapia roja), el efluente donde se desarrolla la piscifactoría pasa por un intercambiador permitiendo solo la salida de agua con concentraciones de nutrientes útiles para el crecimiento microalgal. Con el fin de mejorar la productividad se suplementan los cultivos para *Chlorella* sp con fuente de C/N/P empleando Bicarbonato de sodio, Nitrato de sodio, Fosfato dipotásico y Fosfato monopotásico. En los tanques de cultivo se instala agitadores de flujo axial para minimizar el efecto de O<sub>2</sub> bajo lo cual podría reducir la biomasa producida, así mismo, la velocidad de agitación es un factor para estudiar para evitar daño celular (Borowitzka, 1992), controlando el pH y la temperatura, por otro lado, la luz solar es utilizada para el fotoperiodo luz: oscuridad. Las microalgas absorben y reducen el contenido de P y N aprovechándose para su crecimiento, después se realiza una filtración con el fin de separar la biomasa del agua ya tratada.

La biomasa se somete a un proceso de secado, con lo cual puede ser útil para el propio alimento de los peces o para la extracción de carbohidratos y proteínas principalmente; no obstante, puede obtenerse lípidos en menor proporción. En la acuicultura son empleadas más de 40 especies de microalgas. Las principales funciones de las microalgas en la acuicultura es la nutrición de algunos animales acuáticos. La nutrición aumenta en una gran proporción y la dieta de los peces disminuye el precio en un 50% (Sathasivam, Radhakrishnan, Hashem y Elsayed, 2017). El agua resultante se recircula hacia los estanques de cultivo de *Oreochromis* sp, incluso puede llevarse un porcentaje hacia los vertimientos puntuales, ya que se encontró que cumple con los valores máximos permisibles, por lo tanto, no representaría riesgos por exceso de N y P. Dando por resultado un sistema productivo con potencial para ser llevado a cabo a gran escala. Es importante resaltar que se debe ampliar el estudio con respecto a factores como la agitación, recambio de agua y aireación, así como en el análisis de los componentes de la biomasa obtenida (carbohidratos, lípidos y proteínas) y sus posibles vías de aprovechamiento, con el fin de generar un proceso sostenible y en camino a un concepto de economía circular.

## 5. Conclusiones

Los resultados de este estudio demuestran el potencial de las aguas residuales de piscicultura como sustrato nutritivo base para la generación de biomasa de microalgas, pero que debe ser debidamente ajustado y enriquecido con el fin de obtener valores máximos de producción, además de las correctas condiciones de cultivo.

En la evaluación de la fuente de carbono con *Chlorella* sp se logró una producción de biomasa entre 0.88 y 1 g/L, en contraste, *Scenedesmus* sp dio valores inferiores de hasta 0.66 y 0.73 g/L usando bicarbonato y carbonato de sodio respectivamente. Es efectivo emplear bicarbonato de sodio para *Hapalosiphon* sp y *Ciano 13* sp donde se obtuvieron valores de 0.87 y 0.84 g/L. Así mismo se pudo demostrar que en medios enriquecidos con bicarbonato se observa la mayor remoción de N/P con valores de hasta el 99% y 88% de  $\text{NO}_3$  y  $\text{PO}_4$  respectivamente.

Mediante el diseño de experimentos, se encontró que la condición mínima de la concentración de fuente de fósforo para ambas microalgas es de 0.215 mM de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y 0.643 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , mientras que para la fuente de nitrógeno se consideran diferentes concentraciones de acuerdo con las condiciones de cada cultivo.

*Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp mostraron mejores resultados al adicionar 1.471 y 2.647 mM de  $\text{NaNO}_3$ , y se identificaron porcentajes de remoción por encima del 99% de  $\text{NO}_3$  e inferiores al 60.4%  $\text{PO}_4$ . Se observó que los fotoperiodos son muy importantes en el crecimiento de *Chlorella* sp resaltando mejores resultados en ciclos 12:12 y 24:0 con producción de 0.7 g/L de biomasa.

Es económico utilizar un mínimo gasto energético, por tal razón, es ideal trabajar con fotoperiodo 12:12 suplementando nutrientes al medio, controlando factores como pH y temperatura.

