ANÁLISIS DE LA REMOCIÓN DE AMONIO (NH_4) Y FOSFATOS (PO_4) POR UNA CEPA DE MICROALGA FILAMENTOSA DISPUESTA EN UN BIORREACTOR ROTACIONAL DE BIOPELÍCULA FIJA

MIGUEL ANGEL CIFUENTES SILVA

PEDRO ANTONIO RODRÍGUEZ OSPINA

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS

FACULTAD DEL MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES

INGENIERÍA SANITARIA

BOGOTÁ D.C.

2020

ANÁLISIS DE LA REMOCIÓN DE AMONIO (NH_4) Y FOSFATOS (PO_4) POR UNA CEPA DE MICROALGA FILAMENTOSA DISPUESTA EN UN BIORREACTOR ROTACIONAL DE BIOPELÍCULA FIJA

MIGUEL ANGEL CIFUENTES SILVA

PEDRO ANTONIO RODRÍGUEZ OSPINA

Trabajo de grado para optar por el título de Ingeniería Sanitaria

Modalidad: Investigación-Innovación

DIRECTOR: MIGUEL ÁNGEL PIRAGAUTA AGUILAR

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS

FACULTAD DEL MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES

INGENIERÍA SANITARIA

BOGOTÁ D.C.

2020

1. CONTENIDO

1. CONTENIDO 3
2. RESUMEN 7
3. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA 8
4. ESTADO DEL ARTE 11
5. OBJETIVOS 17
   5.1. OBJETIVO GENERAL 17
   5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 17
6. METODOLOGÍA 18
   6.1. DISEÑO EXPERIMENTAL 18
   6.2. PRIMERA ETAPA 18
      6.2.1. Microorganismo y condiciones de cultivo 18
      6.2.2. Determinación de amonio (NH_4^+) y fosfatos (PO_4^-) 19
      6.2.3. Evaluación de la microalga frente a diferentes concentraciones de amonio y fosfatos 20
   6.3. SEGUNDA ETAPA 23
      6.3.1. Diseño del Biorreactor Rotativo de Biopelícula Fija (BRBF) 23
      6.3.2. Esterilización 23
      6.3.3. Formación de biopelícula 24
      6.3.4. Asimilación de amonio y fosfatos en el BRBF 24
7. RESULTADOS 27
   7.1. PRIMERA ETAPA 27
      7.1.1. Microorganismo y condiciones de cultivo 27
      7.1.2. Determinación de amonio y fosfatos 29
      7.1.3. Evaluación de la microalga frente a diferentes concentraciones de amonio y fosfatos 30
   7.2. SEGUNDA ETAPA 36
      7.2.1. Diseño del Biorreactor Rotativo de Biopelícula fija 36
      7.2.2. Formación de biopelícula 39
      7.2.3. Asimilación de amonio y fosfatos en el BRBF 42
8. DISCUSION 47
   8.1. DETERMINACIÓN DE AMONIO (NH_4^+) Y FOSFATO (PO_4^{-3}) 47
      8.1.1. Establecimiento y validación del método 47

8.2. EVALUACIÓN DE MICROALGA FRENTE A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AMONIO Y FOSFATOS 47
8.3. BIORREACTOR ROTATIVO DE BIOPELÍCULA FIJA 49
8.3.1. Análisis de cinética de degradación (K) 49
8.3.2. Proporción N/P 49
8.3.3. Consumo de Fosfatos 49
8.3.4. Remoción de Amonio 53
8.3.5. Análisis de macronutrientes y micronutrientes 54
8.3.6. Contaminación y competición 55
8.3.7. Luz 55
9. CONCLUSIONES 57
10. RECOMENDACIONES 58
11. BIBLIOGRAFÍA 59
12. ANEXOS 64
12.1. ANEXO 1 64
12.2. ANEXO 2 64
12.3. ANEXO 3 64
12.4. ANEXO 4 65

Tabla 1. Composición característica de Aguas Residuales Domésticas. Adaptación de Romero Rojas. _____ *21*
Tabla 2. Matriz de variación de amonio y fosfatos – inóculo 0.2g. _____ *22*
Tabla 3. Análisis de morfología según claves de Komárek (Komárek, 2008) . Elaboración propia. _____ *27*
*Tabla 4. Pérdida de amonio por volatilización.*_____ *30*
*Tabla 5. Resultados: evaluación microalga frente a diferentes concentraciones de amonio y fosfatos. 0.2 g de inóculo.*_____ *31*
*Tabla 6. Resultados: evaluación microalga frente a diferentes concentraciones de amonio y fosfatos. 0.4 g de inóculo.*_____ *31*
Tabla 7. Porcentajes de remoción y tasas de consumo promedio para ensayos con 0.4 g de inóculo en 50 mL de medio. _____ *36*
Tabla 8. Visualización microscópica de biodiscos en 40x. _____ *40*
Tabla 9. Resultados Primer Ensayo. _____ *42*
Tabla 10. Resultados segundo ensayo. _____ *43*
Tabla 11. Resultados tercer ensayo. _____ *44*
*Tabla 12. Resultados cuarto ensayo.*_____ *45*
Tabla 13. Resumen y síntesis de ensayos en el BRBF _____ *46*
Tabla 14. Resultados cinética de degradación en el BRBF _____ *49*
Tabla 15. Curva calibración NH4+: Precisión y exactitud _____ *64*
Tabla 16. Curva calibración PO4-3. Precisión y exactitud. _____ *64*
Tabla 17. Desviación estándar por promedio multiensayo. Análisis de dispersión estadística para ensayos por triplicado. _____ *64*
Tabla 18. Coeficiente de variación de promedio multiensayo. Ensayos Previos por triplicado. _____ *65*

Ilustración 1. Diagramación de la metodología propuesta. 18
Ilustración 2. Ensayos – variación amonio y fosfatos - en agitador orbital. Autores. 22
Ilustración 3. Esterilización UV de BRBF en cámara de flujo laminar. Autores. 23
Ilustración 4. Montaje reactor - cultivo. Autores 28
Ilustración 5. Curva de calibración de fósforo. Ajuste por regresión. R2=0.995 29
Ilustración 6. Curva de calibración de amonio. Ajuste por regresión. 120 µL/10mL. R2=0.995 29
Ilustración 7. Incidencia de biomasa y medio de cultivo sobre consumo de amonio en diferentes concentraciones 32
Ilustración 8. Incidencia de lavado de células, biomasa y medio de cultivo sobre consumo de amonio en diferentes concentraciones 33
Ilustración 9. Incidencia de biomasa y medio de cultivo sobre consumo de fosfatos en diferentes concentraciones 34
Ilustración 10. Incidencia de lavado de células, biomasa y medio de cultivo sobre consumo de fosfatos en diferentes concentraciones. 35
Ilustración 11. Montaje biodiscos. SERINSY 3D. 37
Ilustración 12. Diseño final para impresión. SERINSY 3D. A. Vista perfil BRBF – B. Vista isométrica. 38
Ilustración 13. Diseño final de cubeta. Autores. 38
Ilustración 14. Dimensiones efectivas del BRBF. Autores. A. Vista frontal BRBF-Biodisco – B. Vista isométrica de cubeta. 39
Ilustración 15. Construcción BRBF. Autores. 39
Ilustración 16. Adhesión y crecimiento de MF en el BRBF. Autores. 40
Ilustración 17. Crecimiento celular en biodiscos de BRBF. Autores. 41
Ilustración 18. Primer ensayo: metabolización NH_4^+ y PO_4^- en BRBF. 42
Ilustración 19. Segundo ensayo: metabolización NH_4^+ y PO_4^- en BRBF 43
Ilustración 20. Tercer ensayo: metabolización NH_4^+ y PO_4 en BRBF 44
Ilustración 21. Cuarto ensayo metabolización NH4+ y PO4-3 en BRBF 46
Ilustración 22. Tasas de Consumo de PO_4^{-3} Ensayos 2 - 3 en BRBF 51
Ilustración 23. Comparación de Tasas de Remoción PO_4^{-3} - NH_4^+en Cuarto ensayo en el BRBF 52
Ilustración 24. Formación de las especies amoniaco/amonio como una función del pH (G. Markou, 2011) 54

2. RESUMEN

Las Aguas Residuales (AR) son un producto inevitable de las actividades humanas que, dentro de sus principales constituyentes, poseen importantes concentraciones de Nitrógeno (N) y Fósforo (P) en diferentes formas y especies químicas: orgánicas e inorgánicas; especialmente, de N amoniacal ($N\text{-}NH_4$) y ortofosfatos ($P\text{-}PO_4$). Estos elementos son de interés sanitario-ambiental pues, además de lo que implica su liberación en ecosistemas acuáticos, son de difícil eliminación en sistemas de depuración convencionales. En aguas residuales domésticas crudas la concentración característica de $P\text{-}PO_4$ oscila entre 6 mg/L y 20 mg/L, mientras que la concentración de $N\text{-}NH_4$ está entre 5 mg/L y 30 mg/L. En esta investigación se evaluó la metabolización de $N\text{-}NH_4$ y $P\text{-}PO_4$ por parte de una cepa de Microalga Filamentosa, posiblemente *Phormidium sp.*, dispuesta en un biorreactor rotativo de biopelícula fija (BRBF); los ensayos se mantuvieron a 4,000 lux con fotoperiodos luz/oscuridad 12h/12h, pH neutro y temperatura de 22°C ± 3°C. Se obtuvieron resultados favorables con porcentajes de remoción de 99.056% para $N\text{-}NH_4$ y de 97.448% para $P\text{-}PO_4$, en menos de 48 horas; con tasas de remoción promedio de 23.138 mg $N\text{-}NH_4$/l-d y 15.1514 mg $P\text{-}PO_4$/l-d. Se determinó que la disponibilidad de nitrógeno y fosforo, así como la cantidad de biomasa, inciden proporcionalmente sobre las tasas y porcentajes de remoción de $N\text{-}NH_4$ y $P\text{-}PO_4$.

3. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

A nivel internacional, la gestión integral del agua ha ocupado un lugar de suma importancia en los asuntos prioritarios de agendas nacionales. Agentes gubernamentales, institutos de investigación y comunidad académica y científica en general, suman esfuerzos constantemente de cara a garantizar la cantidad y disponibilidad del agua, y por tanto la vida, en las próximas décadas (World Water Forum, 2018).

Es claro que las dinámicas del agua en su ciclo, responden al nivel de intervención de una cuenca, es decir, los asentamientos humanos o cualquier tipo de intervención antrópica inciden directamente en las dinámicas hídricas de un ecosistema en cuanto a su comportamiento, calidad y disponibilidad (EcuRed, 2018). Las afectaciones sobre el agua se dan de forma directa o indirecta: de forma directa cuando el agua es sometida a algún tipo de uso o aprovechamiento y de forma indirecta cuando, ya sea por alteración de coberturas u obstáculos, se alteran las características del agua en su tránsito al cuerpo de agua más cercano.

No es completamente cierto argumentar un escenario de escasez del agua bajo una premisa de disminución en su volumen; lo que ocurre en varias regiones del mundo, es que la calidad del agua se ha deteriorado de tal modo que se pierde por completo su potencial de uso. Con el agravante de los escenarios climatológicos que ha impuesto el calentamiento global en sus procesos de desertificación (Zarza, 2017).

Se podrían resaltar los esfuerzos realizados por la comunidad internacional en cuanto al cuidado, conservación y preservación del agua. Es un gran avance, pero no es suficiente. Fundamentalmente, porque se formuló la necesidad de frenar el cambio climático como la principal estrategia para el cuidado del agua; y está bien, por supuesto que es necesario, pero no es suficiente. El problema de la preservación y conservación del agua va mucho más allá de lo que físicamente ocurre con ella.

Hay un conjunto de características fisicoquímicas que definen la calidad del agua, y sobre todo, a qué tipo de usos puede ser sometida. La gama de actividades que puede satisfacer un cuerpo de agua dependerá de su grado y tipo de contaminación. Luego, es tan importante depurar las aguas residuales, como intentar frenar el cambio climático y consecuentemente, la desertificación. No basta con evacuarlas, es necesario un proceso que le permita al agua reincorporarse a las mismas u otras actividades que lo requieran.

Según el estudio nacional del agua 2018 (**ENA 2018**) Colombia sólo trata el 42.2% de sus aguas residuales, con el agravante de que ese volumen tratado, no está óptimamente depurado; es decir, en el sector industrial las remociones son de: DBO 54%, DQO 54%, SST 62%, NT 3% y PT 1%, mientras que en el sector doméstico las remociones son de: DBO 19%, DQO 18%, SST 22%, NT 7% y PT 7%. Enormes cantidades de agua se disponen en cuerpos de agua superficial, cuerpos de agua subterráneos y alcantarillado público sin su respectivo tratamiento (IDEAM , 2018). Lo anterior es apenas un ejemplo, pero otras sustancias de naturaleza tanto orgánica como inorgánica son dispuestas de forma irresponsable: metales pesados, fertilizantes, funguicidas, insecticidas, ácidos, solventes orgánicos, bases, oxidantes, entre otras.

Las causas son diversas, y van desde la inexistencia de sistemas de tratamiento de aguas residuales municipales, pues sólo el 48.2% de los municipios cuentan con Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (**PTARs**) (La República , 2018), por hablar de las aguas residuales de origen doméstico; hasta el desinterés del sector industrial así como de las autoridades ambientales competentes para vigilar los vertimientos de dicho sector. Pero más allá de lo expuesto, hay una serie de obstáculos que difícilmente pueden ser superados a corto y mediano plazo, entre ellos, la barrera técnico-económica. Los tratamientos convencionales y más empleados internacionalmente son costosos, tecnificados y de difícil implementación.

Es allí donde interviene la comunidad técnico-científica con soluciones alternativas, pero eficientes, y económicamente viables.

Desde algunas ramas de la ciencia como la biotecnología, se han desarrollado múltiples investigaciones con el fin de dar respuesta a los obstáculos mencionados anteriormente. El uso de organismos para la depuración de aguas residuales avanza de gran manera, y, si bien hacen falta numerosas investigaciones por realizar, se han obtenido resultados importantes y que han podido ser aplicados de forma efectiva.

Uno de los campos emergentes y más prometedores de la biotecnología es el uso de microorganismos fotosintéticos para la depuración de aguas residuales.

Si bien las microalgas han sido ampliamente estudiadas por el uso de sus contenidos intracelulares, últimamente se han potencializado las investigaciones relacionadas al uso de estas en la depuración de aguas residuales. Algunos de los aspectos más relevantes e investigados son: su disposición en el sistema de depuración, producción de biomasa y su respectivo uso postratamiento, y condiciones ambientales óptimas (Wang, y otros, 2018).

Las microalgas mejoran considerablemente la calidad del vertido de aguas residuales: producen gran cantidad de oxígeno, mientras consumen CO_2 y nutrientes minerales, alcanzando concentraciones de oxígeno hasta de 20 mg/L en el efluente. Otra de las ventajas en sistemas de depuración con microalgas es la disminución de volatilización de metano y amoniaco, elementos que favorecen el efecto invernadero y, que regularmente, son emisiones características en sistemas de tratamiento (Amaral, Tratamiento de aguas residuales con microalgas en reactores abiertos, 2016).

Entre muchas sustancias de interés en aguas residuales, el nitrógeno y el fosforo son de gran importancia. Ambos elementos pueden ser encontrados en especies orgánicas e inorgánicas, y por ser un elemento esencial para el crecimiento biológico, su presencia en aguas residuales constituye uno de los principales problemas en la modificación y afectación de ecosistemas acuáticos. Pero es precisamente la condición de nutriente, la que permite que el nitrógeno y el fósforo puedan ser removidos de forma eficaz y controlada por agentes biológicos.

Dentro de las especies químicas más abundantes y, constituyentes característicos de aguas residuales, se encuentran: el amonio (NH_4) y los ortofosfatos (o fósforo soluble) ($-PO_4$) (Rojas J. R., 2016). Tanto la liberación de amonio, como la liberación de fósforo soluble en cuerpos de agua tienen serias implicaciones. El aumento de nitrógeno amoniacal implica una alteración del medio que lo contiene, provocando, entre otras consecuencias, la disminución de oxígeno disuelto en ríos ya que es consumido en los procesos de degradación bacteriana del nitrógeno amoniacal. Provocando, en el peor de los casos, un ambiente completamente anóxico, asimismo, una serie de reacciones químicas y microbianas que dan como resultado la disminución de la calidad del agua, muerte de especies acuáticas, entre otras consecuencias (González L. , 2016). Adicionalmente, el amonio es precursor de nitritos y nitratos (Universidad Nacional del Nordeste, 2010). Cuando la concentración de amonio, e inevitable producción de nitratos, es tan alta, los organismos vegetales no pueden absorber excesos y de este modo, remanentes de nitratos terminan en cuerpos de agua subterránea. Al menos en Colombia, una gran porción de habitantes se abastece directamente de aguas subterráneas sin algún tipo de tratamiento, lo cual configura una importante problemática teniendo en cuenta que el consumo de aguas con concentraciones mayores a 10 mg/L de nitratos provoca una enfermedad llamada metahemoglobinemia (US EPA, 1996).

Por otra parte, si bien los fosfatos no representan una amenaza manifiesta sobre la salud, los compuestos de fósforo son nutrientes de las plantas y conducen al crecimiento de algas en cuerpos de agua superficial. Tan solo 1g fosfato permite el crecimiento de hasta 100g de algas y cuando estas algas mueren, su descomposición demanda alrededor de 150 g de oxígeno. Las concentraciones de fosfatos que facultan la eutrofización van desde 0.1 mg/L (Püts, 2014).

Por todo lo anterior, teniendo en cuenta la importancia de remover fosfatos y amonio de cuerpos de agua, y, el potencial uso de microalgas en sistemas de depuración de aguas residuales, en este trabajo se plantea evaluar la remoción de amonio y fosfatos por parte de una cepa de microalga filamentosa dispuesta en un biorreactor rotativo de biopelícula fija.

4. ESTADO DEL ARTE

Dentro de las múltiples opciones de aproximación que el problema presentado en esta tesis tiene, se decidió abordar la investigación con un procedimiento metodológicamente novedoso en la que las técnicas empleadas no han sido abiertamente utilizadas, hasta ahora. Desde luego, el empleo de cianobacterias está ampliamente descrito con relación al tratamiento de aguas residuales proveniente de múltiples fuentes, además de diferentes procedimientos para comprobar su uso, no obstante**,** la metodología de inmovilización llevada a cabo en el presente trabajo, junto con su correspondiente puesta en marcha, no ha sido descrito en la literatura especializada y propone una nueva manera de emplear este microrganismo filamentoso en el tratamiento de efluentes contaminados con amonio y fosfatos.

La muestra documental recolectada en el presente estado del arte corresponde a los artículos publicados en revistas indexadas cuyo objeto de estudio desarrollado involucró el tratamiento de efluentes contaminados con amonio (entre otras fuentes de nitrógeno), ortofosfatos y/o otros parámetros, teniendo como restricción el uso de *Phormidium sp* en sus ensayos y la cuantificación de los compuestos mencionados, estos términos fueron comunes para todos los artículos en relación a la búsqueda de los mismos. Paralelamente a los términos generales utilizados para la recolección documental, se buscó que los artículos aquí presentados proporcionaran conclusiones alusivas a la utilización del microorganismo *Phormidium sp* como recurso potencial para el tratamiento de agua residual o por el contrario, que estimara su poca conveniencia dependiendo de la metodología utilizada y los resultados obtenidos.

Por otra parte, dentro de las múltiples fuentes bibliográficas disponibles para abordar el tratamiento de aguas residuales mediante el uso de microalgas, fueron seleccionados aquellos artículos con aproximaciones metodológicas similares a las desarrolladas y/o empleadas en este trabajo durante el ejercicio práctico llevado a cabo en el laboratorio, como la medición de amonio mediante la nesslerización de las especies químicas involucradas, o bien durante la comparación y evaluación de resultados obtenidos, con relación al comportamiento esperado del microrganismo.

Los problemas de investigación tratados en los artículos expuestos manifiestan diferentes puntos de vista, metodologías, análisis y conclusiones alrededor de la eficiencia, eficacia y efectividad de varios tipos de microorganismos, por lo cual se procede a mencionar los títulos de los artículos y las dimensiones de aprendizaje que son útiles al desarrollo de este proyecto:

Biotreatment of Anaerobically Digested Swine Manure with Microalgae (Basséres, 1989), comprueba la habilidad de 3 especies de microalgas, *Chorella sp*, *Scenedesmus obliquus* y *Phormidium bohneri,* para agotar el nitrógeno inorgánico y ortofosfato y producir biomasa desde un efluente proveniente de un digestor que contiene estiércol porcino. Los resultados mostraron que la producción de biomasa fue buena para las tres especies (500-700 mg peso seco litro^{-1} después de 12 días), la reducción del amonio ($N\text{-}NH_4^+$) así como la reducción de ortofosfatos ($P\text{-}PO^{3-}_4$) después de un tiempo de ensayo de 12 días, fue mayor al 90% para todas las especies. El ensayo se realizó en condiciones de cultivo batch o semi continuo y se reportaron las condiciones ideales para un tratamiento posterior exitoso,

asignando condiciones de cultivo similares para Phormidium al realizado en este trabajo como lo es la inmovilización del organismo, volumen del ensayo (1 l), condiciones de luz con su correspondiente fotoperiodo 12L-12D, concentraciones de trabajo similares (1.2 – 2.2 mMol $N\text{-}NH_4^+$) y cultivos batch o semicontinuo.

Effect of phosphorus addition on nutrient removal from wastewater with the cyanobacterium *Phormidium bohneri* (G. Laliberté, 1997), evalúa el comportamiento de la microalga para remover nutrientes de aguas residuales domesticas ($N\text{-}NO_3$, $N\text{-}NH_4^+$) con o sin la presencia de fosfato inorgánico añadido. Se comprobó que adicionar fosfato de potasio (K_2HPO_4) tuvo implicaciones en la cantidad de biomasa producida por la cianobacteria (56% adicional) y tuvo influencia sobre la cinética de la remoción de nutrientes inorgánicos, aunque no sobre el tiempo total empleado para la remoción total de estos nutrientes. En todos los casos el nitrógeno (amonio y nitrato), así como el fosfato, fueron completamente removidos después de 50 y 75 h de crecimiento, respectivamente. El ensayo contribuye en los avances en el tratamiento de aguas residuales mediante cianobacterias monoespecíficas al reportar tasas de remoción hasta de 20 mg l^{-1} $día^{-1}$ para amonio y fosfato, indicando así que *Phormidium bohneri* tiene un buen potencial para este fin.