La elaboración de un diseño de medios a partir de este tipo de agua residual puede significar una propuesta importante para tratamientos a escala industrial, reduciendo N/P y una gran cantidad en los costos, evitando la utilización de nutrientes necesarios en los medios tradicionales y la realización de tratamientos previos para su reutilización.

## 6. Recomendaciones

Se debe evaluar la suplementación periódica de Bicarbonato de sodio, Nitrato de sodio, Fosfato monopotásico y Fosfato dipotásico durante el cultivo con *Chlorella* sp, debido a que pueden presentar estrés por déficit de nutrientes y en esta investigación solo se adiciono al inicio del cultivo.

Se encontró que la luz es un factor principal para el crecimiento de estos microorganismos, por lo tanto, es importante evaluar las condiciones de intensidad de luz requeridas que permitan incrementar la producción en estudios posteriores.

Es importante realizar la caracterización de la composición final de la biomasa obtenida con el fin de evaluar la mejor vía de aprovechamiento de esta para la obtención de metabolitos de interés y de alto valor industrial que haga aún más sostenible el proceso.

Se recomienda para futuras investigaciones evaluar las condiciones acá establecidas en cultivos a mayor escala, con el fin de establecer si se mantienen las condiciones propuestas o evaluar los efectos del aumento del volumen del sistema.

## Referencias Bibliográficas

- Ajala, S. O., & Alexander, M. L. (2020). Assessment of *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, and *Oocystis minuta* for removal of sulfate, nitrate, and phosphate in wastewater. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, 1-16.
- Andersen, R.A. (ed.) (2005): Algal culturing techniques, 578pp, Elsevier Academic Press, London.
- Ansari, F. A., Ravindran, B., Gupta, S. K., Nasr, M., Rawat, I., & Bux, F. (2019). Techno-economic estimation of wastewater phycoremediation and environmental benefits using *Scenedesmus obliquus* microalgae. *Journal of environmental management*, 240, 293-302.
- Ansari, F. A., Singh, P., Guldhe, A., & Bux, F. (2017). Microalgal cultivation using aquaculture wastewater: integrated biomass generation and nutrient remediation. *Algal research*, 21, 169-177
- APHA-AWWA- WPCF (2008). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21th ed. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation (WEF). Washington DC, EEUU. 1085 pp
- Arias, F. G. (2012). *El proyecto de investigación. Introducción a la metodología científica. 6ta.* Recuperado de <https://ebevidencia.com/wp-content/uploads/2014/12/EL-PROYECTO-DE-INVESTIGACION-6ta-Ed.-FIDIAS-G.-ARIAS.pdf>
- Barajas-Solano, A., Guzmán-Monsalve, A., & Kafarov, V. (2016). Effect of Carbon–Nitrogen Ratio for the Biomass Production, Hydrocarbons and Lipids on *Botryococcus braunii* UIS 003. *Chemical Engineering Transactions*, 49, 247-252.

- Barboríková, J., Šutovská, M., Kazimierová, I., Jošková, M., Fraňová, S., Kopecký, J., & Capek, P. (2019). Extracellular polysaccharide produced by *Chlorella vulgaris*—Chemical characterization and anti-asthmatic profile. *International journal of biological macromolecules*, *135*, 1-11.
- Becker, E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology advances*, *25*(2), 207-210.
- Beigbeder, J. B., Boboescu, I. Z., Damay, J., Duret, X., Bhatti, S., & Lavoie, J. M. (2019). Phytoremediation of bark-hydrolysate fermentation effluents and bioaccumulation of added-value molecules by designed microalgal consortia. *Algal Research*, *42*, 101585.
- Beltrán-Rocha, J. C., Guajardo-Barbosa, C., Barceló-Quintal, I. D., & López-Chuken, U. J. (2017). Biotratamiento de efluentes secundarios municipales utilizando microalgas: Efecto del pH, nutrientes (C, N y P) y enriquecimiento con CO<sub>2</sub>. *Revista de biología marina y oceanografía*, *52*(3), 417-427.
- Bhattacharya, S., Soundarya, R., & Mishra, S. (2016). Ammonium Bicarbonate as Nutrient Substitute for Improving Biomass Productivity of *Chlorella variabilis*. *Chemical Engineering & Technology*, *39*(9), 1738–1742.
- Borowitzka, M. 1992. Evaluación de sistemas de cultivo // estructura de costes. *Journal of Applied phycology* *4*:267-279
- Borowitzka, M. A., & Moheimani, N. R. (2013). Sustainable biofuels from algae. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, *18*(1), 13-25.
- Cardias, B. B., de Morais, M. G., & Costa, J. A. V. (2018). CO<sub>2</sub> conversion by the integration of biological and chemical methods: *Spirulina* sp. LEB 18 cultivation with diethanolamine and potassium carbonate addition. *Bioresource technology*, *267*, 77-83.

- Carvalho, J., Bittencourt, E., Ferrari, L., & Soccol, C. (2019). Chapter 2 - Culture media for the mass production of microalgae. *Biocombustibles a partir de algas (Segunda edición)*, 33-50.
- Castro-Ceseña, A. B., del Pilar Sánchez-Saavedra, M., & Ruíz-Güereca, D. A. (2016). Optimization of entrapment efficiency and evaluation of nutrient removal (N and P) of *Synechococcus elongatus* in novel core-shell capsules. *Journal of Applied Phycology*, 28(4), 2343-2351.
- Chandra, T. S., Deepak, R., Maneesh, M., Mukherji, S., Chauhan, V., Sarada, R., & Mudliar, S. (2016). Evaluation of indigenous fresh water microalga *Scenedesmus obtusus* for feed and fuel applications: Effect of carbon dioxide, light and nutrient sources on growth and biochemical characteristics. *Bioresource Technology*, 207, 430-439.
- Chen, C. Y., Ho, S., Ren, N., Chang, J., & Nagarajan, D. (2018). Waste biorefineries — integrating anaerobic digestion and microalgae cultivation for bioenergy production. *Current Opinion in Biotechnology*, 101-110.
- Chen, C. Y., Zhao, X. Q., Yen, H. W., Ho, S. H., Cheng, C. L., Lee, D. J., Bai, F.W & Chang, J. S. (2013). Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal*, 78, 1-10.
- Cheng, D. L., Ngo, H. H., Guo, W. S., Chang, S. W., Nguyen, D. D., & Kumar, S. M. (2019). Microalgae biomass from swine wastewater and its conversion to bioenergy. *Bioresource technology*, 275, 109-122.
- Cheng, P., Ji, B., Gao, L., Zhang, W., Wang, J., & Liu, T. (2013). The growth, lipid and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* with attached cultivation. *Bioresource technology*, 138, 95-100.

- Chisti, Y. (2006). MICROALGAE AS SUSTAINABLE CELL FACTORIES. *Environmental Engineering & Management Journal (EEMJ)*, 5(3).
- Chojnacka, K., & Noworyta, A. (2004). Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 34(5), 461-465.
- Colombia, L. (99). de 1993, Ley General Ambiental de Colombia, por la cual se crea el Ministerio del Medio Ambiente, se reordena el sector público encargado de la gestión y conservación del medio ambiente y los recursos naturales renovables, se organiza el Sistema Nacional Ambiental, SINA, y se dictan otras disposiciones, 41.146 Diario Oficial, 22 de diciembre de 1993.
- Danaee, S., Ofoghi, H., Heydarian, S. M., & Farazmand, A. (2018). Optimization of nitrogen and phosphorus removal from meat processing wastewaters using microalgal biofilms. *Environmental Health Engineering and Management Journal*, 5(2), 79-84.
- De Souza Leite, L., Hoffmann, M. T., & Daniel, L. A. (2019). Microalgae cultivation for municipal and piggery wastewater treatment in Brazil. *Journal of Water Process Engineering*, 31, 100821.
- Deamici, K. M., Santos, L. O., & Costa, J. A. V. (2019). Use of static magnetic fields to increase CO<sub>2</sub> biofixation by the microalga *Chlorella fusca*. *Bioresource technology*, 276, 103-109.
- Ebrahimian, A., Kariminia, H. R., & Vosoughi, M. (2014). Lipid production in mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* in a mixture of primary and secondary municipal wastewater. *Renewable Energy*, 71, 502-508.
- Elankovan, R., & Premalatha, M. (2019). Utilization of unfiltered LPG-burner exhaust-gas emission using microalga *Coelastrella* sp. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*, 29, 283-295.