Phormidium treatment of anaerobically treated swine wastewater (R.O. Cañizares-Villanueva, 1994), revela las ventajas de usar un organismo autofloculante como *Phormidium sp.* para el tratamiento de aguas terciarias provenientes de un digestor que contenía estiércol porcino. En este ensayo se evaluó el crecimiento de la microalga así como su capacidad para la remoción de fosforo (P-total), ortofosfatos ($P\text{-}PO^{3-}_4$) , nitratos ($N\text{-}NO_3$) y amonio ($N\text{-}NH_4^+$) en varios tipos de reactores como un tipo carrusel y en cilindros de vidrio. Los resultados obtenidos son promisorios debió a la alta tolerancia que la microalga sostiene a altas concentraciones de amonio, así como los resultados obtenidos en términos de remoción de nutrientes alcanzando 100% de remoción de amonio y ortofosfatos. La metodología presentada en este ensayo es similar a la desarrollada en el transcurso de este trabajo, pues existen referencias en términos de la preparación del inoculo para cultivo y/o cuantificación de resultados, preparación de muestras y en la medición de compuestos inorgánicos.

Biotreatment of fish farm effluents using the cyanobacterium *Phormidium Boneri* (A. Dumas, 1998), estima el potencial de utilización de una especie de Phormidium para el tratamiento de efluentes provenientes de la industria piscícola. Comprueba la eficacia del microorganismo para remover altas cargas nutricionales ($N\text{-}NH_4^+$ y $P\text{-}PO^{3-}_4$) a través del uso de reactores triangulares con iluminación artificial de 5400 lux y aireación/mezcla por aire. En este artículo se estableció que la remoción de nitrógeno amoniacal varió del 73% al 83% durante 28 días de tratamiento, así como la remoción de ortofosfatos que varió de 70% al 85% durante el mismo tiempo de ensayo. Este trabajo contempló el uso de la reacción de Nessler para la detección del ion amonio (APHA, 1989) y del método de ácido ascórbico para la detección de ortofosfatos (APHA, 1989). La discusión de resultados en este artículo plantea explicaciones para el bajo gradiente de pH, la relación de las tasas de crecimiento del organismo con las concentraciones de amonio en el efluente y el tiempo de retención

hidráulico en los reactores, así como las recomendaciones con respecto a la medición de nitrificación para comprobar la acción de bacterias en el proceso de eliminación de amonio.

Tertiary treatment of wastewater with *Phormidium bohneri* (Schmidle) under various light and temperature conditions (P. Talbot, 1993), prueba condiciones de cultivo diferentes mientras se trata agua residual domestica secundaria con el fin de determinar las mejores condiciones ambientales (luz y temperatura) para el desarrollo de *Phormidium bohneri* inherentes a la remoción de nutrientes como amonio y ortofosfatos. En este ensayo se realiza un análisis particularmente específico en relación a las cantidades de luz que percibe el microorganismo y su relación con su tasa de crecimiento. Dicha metodología de análisis fue implementada en el análisis de datos presentados en este ensayo. Además, la determinación de las cantidades perdidas de amonio por volatilización fueron tabuladas en correspondencia con la luz y temperatura de los ensayos, lo cual orienta la naturaleza y el origen de los datos (y su análisis) obtenidos en este trabajo.

Tertiary treatment of cheese factory anaerobic effluent with *Phormidium bohneri* and *Micractinium pusillum* (R. Blier, 1995), compara la habilidad de una microalga y una cianobacteria para remover nutrientes de un efluente terciario proveniente de una fábrica de quesos, específicamente ortofosfatos, amonio, nitritos y nitratos junto con las tasas de crecimiento del microorganismo. La metodología implementada es similar a otros trabajos que involucran el uso de esta especie de Phormidium ya que utilizan la misma metodología para la medición del amonio y para la preparación previa de las muestras a analizar con el fin de eliminar interferencias. En este artículo, los investigadores reportan tasas de remoción de 5.9 $mg*L^{-1}d^{-1}$ para $N\text{-}NH_4^+$ y 2.9 $mg*L^{-1}d^{-1}$ para $P\text{-}PO^{3-}_4$, durante un periodo de 8 días, por *P. bohneri.* Adicionalmente, se realizó el estudio del impacto del pH sobre los resultados reportados, las reacciones químicas posibles de las especies químicas presentes y su repercusión en la remoción de nutrientes. Dichos análisis apoyan la hermenéutica utilizada en las discusiones de datos obtenidas en este trabajo.

Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus* (L. González, 1997), evalúa la eficiencia en la remoción de amonio y fosforo inorgánico por dos especies de microalgas unicelulares extraídas de una laguna de oxidación aireada de una instalación agroindustrial colombiana, en Santa Fé de Bogotá. Las cepas aisladas fueron puestas a prueba en reactores triangulares y cilíndricos que contenían aguas residuales diluidas provenientes de la instalación mencionada anteriormente. Los resultados mostrados son estadísticamente similares a los encontrados por De la Noüe & Proulx, 1988 en términos de eficiencia de remoción (98% $N\text{-}NH_4^+$ y 59% para $P\text{-}PO^{3-}_4$) en un tiempo de ensayo de 216 horas y se establece la relación entre el medio utilizado para el cultivo y las posibles trasformaciones de las especies químicas involucradas debido a procesos metabólicos de los organismos involucrado y/o a las interacciones entre moléculas. El análisis de datos realizado en este artículo establece bases teóricas pertinentes para la discusión de resultados presentados en este ensayo.

Final treatment for cattle manure using immobilized microalgae. I. Study of the support media (L. Travieso, 1995), evalúa la pertinencia de la inmovilización de microalgas como técnica para fomentar la eficacia del tratamiento de aguas residuales terciarias provenientes de un sistema de tratamiento de aguas contaminadas con estiércol porcino a la vez que determina la mejor eficiencia del medio de inmovilización para los microorganismos al realizar dicha tarea. En este artículo se cimentan las bases del uso de soportes de inmovilización rígidos para microalgas (fundamentales en el desarrollo conceptual del presente trabajo), al usar cubos de poliuretano y comprarlos directamente con el alginato de sodio, de uso más extendido; se comprobó que este tipo de medio rígido y su inherente composición química trae beneficios superiores para el tratamiento en general, derivados de un área efectiva de adherencia -y tratamiento- mayor, nula reacción química del soporte con el medio -poliuretano inerte- en las condiciones del ensayo y a la durabilidad del material en ensayos de periodo extendido. En este sentido, el trabajo desarrollado aprovecha los métodos y conclusiones de este artículo en particular para concebir una hipótesis pertinente en el desarrollo conceptual de la técnica de inmovilización al llevar un paso adelante el diseño del soporte y la disposición dentro del tratamiento, así como los materiales y métodos utilizados en su construcción.

Production of the Cyanobacterium Phormidium bohneri in parallel with Epuration of a Dairy Anaerobic Effluent, (R. Blier, G. Laliberté & J. de la Noüe, 1996), examinan la capacidad de producir biomasa aprovechable a partir del tratamiento de un efluente terciario de aguas residuales domésticas con una cepa de *Phormidium*. En este artículo se analizaron nutrientes como $N\text{-}NH_4^+$ por el método de Nessler, $P\text{-}PO^{3-}_4$ y $N\text{-}NO_2$ -NO^- mediante el equipo Technicon II Autoanalyzer. El grado de aprovechamiento de la cianobacteria se establecido por la cuantificación de pigmento (clorofila *a*) y ficobiliproteínas. Por otra parte, el sistema experimental se basa en cultivos tipo batch de 5 litros de diferentes concentraciones de amonio (30, 40, 50 mg/l) en los que se evidenció una tasa de remoción para $N\text{-}NH_4^+$ de hasta 51 d^{-1} y de 33 d^{-1} para ortofosfatos en las condiciones de concentración de $N\text{-}NH_3$ mayores. Las conclusiones apoyan el uso de *P. bohneri* para el tratamiento de aguas residuales terciarias mientras se produce biomasa potencialmente utilizable. La metodología utilizada apoya el procedimiento técnico realizado en este trabajo a través de las dimensiones de investigación desarrolladas por los investigadores e implementadas para el análisis de datos en el presente artículo.

Comparison of nutrient removal capacity and biomass settleability of four high-potencial microalgal species (Y. Su, 2012), compara la eficiencia en la remoción de nutrientes de 3 especies de microalgas y una cianobacteria con el fin de evaluar su potencial de aprovechamiento para el tratamiento de aguas residuales. En este artículo se evaluaron diferentes parámetros relacionados con el sostenimiento de los microrganismos en el medio que los contiene, como OD, pH, $N\text{-}NH_3$, $N\text{-}NO_2$ -NO^-, $P\text{-}PO^{3-}$ y producción de biomasa durante 7 días de ensayo. Para efectos prácticos, la remoción de los nutrientes especificados anteriormente fue del orden del 88.8% - 92.9% para nitrógeno y del 69.5% - 93% de fosforo para *Phormidium sp, C. reinhardtii, C. vulgaris, S. rubecens.* Las conclusiones presentadas en este artículo sitúan el rendimiento de las especies de microalgas verdes unicelulares por

encima la cianobacteria, debido a una mayor capacidad de asentamiento, de remoción de nutrientes y producción de biomasa. Adicionalmente, presentan un análisis detallado con respecto al comportamiento químico de las especies inorgánicas involucradas y su relación con las cambiantes circunstancias ambientales de los medios de cultivo, así como las repercusiones de este escenario con los resultados reportados. Dicho análisis es fundamental dentro del desarrollo del proceso de discusión en el presente trabajo.

Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. (G. Markou, 2011), ofrece una gran cantidad de información recopilada acerca de papel que han interpretado diversos estudios dentro de la biorremediación de aguas residuales con cianobacterias. En este artículo se realiza una revisión exhaustiva de los resultados disponibles en la literatura (más de 160 fuentes) que soportan la teoría de que estos organismos pueden realizar una contribución significativa al tratamiento de aguas agroindustriales, reduciendo considerablemente la cantidad de contaminantes orgánicos e inorgánicos allí presentes mientras se produce biomasa rica en carbohidratos y/o proteínas susceptibles de aprovechamientos posteriores. La recopilación documental presentada en este artículo corresponde a temas como el metabolismo del carbono, el género específico de cianobacterias estudiadas, compatibilidad y competencia y los factores de cultivo, dentro de los cuales se analiza el papel del nitrógeno, fosforo, temperatura y pH, así como los resultados consolidados de las investigaciones realizadas con cianobacterias utilizando el agua residual proveniente de diferentes fuentes (Fabricas de quesos, acuicultura, estiércol porcino, palma de aceite, etc.) como medio de cultivo. La colección de datos expuesta en este artículo es a una gran fuente de información útil para el desarrollo de metodologías novedosas así como para el análisis de datos, que permitan el desarrollo de nuevas técnicas que involucren el uso de cianobacterias para el tratamiento de aguas residuales.

Remoción de urea y amonio por *Spirulina platensis*. (Converti, Convertí, & Lodi, 2005) *"Diferentes concentraciones de cloruro de amonio y urea fueron usados en cultivos estáticos y estáticos alimentados de Spirulina platensis para evaluar la posibilidad de sustituir el nitrato por fuentes de nitrógeno reducidas y más baratas en el biotratamiento de aguas residuales. La máxima concentración de nitrógeno capaz de mantener el crecimiento de esta microalga sin inhibición fue 1.7 mM in ambos casos. El cloruro de amonio fue limitante para el crecimiento en concentraciones más bajas, mientras que la inhibición tuvo lugar a niveles más altos. Este efecto de inhibición fue menos marcado con urea, probablemente porque la hidrolisis enzimática de este compuesto por ureasa controla la transferencia de amonio al interior de la célula. Los experimentos llevados a cabo con cultivos estáticos alimentados probaron que el uso de esos compuestos como fuente de nitrógeno puede sostener el cultivo de S. platensis, siempre que las condiciones para su alimentación se optimicen con precisión".*

Cultivos discontinuos alimentados con urea de la cianobacteria *Phormidium sp.* en función de la salinidad y edad del cultivo. (Jonte, Rosales Loaiza, Bermudez Gonzalez, & Morales , 2013) *"Se comparó la eficiencia de sistemas de cultivos discontinuos alimentados versus cultivos discontinuos convencionales, en cuanto a concentración de nitrógeno,*

adicionando 0,2 mM de urea cada tres días al final de la fase exponencial, durante 21 días. Phormidium sp. posee la capacidad de hidrolizar la urea; mostrando una asimilación de 65±7,07% de la misma. Estos resultados determinan que los cultivos de Phormidium sp. alimentados con urea y a salinidades de 15 y 35 UPS, representan una alternativa económica para la producción de clorofila a, ficocianina y proteínas, incrementándose un 31,04; 40,72 y 31,94 % respectivamente en comparación con cultivos no alimentados".

Remoción de nitrógeno, fósforo y producción de biomasa de *Scenedesmus sp*. en agua residual doméstica. (Acevedo , Pino , & Peñuela , 2017) *"En este estudio se aisló una microalga a partir de aguas naturales y fue identificada como Scenedesmus sp. Se realizó un diseño experimental usando agua residual sintética con diferentes concentraciones de nitrógeno (40, 90 y 150 mg / L), fósforo (4, 15 y 50 mg / L) y la microalga aislada. Cada ensayo se inoculó con 1x106 células/ml bajo 16 horas de iluminación a 50-µmol m-2 s-1 por 7 días a 120 rpm. Se tomaron muestras a 0, 3, 5 y 7 días para determinar el crecimiento de microalgas y la concentración de nitratos, amonio y fósforo. El mismo tratamiento se realizó utilizando agua residual domestica real. Las aguas sintéticas de baja y media concentración tuvieron mayores porcentajes de remoción, entre 50-60% para el nitrógeno y 40-70% para el fósforo, con un crecimiento máximo de 1x107 células/ml. En el agua residual real, la remoción fue del 65% para el fósforo y el 80% para el nitrógeno. Estos resultados sugieren Scenedesmus sp podría ser utilizada para tratar agua residual doméstica, mejorando la eliminación de nutrientes y obteniendo biomasa para otros fines".*

Tratamiento de aguas residuales con microalgas en reactores abiertos. (Amaral, Tratamiento de aguas residuales con microalgas en reactores abiertos., 2011) *"A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que los consorcios de microalgas y bacterias son eficientes para el tratamiento de aguas residuales, permitiendo eliminar de dichos efluentes no solo la materia orgánica presente (DQO), si no recuperar el nitrógeno y el fósforo presente en dichos efluentes en forma de biomasa susceptible de ser valorizada. La tecnología y condiciones de operación deben ser adecuadamente seleccionadas en función del tipo de agua residual a depurar, y ajustadas en función de la época del año para un óptimo funcionamiento. Sistemas basados en microalgas pueden emplearse para el tratamiento terciario de aguas residuales, eliminando de dichos efluentes el nitrógeno y fosforo residual procedente del tratamiento convencional. Para la producción de microalgas este efluente presenta una limitación de nutrientes como lo demuestra el hecho de que la productividad de biomasa alcanzada con el medio de cultivo con fertilizantes sea mayor que la alcanzada con el agua residual secundaria. En todo caso el agua secundaria utilizada queda adecuadamente depurada ya que el contenido en materia orgánica, nitrógeno y fósforo disminuye hasta los límites del vertido".*

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la capacidad de una cepa de Microalga Filamentosa (**MF**) dispuesta en un biorreactor rotativo de biopelícula fija (**BRBF**) para remover fosfatos y amonio.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar las condiciones fisicoquímicas y ambientales que optimicen las tasas de remoción de fosfatos y amonio.
- Diseñar y construir un BRBF que proporcione a la cepa de MF condiciones óptimas para metabolizar fosfatos y amonio.
- Evaluar el consumo de fosfatos y amonio por parte de MF dispuesta en el BRBF.

6. METODOLOGÍA

6.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Esta investigación es de tipo descriptiva, ya que su objetivo no se limitó a la recolección de datos, sino a la predicción e identificación de las relaciones que existen entre dos o más variables (noemagico, 2006).

Los ensayos de calibración y validación de métodos, así como aquellos que determinaron las fuentes y respectivas concentraciones de amonio y fosfatos, fueron analizados con medidas estadísticas de dispersión, precisión y exactitud, con el fin de brindar mayor confiabilidad a los resultados reportados.

La investigación se llevó a cabo en dos etapas. En la primera etapa, denominada *Evaluación de fuente de amonio y fosfatos*, se desarrollaron una serie de ensayos encaminados a determinar las condiciones fisicoquímicas y ambientales óptimas para el crecimiento de MF frente al amonio y fosfatos en los medios de cultivo.

En la segunda etapa, denominada *Evaluación de asimilación de amonio y fosfatos en el BRBF*, las fuentes de amonio y fósforo escogidas, así como las condiciones fisicoquímicas y ambientales, son evaluadas en el Biorreactor Rotativo de Biopelícula Fija (BRBF) en 4 ensayos separados y secuenciales.

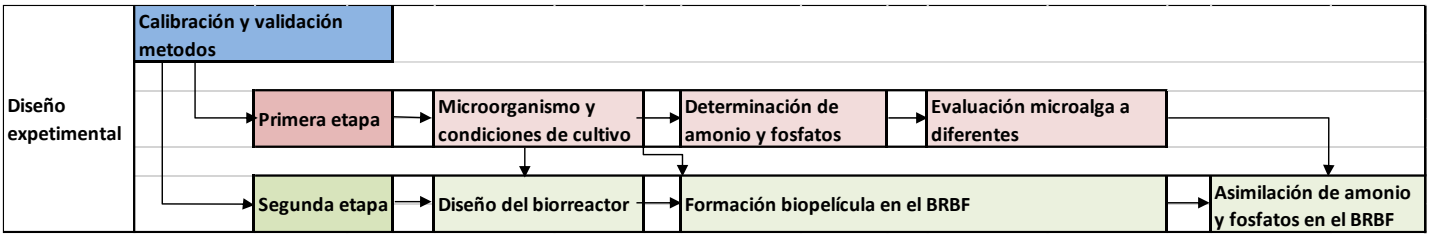


Ilustración 1. Diagramación de la metodología propuesta.

6.2. PRIMERA ETAPA

6.2.1. Microorganismo y condiciones de cultivo

La cepa de MF usada en esta investigación fue encontrada en agua contaminada con residuos petroleros en la ciudad de Yopal, Casanare; la cual fue recuperada, aislada y donada por el docente director Miguel Ángel Piragauta, adscrito y coordinador del laboratorio de microbiología de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas. La cianobacteria se recuperó en medio BG11 (UTEX, 2009) para esta investigación, cuya composición es descrita en la ***Tabla 1***.

Tabla 1. Composición medio BG11 (UTEX, 2009)

COMPOSICIÓN MEDIO BG11			
Componente	**Concentración stock**	**solución**	**Cantidad (mL/L)**
$NaNO_3$	30g	200 mL	10 mL

K_2HPO_4	0.8g	200 mL	10 mL
$MgSO_4$ - 7 H_2O	1.5g	200 mL	10 mL
$CaCl_2$ - 2 H_2O	0.72g	200 mL	10 mL
Ácido Citrico - H_2O	0.12g	200 mL	10 mL
Citrato Férrico de Amonio	0.12g	200 mL	10 mL
EDTA - 2 H_2O	0.02g	200 mL	10 mL
Na_2CO_3	0.4g	200 mL	10 mL
$Na_2S_2O_3$	49.6g	200 mL	10 mL
Solución metales traza		200 mL	1 mL
Preparación solución metales traza			
H_3BO_3	2.86	g/L	
$MnCl_2$ – 4 H_2O	1.81	g/L	
$ZnSO_4$ – 7 H_2O	0.22	g/L	
Na_2MoO_4 – 2 H_2O	0.39	g/L	
$CuSO_4$ – 5 H_2O	0.079	g/L	
$Co(NO_3)_2$ – 6 H_2O	0.049	g/L	

6.2.1.1. Caracterización de la cepa de microalga

Para la identificación de la cepa se utilizó la información conjunta proveniente de tres procedimientos: **1.** Identificación a cargo de académico especialista en ficología. **2.** Observación microscópica del microorganismo de acuerdo con las descripciones de las cianobacterias en la literatura. **3.** Concatenación de las observaciones del procedimiento anterior con los análisis de morfología según las claves de Komárek (Komárek, 2008).

6.2.1.2. Producción de biomasa

Para producir toda la biomasa empleada en los ensayos de esta investigación se utilizó el medio BG-11 (UTEX, 2009) en frascos de vidrio autoclavables de 3,000 mL. Los cultivos se mantuvieron a 22 ±3°C, aireación constante con inyección de aire y difusión por motor de pecera, iluminación unilateral de 3,200 lux con ciclos 12h/12h, con un volumen de 2.5 L de medio en cada frasco.

El crecimiento del organismo disuelto se monitoreó e incorporó mediante concentración celular. Las muestras eran centrifugadas a 1,800 rpm durante 4 minutos, para finalmente ser resuspendidas en el medio deseado. Los reactores eran iniciados con una concentración de 1.0g de biomasa por cada litro de medio (1g biomasa * $1L^{-1}$) y se renovaban o diluían según requerimientos experimentales.

6.2.2. Determinación de amonio (NH_4^+) y fosfatos (PO_4^-)

Se emplearon técnicas colorimétricas para la determinación de amonio y fosfatos. Para la selección de la longitud de onda se compararon estadísticamente los valores de absorbancia obtenidos en los filtros 400 y 425 nm del espectrofotómetro mediante una prueba de barrido para cada uno de los analitos en presencia de los reactivos de Nessler (VWR, s.f.)y Vanadato-

Molibdato (RVM) (MERCK, s.f.). El tiempo de reacción del ensayo se evaluó para 2, 5 y 8 min a temperatura ambiente (20-22 ºC).