- Fan, H., Wang, K., Wang, C., Yu, F., He, X., Ma, J., & Li, X. (2020). A comparative study on growth characters and nutrients removal from wastewater by two microalgae under optimized light regimes. *Environmental Technology & Innovation*, 100849.
- Gao, F., Li, C., Yang, Z. H., Zeng, G. M., Feng, L. J., Liu, J. z., . . . Cai, H. w. (2016). Continuous microalgae cultivation in aquaculture wastewater by a membrane photobioreactor for biomass production and nutrients removal. *Ecological Engineering*, 92, 55-61.
- Gao, F., Peng, Y. Y., Li, C., Yang, G. J., Deng, Y. B., Xue, B., & Guo, Y. M. (2018). Simultaneous nutrient removal and biomass/lipid production by *Chlorella* sp. in seafood processing wastewater. *Science of The Total Environment*, 640–641, 943-953.
- Geider, R. y La Roche, J. (2002). Redfield revisitado: variabilidad de C: N: P en microalgas marinas y su base bioquímica. *Revista europea de psicología*, 37 (1), 1-17.
- González-Delgado, Á. D., Barajas-Solano, A. F., & Ardila-Álvarez, A. M. (2017). Biomass and protein production of *Chlorella vulgaris* Beyerinck (Chlorellales: Chlorellaceae) via the design of selective culture media. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 18(3), 451-461.
- Guldhe, A., Ansari, F. A., Singh, P., & Bux, F. (2017). Heterotrophic cultivation of microalgae using aquaculture wastewater: a biorefinery concept for biomass production and nutrient remediation. *Ecological Engineering*, 99, 47-53.
- Gupta, S. K., Ansari, F. A., Shriwastav, A., Sahoo, N. K., Rawat, I., & 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, 255-264.
- Guo, Z., Liu, Y., Guo, H., Yan, S., & Mu, J. (2013). Microalgae cultivation using an aquaculture wastewater as growth medium for biomass and biofuel production. *Journal of Environmental Sciences*, 25, S85-S88.

- Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49(2), 157-173.
- Ho, S. H., Chang, J. S., Lai, Y. Y., & Chen, C. N. N. (2014a). Achieving high lipid productivity of a thermotolerant microalga *Desmodesmus* sp. F2 by optimizing environmental factors and nutrient conditions. *Bioresource technology*, 156, 108-116.
- Ho, S. H., Chen, C. N. N., Lai, Y. Y., Lu, W. B., & Chang, J. S. (2014b). Exploring the high lipid production potential of a thermotolerant microalga using statistical optimization and semi-continuous cultivation. *Bioresource technology*, 163, 128-135.
- Huang, Y., Lou, C., Luo, L., & Wang, X. C. (2021). Insight into nitrogen and phosphorus coupling effects on mixotrophic *Chlorella vulgaris* growth under stably controlled nutrient conditions. *Science of The Total Environment*, 141747.
- Huo, S., Chen, J., Zhu, F., Zou, B., Chen, X., Basheer, S., . . . Qian, J. (2019). Filamentous microalgae *Tribonema* sp. cultivation in the anaerobic/oxic effluents of petrochemical wastewater for evaluating the efficiency of recycling and treatment. *Biochemical Engineering Journal*, 145, 27-32.
- Ibañez, M. (2017). Producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis* y evaluación de posibles aplicaciones.
- Jiménez Tafur, J. D. (2017). Estudio de la producción de biomasa de *Chlorella vulgaris* crecida heterotróficamente sobre vinazas de la caña de azúcar.
- Khalid, A. A. H., Yaakob, Z., Abdullah, S. R. S., & 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.