Los métodos fueron validados a partir de la *Especificidad*, *Linealidad y rango del sistema*, *límite de cuantificación*, *Precisión y exactitud*.

Especificidad. Para evaluar la capacidad de los reactivos empleados para detectar y definir la especie química deseada, se realizaron pruebas con diluciones y muestras *blanco* con BG11 y agua. Las curvas de calibración se hicieron entre 0 mg/L y 35 mg/L, para fosfatos y entre 0 mg/L y 50 mg/L, para amonio; para cada una de las curvas se elaboraron dos tipos de *blanco*: uno con agua destilada y otro con BG11.

Linealidad y límite de detección. Se estableció un R^2 mínimo de 0.95 para aceptar los resultados de curvas de calibración. El límite de cuantificación es la mínima cantidad del analito medible. Para efectos prácticos, se adoptó el valor reportado en la literatura para la reacción de Nessler (identificación de N-NH_4^+) de 0,3 µg de NH_4^+. (Vogel, 1953); de igual manera, para la cuantificación de fosfatos, el RVM tiene una sensibilidad de 0 - 45,0 mg/l de P-PO_4^{-3} (HACH COMPANY, 2000).

Precisión. Se determinó la precisión mediante el cálculo del coeficiente de variación (CV) expresado en puntos porcentuales. Se consideró como criterio de aceptación para la repetibilidad, un CV menor o igual al 5% (Estrada , y otros, 2015).

Exactitud. Se fijo como criterio de aceptación una exactitud de 100 ± 10%. Previo cada ensayo, las muestras fueron centrifugadas a 4000 rpm con el fin de eliminar interferencias provocadas por sólidos y células disueltas en suspensión.

6.2.2.1. Determinación de amonio

Para la evaluación de amonio por métodos colorimétricos, se realizó una curva de calibración a partir de soluciones patrón de hidróxido de amonio (NH_4OH). Se estandarizó la adición de 120 µL de reactivo de Nessler por cada 10 mL de muestra y las lecturas se realizaban a 425 nm.

6.2.2.2. Determinación de fosfatos

Para la evaluación de fosfatos por métodos colorimétricos, se realizó una curva de calibración a partir de soluciones patrón de fosfato sódico (Na_2HPO_4). Se preparaban 25 mL de la siguiente manera: 12.5 mL de muestra, 7.5 mL agua destilada, 5 mL RVM; las lecturas se realizaban a 420 nm.

6.2.3. Evaluación de la microalga frente a diferentes concentraciones de amonio y fosfatos

6.2.3.1. Análisis de evaporación de amonio

Con el fin de minimizar posibles interferencias en el análisis de asimilación de amonio por parte de MF, se realizaron ensayos para analizar su volatilización. Para esto, se realizaron ensayos por triplicado en frascos de 50 mL con modificaciones de medio BG11 (siguiendo

la *Tabla 2*), agitación orbital a 125 RPM, durante 7 días sin fuente de luz adicional a la horaria y temperatura de 22°C. Se realizaron mediciones de amonio al inicio y final del ensayo. Las pérdidas se reportaron en porcentaje de NH_4^+.

Tabla 2. Matriz de ensayos para volatilización de N-NH_4^+.

ID	Medio	Adición		Volumen
		NH_4^+ (mg/L)	PO_4^{-3} (mg/L)	(mL)
1	BG11-NP	20	5	50
2	BG11-NP	30	15	50
3	BG11-NP	40	25	50
4	BG11	20	5	50
5	BG11	30	15	50
4	BG11	40	25	50
BG11-NP: **BG11 sin $NaNO_3$ y K_2HPO_4.**				

6.2.3.2. Variación de amonio y fosfatos

Para el análisis de amonio se empleó hidróxido de amonio (NH_4OH) a concentraciones de 20 mg/L, 30 mg/L y 40 mg/L; y el análisis de fosfatos se realizó con fosfato disódico (Na_2HPO_4) a concentraciones de 5 mg/L, 15 mg/L, 25 mg/L. Las concentraciones son escogidas con base en la composición característica de aguas residuales domésticas (Rojas J. A., 2016):

Tabla 1. Composición característica de Aguas Residuales Domésticas. Adaptación de Romero Rojas.

Fuente	**Composición típica de las ARD (Metcalf & Eddy, 1979).**	**Composición aproximada de un ARD (HAMMER, 1977).**
Parámetro	Concentración (mg/L)	Concentración (mg/L)
Sólidos totales	720	800
Sólidos suspendidos	220	240
Sólidos suspendidos volátiles	165	180
DBO	220	200
Nitrógeno amoniacal	25	30
Ortofosfatos	5	10

Para llevar a cabo los análisis, se realizaron ensayos a escala por triplicado en frascos con capacidad de 100 mL, agitación orbital a 125 RPM, luz horaria y temperatura de 22 °C durante 7 días. El inóculo inicial para todos los ensayos fue de 0.2 g de biomasa por cada 50 mL de medio, es decir, 0.004 g/mL=4mg/mL. El pH era monitoreado cada tercer día de ensayo.

Se evaluó la asimilación de amonio y fosfatos a partir de la sustitución de las fuentes de nitrógeno y fósforo en el medio BG11, es decir, el nitrato de sodio ($NaNO_3$) fue sustituido por NH_4OH y el K_2HPO_4 fue sustituido por el Na_2HPO_4.

Adicionalmente, se probó el efecto de lavado en las células. Una comparación entre la capacidad de remoción de las sustancias por parte de las células sin lavar y aquellas que contaban con protocolo de lavado; dicha matriz de ensayos se muestra en la *Tabla 4*. La concentración de amonio y fosfato en cada frasco se monitoreaba cada 24 horas, mientras que la biomasa solo se determina al inicio y final del ensayo.

Los ensayos fueron realizados en frascos de 100 mL con 50 mL de medio y concentraciones celulares de 4 mg/mL y 8 mg/mL.



Ilustración 2. Ensayos – variación amonio y fosfatos - en agitador orbital. Autores.

Tabla 2. Matriz de variación de amonio y fosfatos – inóculo 0.2g.

ID	Medio	Adición	
		NH_4^+ (mg/L)	PO_4^{-3} (mg/L)
1	BG11-NP	20	5
2	BG11-NP	30	15
3	BG11-NP	40	25
4	BG11	20	5
5	BG11	30	15
6	BG11	40	25
7	BG11	0	0
1L	BG11-NP	20	5
2L	BG11-NP	30	15
3L	BG11-NP	40	25
4L	BG11	20	5
5L	BG11	30	15
6L	BG11	40	25
7L	BG11	0	0
BG11-NP: BG11 sin $NaNO_3$ y K_2HPO_4. **L:** Ensayos con Protocolo de Lavado de células.			

Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado, con y sin lavado de células. Se evaluó: concentraciones de trabajo y el lavado de células e incidencia de biomasa inoculada sobre la capacidad de asimilación. Para un total de 84 ensayos.

El resultado de estos ensayos determinó las concentraciones mínimas, máximas y óptimas de trabajo para el BRBF, la relación entre biomasa y tasa de asimilación y la influencia de $NaNO_3$ y Na_2HPO_4 en la metabolización de amonio y fosfatos.

6.2.3.3. Lavado de células

Se diseñó y estandarizó un protocolo de lavado que consistía en centrifugar 10 mL de matriz acuosa con algas disueltas en tubos tipo Falcon a 1800 rpm durante 4 minutos; eliminar sobrenadante y adicionar 10 mL de solución salina (NaCl) al 0.9%; centrifugar nuevamente a 1800 rpm durante 4 minutos, eliminar sobrenadante. Repetir 3 veces.

Como se mencionó anteriormente, los ensayos a los cuales se aplicaba protocolo de lavado, tenían el objetivo de determinar la incidencia del nitrato de sodio y fosfato dipotásico en la asimilación de amonio y fosfatos.

6.3. SEGUNDA ETAPA

6.3.1. Diseño del Biorreactor Rotativo de Biopelícula Fija (BRBF)

Se diseñó y construyó el BRBF en un proceso de tres fases:

1) **Predimensionamiento:** Realización de diseños preliminares. Se establecieron criterios de diseño, partes, dimensiones, funcionamiento y observaciones para el diseño final.
2) **Elaboración:** Elaboración del diseño final con base en las aseveraciones concebidas en el Pre-dimensionamiento. Se definió la técnica de construcción, materiales proveedores y fabricantes. Se construyó el modelo a escala real.
3) **Ensamblaje y puesta en marcha:** Se ensamblaron todas las partes y los elementos construidos en la fase anterior y se comprobó el funcionamiento del BRBF. Es posible que el material y/o la técnica de construcción utilizada no sea compatible con los métodos de esterilización estándar, por lo cual en esta fase se diseña el protocolo de esterilización a implementar.

6.3.2. Esterilización

Para el caso específico del BRBF, se diseñó un protocolo de esterilización que consta de lo siguiente: tres ciclos de lavado con hipoclorito de sodio al 13%, limpieza atomizada con ácido acético al 10%, enjuague con agua desionizada estéril y radiación UV en cámara de flujo laminar durante una hora (Ver *Ilustración 2*).

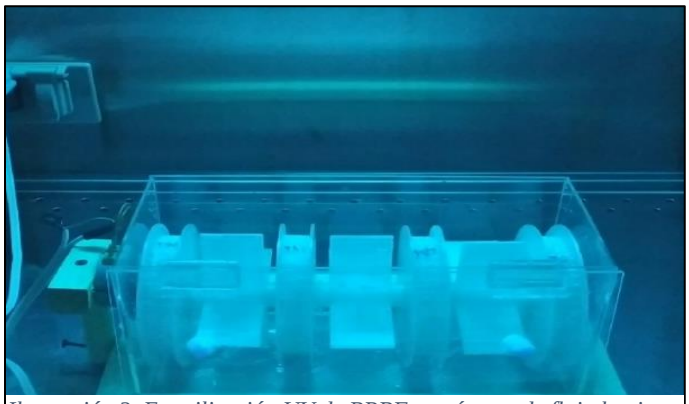


Ilustración 3. Esterilización UV de BRBF en cámara de flujo laminar. Autores.

6.3.3. Formación de biopelícula

Para el crecimiento y adhesión del organismo en los discos del BRBF se puso en marcha el reactor con cultivos de MF en suspensión. Este crecimiento se dio en 2.2 litros de medio BG11 proveniente de un reactor utilizado en la producción de biomasa con una edad de cultivo de 14 días a 22 ±3°C, 4000 Lux (medidos en la superficie exterior de la tapa superior del biorreactor), velocidad de rotación de 6 RPM y sumergencia de 45% para cada biodisco durante 15 días. El medio se renovaba cada 4 días. El monitoreo del crecimiento de MF en los biodiscos se realizó por microscopía: Visualización de los biodiscos a través del lente objetivo de 40x.

6.3.4. Asimilación de amonio y fosfatos en el BRBF

Como aproximación a las condiciones reales que asumiría el BRBF en el tratamiento de aguas residuales domésticas y el sobrecosto que implicaría añadir $NaNO_3$, se seleccionó el medio BG11-NP con las concentraciones de NH_4^+ y PO_4^{-3} más altas, 40 mg/L y 25 mg/L respectivamente, en un volumen de 2.2 litros a una temperatura de 22 ±3°C, 4000 Lux (medidos en la superficie exterior de la tapa superior del biorreactor), velocidad de rotación de 6 RPM y sumergencia de 45% de los biodiscos, para todos los ensayos.

Para la evaluación de la remoción de dichas especies químicas en el BRBF construido, se diseñaron 4 ensayos consecutivos encaminados a evaluar el comportamiento de MF dispuesta en los biodiscos. Teniendo en cuenta que, tanto el modelo de reactor como la disposición de los biodiscos, en cuanto a la técnica y materiales de construcción, no cuenta con suficientes precedentes bibliográficos, los cuatro ensayos propuestos dependían del análisis de resultados hecho en la finalización de cada uno de éstos. Es decir, el *Primer ensayo* dependía de los resultados obtenidos en la *PRIMERA ETAPA;* el *Segundo ensayo* dependía de los resultados obtenidos en el *Primer ensayo;* el *Tercer ensayo* dependía de los resultados obtenidos en el *Segundo ensayo*; y el *Cuarto ensayo* dependía de la correlación y análisis hecho de los tres ensayos previos.

6.3.4.1. Constante cinética de degradación (K^{-1})

La cinética de degradación se considera una reacción de primer orden y puede representarse como:

$$C = C_0 e^{-Kt}$$

Donde:

C= Concentración final en mg/L

C_0= Concentración inicial en mg/L

K= Constante de degradación del sustrato en d^{-1}

t= Tiempo de degradación en días

Para cada uno de los intervalos en los cuales se evalúa la cinética del sustrato, se reordena la expresión de la siguiente manera, para la calcular la constante de degradación en función de la concentración y el tiempo:

$$K = \frac{1}{t} * \ln\left(\frac{C}{C_0}\right)$$

La constante de cada ensayo corresponde al promedio de las constantes en cada uno de los intervalos analizados por ensayo.

6.3.4.2. Primer ensayo en el BRBF

Este ensayo evaluó la capacidad de asimilación por parte de MF de NH_4^+ y PO_4^{-3} con células provenientes de un medio N-suficiente[1]: BG11 (N/P: 60:1), en un medio N-insuficiente: BG11-NP (N/P: 3.875:1). El ensayo comenzó inmediatamente después de la finalización del proceso de formación de biopelícula en los biodiscos.

Para iniciar el ensayo, se eliminó el contenido que promovía el crecimiento y adhesión de MF en los biodiscos, seguido de limpieza en paredes y exteriores de la cubeta que contienen el reactor. Se añadió el medio seleccionado con las condiciones descritas en el punto **6.3.4**. y se midió la concentración de amonio, fosfato y pH al inicio y final del ensayo.

Transcurrido el tiempo de ensayo, se vació el contenido liquido del BRBF, se limpiaron las paredes y se procedió al pesaje del mismo.

6.3.4.3. Segundo ensayo en el BRBF

Este ensayo evalúa la capacidad de asimilación por parte de MF de NH_4^+ y PO_4^{-3} con células provenientes de un medio N-insuficiente: BG11-NP (N/P: 3.875:1), en un medio N-insuficiente: BG11-NP (N/P: 3.875:1), durante un periodo extendido de 24 horas. El ensayo comenzó inmediatamente después de la finalización del *Primer ensayo*.

Se eliminó el medio en el cual se desarrolló el *Primer ensayo* y se añadió el medio seleccionado en las condiciones descritas en el punto **6.3.4.** y se midió la concentración de amonio y fosfato en intervalos de 2 horas y pH al inicio y final del ensayo.

Transcurrido el tiempo de ensayo, se vació el contenido liquido del BRBF, se limpiaron las paredes y se procedió al pesaje del mismo.

6.3.4.4. Tercer ensayo en el BRBF

Este ensayo evalúa la capacidad de asimilación por parte de MF de $N\text{-}NH_4^+$ y $P\text{-}PO_4^{-3}$ con células provenientes de un medio N-insuficiente: BG11-NP (3.875:1) en un medio N-insuficiente: BG11-NP (3.875:1) durante un periodo extendido de 30 horas. Este ensayo se diseñó para encontrar los intervalos de tiempo a los cuales se obtienen Tasas de Remoción

[1] N-suficiente: medio con relación N/P mayor o igual a 16:1. (Gardner-Dale. D.A., 2017)

nulas (TR ≈ 0), como modelo del peor caso. El ensayo comenzó inmediatamente después de la finalización del *Segundo ensayo*.

Se añadió el medio seleccionado en las condiciones descritas en el punto **6.3.4.** y se midió la concentración de amonio y fosfato en intervalos de 1 hora y pH al inicio y final del ensayo.

Transcurrido el tiempo de ensayo, se vació el contenido liquido del BRBF, se limpiaron las paredes y se procedió al pesaje del mismo.

6.3.4.5. Cuarto ensayo en el BRBF

Este ensayo evaluó la capacidad de asimilación por parte de MF de $N\text{-}NH_4^+$ y $P\text{-}PO_4^{-3}$ con células provenientes de un medio N-suficiente: BG-11 (N/P: 60:1) en un medio N-insuficiente: BG11-NP (3.875:1), durante un periodo extendido de 35 horas. Este ensayo se diseñó para estimar la recuperación de MF en los biodiscos en términos de la obtención de valores de tasas remoción similares a los alcanzados en el *Primer ensayo*. El ensayo comenzó 24 horas después de la finalización del *Tercer ensayo*.

Este ensayo inició por el vaciado del medio que previamente contenía el BRBF con el *Tercer ensayo*, seguido de una limpieza de las paredes internas del biorreactor con el fin de remover las células de MF adheridas a las mismas. Se añadió medio BG-11 y se puso en marcha en biorreactor. Transcurridas 24 horas, se vació el medio del BRBF, se realizó una limpieza de las paredes internas del biorreactor y se procedió al pesaje del mismo.

Seguidamente, se añadió el medio seleccionado en las condiciones descritas en el punto **6.3.4.** y se midió la concentración de amonio y fosfato en intervalos de 1 hora y pH al inicio y final del ensayo.

Transcurrido el tiempo de ensayo, se vació el contenido liquido del BRBF, se limpiaron las paredes y se procedió al pesaje del biorreactor.

7. RESULTADOS

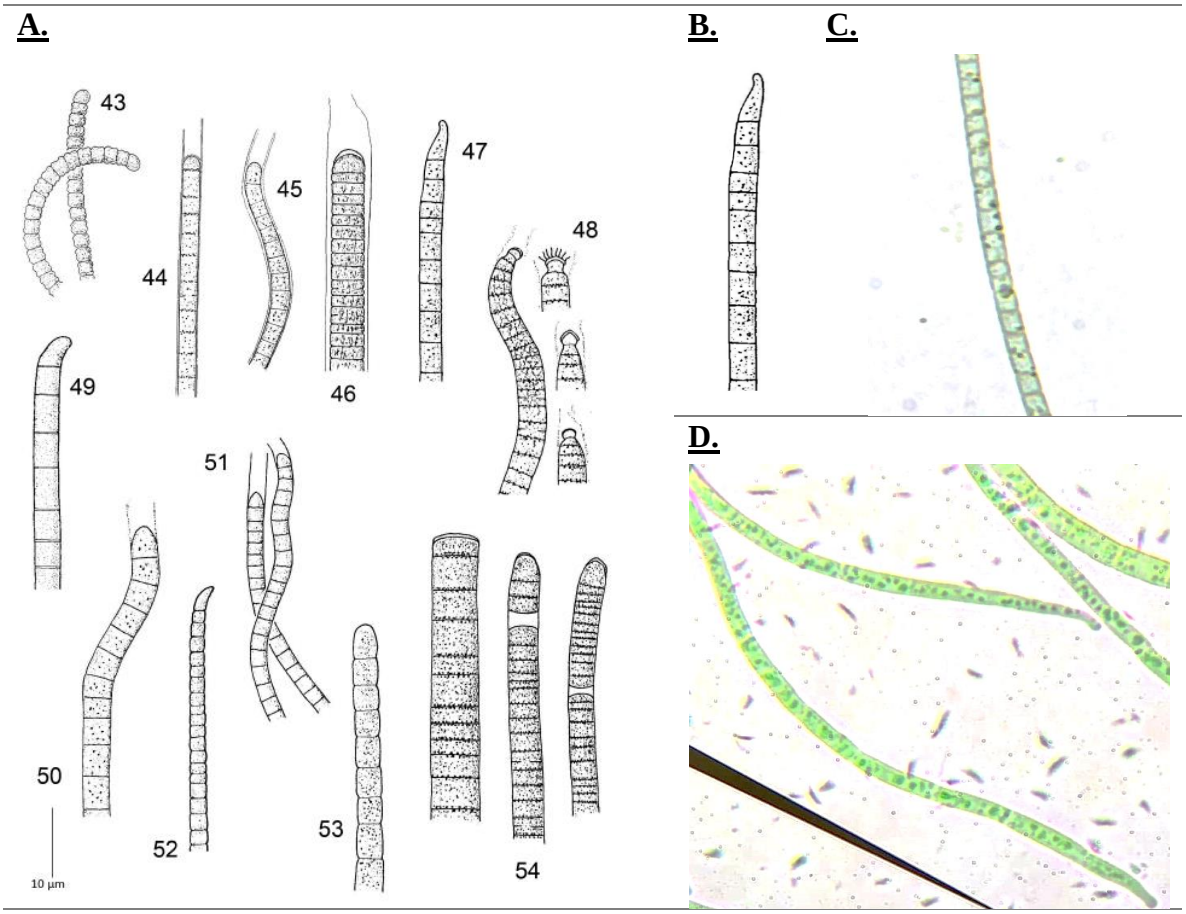
7.1. PRIMERA ETAPA

7.1.1. Microorganismo y condiciones de cultivo

7.1.1.1. Caracterización de la cepa de microalga

Se emplearon claves morfológicas para deducir que se trata de una cepa de *Phormidium sp.* (Komárek, 2008). La identificación fue realizada por el Ph.D Luis Carlos Montenegro, investigador adscrito al Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia. Las descripciones proporcionadas por Komárek para el género *Phormidium*, e interpretadas por el Dr. Montenegro, permiten asociar la cepa de MF a dicho género (***Tabla 3***).

Tabla 3. Análisis de morfología según claves de Komárek (Komárek, 2008) . Elaboración propia.



A. 43-54 Cyanoprokaryota. Oscillatories. 43. *Komvophoron minutum.* 44. *Phormidium aerugineo.* 45. *P. allorgel.* 46. *P. ambiguum.* 47. *P. animale.* 48. *P. autumnale.* 49. *P. chlorinum.* 50. *P. corium.* 51. *P. diguetii.* 52. *P. formosum.* 53. *P. hamelii.* 54. *P. irrigum.* **B.** *Phormidium animale.* **C.** Fotografía de **MF**. 100x. Filamento medio. Autores. **D.** Fotografía de MF. 100x. Terminal filamento. Autores.