- Kin-Chung, W., Chi-Chung, L., On-Kit, H., & Ho-Man, Y. (2013). A Study on Algal Growth Behavior under different Sparging Period of CO<sub>2</sub> Supplementation. In Ponencia presentada en 1st International Conference on Beneficial Uses of Algal Biomass, ICBUAB, Hong Kong
- Kim, G. Y., Heo, J., Kim, H. S., & Han, J. I. (2017). Bicarbonate-based cultivation of *Dunaliella salina* for enhancing carbon utilization efficiency. *Bioresource Technology*, *237*, 72-77.
- Konur, O. (Ed.). (2020). Handbook of Algal Science, Technology and Medicine. Academic Press.
- Kothari, R., Prasad, R., Kumar, V., & Singh, D. (2013). Production of biodiesel from microalgae *Chlamydomonas polypyrenoideum* grown on dairy industry wastewater. *Bioresource Technology*, *144*, 499-503.
- Kumar, G., Huy, M., Bakonyi, P., Bélafi-Bakó, K., & Kim, S. H. (2018). Evaluation of gradual adaptation of mixed microalgae consortia cultivation using textile wastewater via fed batch operation. *Biotechnology Reports*, *20*, e00289.
- Kumar, P. K., Krishna, S. V., Verma, K., Pooja, K., Bhagavan, D., & Himabindu, V. (2018). Phycoremediation of sewage wastewater and industrial flue gases for biomass generation from microalgae. *South African Journal of Chemical Engineering*, *25*, 133-146.
- Kumar, P. K., Krishna, S. V., Naidu, S. S., Verma, K., Bhagawan, D., & Himabindu, V. (2019). Biomass production from microalgae *Chlorella* grown in sewage, kitchen wastewater using industrial CO<sub>2</sub> emissions: comparative study. *Carbon Resources Conversion*, *2*(2), 126-133.
- Kumar, V., Muthuraj, M., Palabhanvi, B., Ghoshal, A. K., & Das, D. (2014). High cell density lipid rich cultivation of a novel microalgal isolate *Chlorella sorokiniana* FC6 IITG in a single-stage fed-batch mode under mixotrophic condition. *Bioresource technology*, *170*, 115-124.

- Kuo, C. M., Jian, J. F., Lin, T. H., Chang, Y. B., Wan, X. H., Lai, J. T., ... & Lin, C. S. (2016). Simultaneous microalgal biomass production and CO<sub>2</sub> fixation by cultivating *Chlorella* sp. GD with aquaculture wastewater and boiler flue gas. *Bioresource technology*, *221*, 241-250
- Li, M., Callier, M., Blancheton, J., Galès, A., Nahon, S., Triplet, S., . . . Roque, E. (2019). Bioremediation of fishpond effluent and production of microalgae for an oyster farm in an innovative recirculating integrated multi-trophic aquaculture system. *Aquaculture*, *504*, 314-325.
- Li, S., Zhao, S., Yan, S., Qiu, Y., Song, C., Li, 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.
- Li, Y. R., Tsai, W. T., Hsu, Y. C., Xie, M. Z., & Chen, J. J. (2014). Comparison of autotrophic and mixotrophic cultivation of green microalgal for biodiesel production. *Energy Procedia*, *52*, 371-376.
- Liang, Y., Sarkany, N., & Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology letters*, *31*(7), 1043-1049.
- Liu, Y., Lv, J., Feng, J., Liu, Q., Nan, F., & Xie, S. (2019). Treatment of real aquaculture wastewater from a fishery utilizing phytoremediation with microalgae. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *94*(3), 900-910.
- Lowrey, J., Armenta, R., & Brooks, M. (2016). Nutrient and media recycling in heterotrophic microalgae cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*, 1061–1075.