En general, el género *Phormidium* se caracteriza por tener: "*filamentos uniseriados, rara vez solitarios, macro y microscópicos estratificados, suaves, finos, como fieltros o películas, que cubren sustratos de naturaleza diversa; vaina con desarrollo facultativo, tubular, firme,*

incolora, unida a los tricomas, no estratificada, abierta en los polos, con 1 tricoma por vaina; tricomas isopolares, ligeramente rectos, curvos, enroscados u ondulantes, nunca ramificados, móviles (por ondulaciones, oscilaciones o temblores). Células cilíndricas o en forma de barril, ligeramente isodiamétricas; contenido celular granuloso o gránulos prominentes en los septos o en toda la célula; las apicales, redondeadas, atenuadas o puntiagudas, en ocasiones con caliptra; contenido celular verde azul, rara vez pardusco. División celular transversal, perpendicular al eje principal del filamento, las células hijas crecen hasta su tamaño original antes de la siguiente división; multiplicación por hormogonios que se separan de la parte terminal del tricoma por la presencia de necridios o por fragmentación completa del tricoma" (Komárek, 2008).

En la *Tabla 3* se asocian las fotografías con algunas características principales y apreciables en análisis de microscopia. En la Imagen **B** se observa *Phormidium animale*; en la Imagen **D** se observa una fotografía al microscopio de MF en 100x; en la Imagen **C** se observa una fotografía al microscopio de un filamento medio de MF en 100x. Se puede apreciar en las tres imágenes, algunos elementos característicos en común: filamentos uniseriados, rara vez solitarios y estratificados; células cilíndricas en forma de barril; contenido celular granuloso; células terminales redondeadas puntiagudas. Adicionalmente, algunas observaciones de montajes húmedos en 4x y 10x, permitían observar movimientos oscilatorios; así como algunos cultivos en caja de Petri con agar BG11, dejaban observar filamentos enroscados.

7.1.1.2. Producción de biomasa

Debido al número de ensayos realizados, así como el tipo de reactor escogido, fue necesario mantener continuamente reactores alternos de este tipo para la producción de biomasa.

La producción que se obtuvo fue suficiente para cumplir con los requerimientos de biomasa en cada uno de los ensayos realizados en esta investigación, a través de la metodología planteada. Como muestra, se incluye una fotografía de uno de los biorreactores, en la que se evidencia la densidad celular que alcanzaron los cultivos. (*Ilustración 3).*



Ilustración 4. Montaje reactor - cultivo. Autores

Por otra parte, las condiciones de cultivo proporcionadas favorecieron la reducción de la capacidad autofloculante de MF de manera considerable por lo que se disminuyó formación de biopelícula en el biorreactor y de flóculos en el fondo del mismo. Como resultado de lo anterior, se obtuvieron medios ricos en biomasa planctónica (filamentos separados) y un aumento de la vida media del cultivo al reducir la posibilidad de asentamiento de grandes porciones de biomasa que pudieran volverse susceptibles a encontrarse en condiciones desfavorables, facilitando una posible contaminación del medio de cultivo.

7.1.2. Determinación de amonio y fosfatos

Especificidad. Los resultados hallados en torno a la determinación de las muestras *Blanco* fueron congruentes con las reacciones química de los métodos utilizados. Los ensayos para determinar la presencia de amonio y fosfatos en los *blancos* fueron negativos: no presentaron algún tipo de coloración.

En este sentido, los métodos empleados son de un alto grado de especificidad para los analitos utilizados en esta investigación.

Linealidad y rango del sistema. Las curvas de calibración construidas para la determinación de amonio y fosfato cumplen con el parámetro establecido para establecer la linealidad del sistema, pues el coeficiente de determinación para las dos curvas es cercano a la unidad (R^2=0.995).

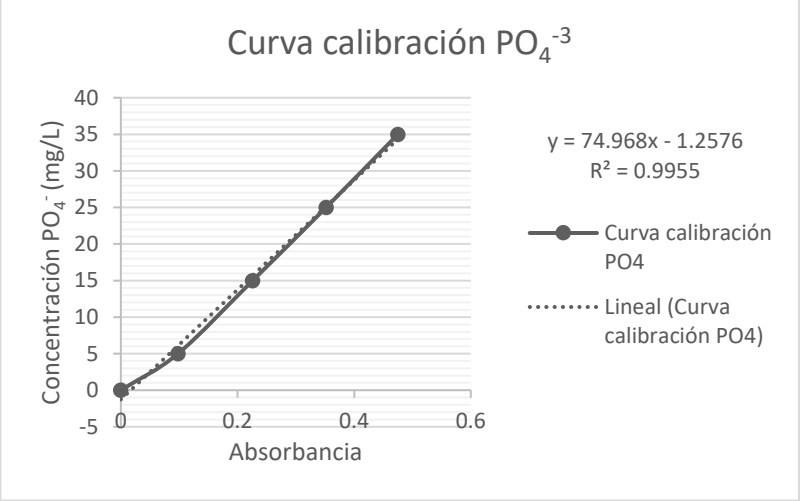


Ilustración 5. Curva de calibración de fósforo. Ajuste por regresión. R2=0.995

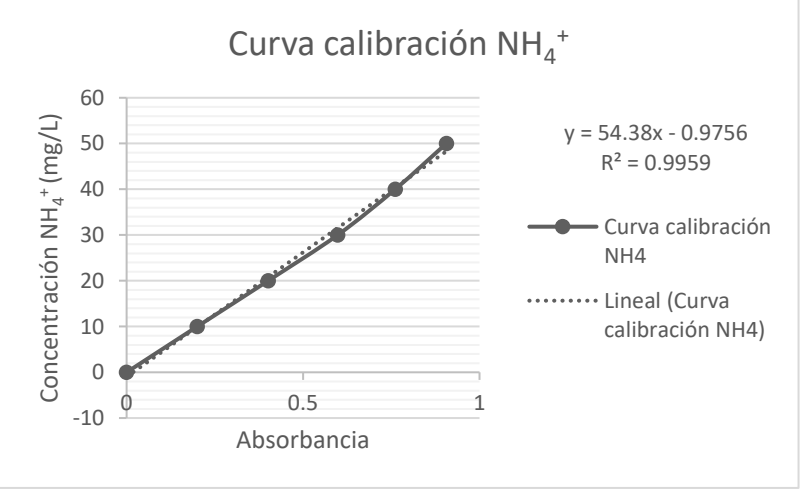


Ilustración 6. Curva de calibración de amonio. Ajuste por regresión. 120 µL/10mL. R2=0.995

Precisión. La precisión calculada en porcentaje se encuentra reportada en el *Anexo 4*, donde es posible observar un coeficiente de variación (CV) máximo de 4.876%, para la curva de calibración de NH_4^+, y de 4.729%, para la curva de calibración de PO_4^{-3}. Ambos valores cumplen el criterio de aceptación para la repetibilidad: CV menor al 5%.

Exactitud. La exactitud calculada en porcentaje se encuentra reportada en las *Anexos*, donde es posible observar para la curva de calibración de NH_4^+, un valor de exactitud de 96.597% y, de 98.61% para la curva de calibración de PO_4^{-3}. Ambos valores cumplen el criterio de aceptación (100 ± 10%).

7.1.3. Evaluación de la microalga frente a diferentes concentraciones de amonio y fosfatos

7.1.3.1. Análisis de evaporación de amonio

Los resultados para el análisis de volatilidad de amonio se presentan en la *Tabla 9*:

Tabla 4. Pérdida de amonio por volatilización.

ID	Medio	Concentración inicial		Concentración final		Pérdida NH_4
		NH_4^+ (mg/L)	PO_4^{-3} (mg/L)	NH_4^+ (mg/L)	PO_4^{-3} (mg/L)	%
1	BG11-NP	21.23	4.98	20.78	5	2.12%
2	BG11-NP	31.01	14.86	30.27	14.89	2.38%
3	BG11-NP	42.04	25.01	40.46	25.1	3.76%
4	BG11	20.07	5.1	19.66	5.1	2.04%
5	BG11	30.68	15.02	29.86	15	2.67%
6	BG11	40.03	25	38.43	25	3.99%
		Día 0		Día 7		

La mayor pérdida por volatilización fue del 3.99% en el ensayo **6**, seguido de 3.76% en el ensayo **3**, 2.67% en el ensayo **5** y 2.38% en el ensayo **1**. Los resultados sugieren que las pérdidas por volatilización guardan proporcionalidad con la concentración de amonio en el medio.

7.1.3.2. Variación de amonio y fosfatos

Los resultados mostrados corresponden al promedio multiensayo de cada una de las pruebas. Como se mencionó en la *METODOLOGÍA*, cada prueba se realizó por triplicado.

Los análisis estadísticos de las pruebas, expuestos en los *Anexos*, concluyen desviaciones estándar bajas, lo cual indica que la mayor parte de los datos tienden a estar agrupados cerca de su media. En este caso, la mayor desviación fue de 0.21 mg/L y se obtuvo en los ensayos 4 y 6. La desviación promedio es de 0.1275 mg/L. El Coeficiente de Variación (CV) está en función del valor promedio y la desviación estándar, así que estima la variación de los datos con respecto al valor promedio. El CV promedio de los ensayos fue de 0.0183, lo cual equivale a 1.83%.

Tabla 5. Resultados: evaluación microalga frente a diferentes concentraciones de amonio y fosfatos. ***0.2 g de inóculo.***

ID	Medio	Concentración (mg/L)											
		NH_4^+	PO_4^{-3}	NH_4^+	PO_4^{-3}	NH_4^+	PO_4^{-3}	NH_4^+	PO_4^{-3}	NH_4^+	PO_4^{-3}	NH_4^+	PO_4^{-3}
1	BG11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	BG11-NP	20.67	5.7894	20.3957	5.939	20.45	4.06513	20.23	1.966	17.02	0.617	15.45	0.767
3	BG11-NP	29.48	14.935	28.8246	14.64	28.988	11.9368	26.54	10.737	25.78	6.914	16.64	2.191
4	BG11-NP	43.34	24.157	42.5828	21.23	41.876	19.2087	38.45	13.511	38.29	11.56	26.54	5.714
5	BG11	20.89	5.9393	20.0151	4.815	15.665	3.54035	13.82	1.8161	10.17	1.666	5.169	1.666
6	BG11	43.78	23.707	42.0934	22.06	38.504	20.4831	36.98	18.309	31.65	14.04	15.72	6.164
1L	BG11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2L	BG11-NP	20.67	5.7894	20.5589	5.639	20.559	4.81481	20.45	3.6903	20.29	3.69	18.71	1.066
3L	BG11-NP	29.48	14.935	28.9334	14.71	28.988	11.736	28.93	7.686	28.77	8.24	26.92	4.463
4L	BG11-NP	43.34	24.157	43.2897	23.48	43.398	22.2824	43.07	19.359	42.91	19.28	43.02	13.81
5L	BG11	20.89	5.9393	20.3957	0.167	15.665	0.31673	15.56	0.1668	15.34	0.167	13.76	0.017
6L	BG11	43.78	23.707	39.8094	22.43	39.048	20.783	38.88	20.483	30.09	19.81	26.88	18.23
		Día 0		**Día 1**		**Día 2**		**Día 3**		**Día 4**		**Día 7**	

Tabla 6. Resultados: evaluación microalga frente a diferentes concentraciones de amonio y fosfatos. ***0.4 g de inóculo.***