- Lowry, O. I., Rosebrough, N. J. L. F. A., Farr, A., & Randall, R. J. R. J. (1951). Protein determination by a modified Folin phenol method. *J. biol. Chem*, 193, 265-275.
- Luo, L., He, H., Yang, C., Wen, S., Zeng, G., Wu, M., . . . Lou, W. (2016). Nutrient removal and lipid production by *Coelastrella* sp. in anaerobically and aerobically treated swine wastewater. *Bioresource Technology*, 216, 135-141.
- Ma, Y., Wang, Z., Yu, C., Yin, Y., & Zhou, G. (2014). Evaluation of the potential of 9 *Nannochloropsis* strains for biodiesel production. *Bioresource technology*, 167, 503-509.
- Miao, X., & Wu, Q. (2006). Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource technology*, 97(6), 841-846.
- Mokashi, K., Shetty, V., George, S. A., & Sibi, G. (2016). Sodium bicarbonate as inorganic carbon source for higher biomass and lipid production integrated carbon capture in *Chlorella vulgaris*. *Achievements in the Life Sciences*, 10(1), 111-117.
- Moreno-Garcia, L., Adjallé, K., Barnabé, S., & Raghavan, G. S. V. (2017). Microalgae biomass production for a biorefinery system: recent advances and the way towards sustainability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 76, 493-506.
- Nobre, B. P., Villalobos, F., Barragan, B. E., Oliveira, A. C., Batista, A. P., Marques, P. A. S. S., Mendes, R.L., Sovová, H., Palavra, A.F & Gouveia, L. (2013). A biorefinery from *Nannochloropsis* sp. microalga–extraction of oils and pigments. Production of biohydrogen from the leftover biomass. *Bioresource technology*, 135, 128-136.
- Pancha, I., Chokshi, K., Ghosh, T., Paliwal, C., Maury, R., & Mishra, S. (2015). Bicarbonate supplementation enhanced biofuel production potential as well as nutritional stress mitigation in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology*, 315-323.

- Pandey, A., Lee, D. J., Chang, J. S., Chisti, Y., & Soccol, C. R. (Eds.). (2018). *Biomass, biofuels, biochemicals: biofuels from algae*. Elsevier
- Pena, A. C., Agustini, C. B., Trierweiler, L. F., & Gutterres, M. (2020). Influence of period light on cultivation of microalgae consortium for the treatment of tannery wastewaters from leather finishing stage. *Journal of Cleaner Production*, 121618.
- Pires, J. C. M., Alvim-Ferraz, M. C. M., Martins, F. G., & Simões, M. (2013). Wastewater treatment to enhance the economic viability of microalgae culture. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(8), 5096-5105.
- Putri, F. E., & Hung, T. C. (2020). Comparison of nutrient removal and biomass production between macrophytes and microalgae for treating artificial citrus nursery wastewater. *Journal of Environmental Management*, 110303.
- Ren, L. J., Ji, X. J., Huang, H., Qu, L., Feng, Y., Tong, Q. Q., & Ouyang, P. K. (2010). Development of a stepwise aeration control strategy for efficient docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(5), 1649-1656.
- Rizwan, M., Mujtaba, G., Ahmed, S., Lee, K., & Rashid, N. (2018). Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 92, 394-404.
- Sabri, L., Sultan, A., & Al-Dahhan, M. (2018). Mapping of microalgae culturing via radioactive particle tracking. *Chemical Engineering Science*, 192, 739-758.
- Sathasivam, R., Radhakrishnan, R., Hashem, A., & Elsayed, F. (2017). Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. *Saudi Journal of Biological Sciences*.
- Sathish, A., Glaittli, K., Sims, R. C., & Miller, C. D. (2014). Algae biomass based media for poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) production by *Escherichia coli*. *Journal of Polymers and the Environment*, 22(2), 272-277.

- Shandilya, K. K., & Pattarkine, V. M. (2019). Using Microalgae for Treating Wastewater. In *Advances in Feedstock Conversion Technologies for Alternative Fuels and Bioproducts* (pp. 119-136). Woodhead Publishing
- Silva, C., Gris, B., Sforza, E., La Rocca, N., & Bertucco, A. (2016). Effects of Sodium Bicarbonate on Biomass and Carbohydrate production in *Synechococcus* PCC 7002. *Chemical Engineering Transactions*, 49, 241- 246.
- Slocombe, S. P., Ross, M., Thomas, N., McNeill, S., & Stanley, M. S. (2013). A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass. *Bioresource technology*, 129, 51-57.
- Song, C., Hu, X., Liu, Z., Li, S., & Kitamura, Y. (2020). Combination of brewery wastewater purification and CO<sub>2</sub> fixation with potential value-added ingredients production via different microalgae strains cultivation. *Journal of Cleaner Production*, 122332.
- Song, M., Pei, H., Hu, W., Zhang, S., Ma, G., Han, L., & Ji, Y. (2014). Identification and characterization of a freshwater microalga *Scenedesmus* SDEC-8 for nutrient removal and biodiesel production. *Bioresource technology*, 162, 129-135.
- Soto-Sierra, L., Stoykova, P., & Nikolov, Z. L. (2018). Extraction and fractionation of microalgae-based protein products. *Algal research*, 36, 175-192.
- Srinivasan, R., Mageswari, A., Chandrasekaran, S., Amballa, C., Velmurugan, A., & Kodiveri, M. (2018). Bicarbonate supplementation enhances growth and biochemical composition *Dunaliella salina* V-101 by reducing oxidative stress induced during macronutrient deficit conditions. *Scientific Reports* (6972).
- Statsoft, I. (2004). STATISTICA (data analysis software system), version 7. 2004. Online at: <http://statistica.io>.

- Stillwell, A. S., & Webber, M. E. (2014). Geographic, technologic, and economic analysis of using reclaimed water for thermoelectric power plant cooling. *Environmental science & technology*, 48(8), 4588-4595.
- Suparmaniam, U., Lam, M. K., Uemura, Y., Lim, J. W., Lee, K. T., & Shuit, S. H. (2019). Insights into the microalgae cultivation technology and harvesting process for biofuel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 115, 109361. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109361>
- Talukdar, J., Kalita, M. C., & Goswami, B. C. (2013). Characterization of the biofuel potential of a newly isolated strain of the microalga *Botryococcus braunii* Kützinger from Assam, India. *Bioresource technology*, 149, 268-275.
- Tan, BF, Te, SH, Boo, CY, Gin, KYH y Thompson, JR (2016). Información del borrador del genoma de la subsección V (Stigonematales) cianobacteria *Hapalosiphon* sp. Cepa MRB220 asociada con la producción de 2-MIB. *Estándares en ciencias genómicas*, 11 (1), 58.
- Tejido-Nuñez, Y., Aymerich, E., Sancho, L., & Refardt, D. (2020). Co-cultivation of microalgae in aquaculture water: Interactions, growth and nutrient removal efficiency at laboratory- and pilot-scale. *Algal Research*, 49, 101940.
- Tripathi, R., Gupta, A., & Thakur, I. S. (2019). An integrated approach for phycoremediation of wastewater and sustainable biodiesel production by green microalgae, *Scenedesmus* sp. ISTGA1. *Renewable Energy*, 135, 617-625.
- Wang, B., Li, Y., Wu, N., & Lan, C. Q. (2008). CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. *Applied microbiology and biotechnology*, 79(5), 707-718.

- Wang, C., Yu, X. Q., Lv, H., & Yang, J. (2013). Nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater by the green alga *Chlorella* Sp. *Journal of Environmental Biology*, 34, 421-425.
- Wang, H., Fu, R., & Pei, G. (2012). A study on lipid production of the mixotrophic microalgae *Phaeodactylum tricornutum* on various carbon sources. *African Journal of Microbiology Research*, 6(5), 1041-1047.
- Xu, H., Miao, X., & Wu, Q. (2006). High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of biotechnology*, 126(4), 499-507.
- Zarrouk, C., (1966) Contribution a l'étude d'une cyanobacterie: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima* (Setchell et Gardner) Geitler. PhD thesis, University of Paris, France.
- Zhang, L., Cheng, J., Pei, H., Pan, J., Jiang, L., Hou, Q., & Han, F. (2018). Cultivation of microalgae using anaerobically digested effluent from kitchen waste as a nutrient source for biodiesel production. *Renewable Energy*, 115, 276-287.
- Zhang, Q., Yu, Z., Zhu, L., Ye, T., Zuo, J., Li, X., ... & Jin, S. (2018). Vertical-algal-biofilm enhanced raceway pond for cost-effective wastewater treatment and value-added products production. *Water research*, 139, 144-157.
- Zhuang, L. L., Li, M., & Ngo, H. H. (2020). Non-suspended microalgae cultivation for wastewater refinery and biomass production. *Bioresource Technology*, 123320.