ID	Medio	Concentración (mg/L)											
		NH_4^+	PO_4^{-3}	NH_4^+	PO_4^{-3}	NH_4^+	PO_4^{-3}	NH_4^+	PO_4^{-3}	NH_4^+	PO_4^{-3}	NH_4^+	PO_4^{-3}
1	BG11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	BG11-NP	20.67	5.7894	20.4501	5.564	16.535	3.46538	15.39	3.2405	15.28	1.816	7.78	0.317
3	BG11-NP	29.48	14.935	28.3352	14.64	27.302	11.9368	26.27	10.737	19.69	6.914	10.72	0.542
4	BG11-NP	43.34	24.157	41.5496	21.01	39.32	18.6839	36.76	13.736	30.62	7.589	18.23	3.69
5	BG11	20.89	5.9393	19.9063	4.755	15.175	1.81609	12.62	0.3917	8.051	0.242	1.39	0.092
6	BG11	43.78	23.707	39.5919	19.74	38.178	18.459	31.71	13.361	26.81	6.314	5.061	0.167
1L	BG11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2L	BG11-NP	20.67	5.7894	20.5045	5.789	20.015	4.51494	16.15	1.3663	11.04	0.317	9.68	0.767
3L	BG11-NP	29.48	14.935	29.6403	14.19	29.477	10.8872	27.57	6.2392	26.21	4.59	16.48	0.242
4L	BG11-NP	43.34	24.157	43.3441	21.23	40.843	15.4603	38.29	11.037	34.5	7.814	29.59	1.441
5L	BG11	20.89	5.9393	19.4713	4.89	16.861	0.31673	15.12	0.1668	13.22	0.467	10.06	0.242
6L	BG11	43.78	23.707	39.8094	19.66	39.048	13.8859	36.22	6.3891	31	6.689	15.99	1.816
		Día 0		**Día 1**		**Día 2**		**Día 3**		**Día 4**		**Día 7**	

Los análisis estadísticos proporcionan una alta confiabilidad en cuanto a la toma de muestras y protocolos de medición realizados (*Ver anexos 1 y 2*).

7.1.3.3. Análisis de consumo de amonio

La *Ilustración 6* no contempla los ensayos a los cuales se aplica protocolo de lavado en las células, únicamente se relaciona la incidencia de la biomasa sobre la asimilación del amonio en dos medios de cultivo diferentes: **B-NP**: BG11-NP y **B**: BG11(Se reducen los indicativos en la gráfica por facilidad de lectura e interpretación).

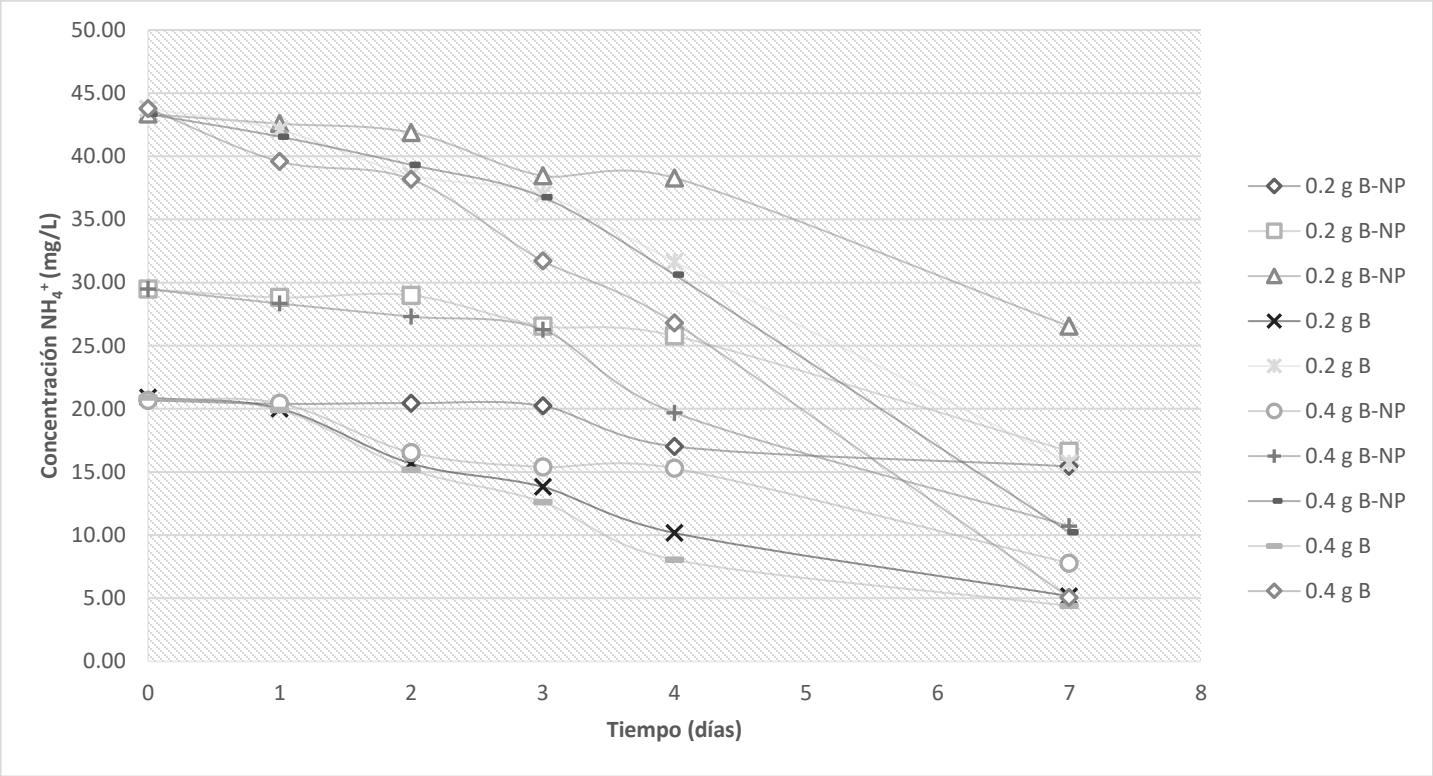


*Ilustración 7. Incidencia de **biomasa y medio de cultivo** sobre consumo de **amonio** en diferentes concentraciones*

A partir de la *Ilustración 6* se pueden extraer dos elementos importantes: la cantidad de inóculo influye en la tasa de consumo de amonio; el BG11 como medio base es más eficiente para la tasa de consumo de MF que el BG11-NP.

En la *Ilustración 7* se relacionan los ensayos a los cuales se aplicó protocolo de lavado en las células. Se mantiene la variación de biomasa y los medios de cultivo base. El protocolo de lavado descrito en el punto **6.2.3.3.** elimina los macronutrientes y micronutrientes adheridos a las paredes en las microalgas, provenientes de los reactores de producción de biomasa. El principal objetivo de estos ensayos era determinar la incidencia de dichos elementos, a partir de la comparación de los ensayos expuestos en la *ilustración 6*, sobre el consumo de amonio.

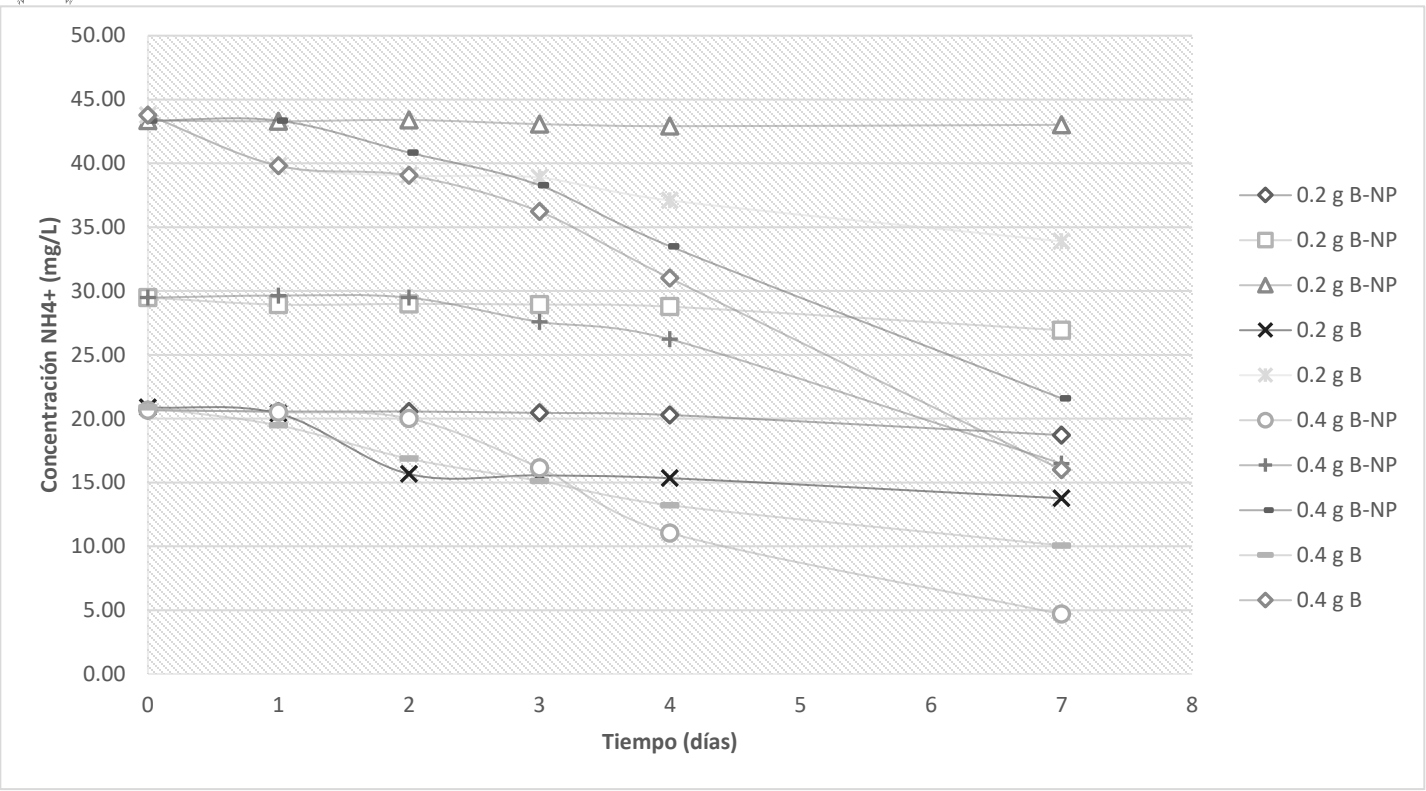


*Ilustración 8. Incidencia de **lavado de células**, biomasa y medio de cultivo sobre consumo de **amonio** en diferentes concentraciones*

Según la *Ilustración 7*, cuando se aplica protocolo de lavado a las células, la cantidad de inóculo inicial toma vital importancia. El medio de cultivo base sigue siendo influyente en la velocidad y nivel de asimilación.

Correlacionando los resultados de la *Ilustración 6* y la *Ilustración 7*, se determinan tres aspectos fundamentales, de cara a los ensayos que se realizaron en el BRBF:

- En medio de cultivo BG11, la microalga presenta mayor velocidad y nivel de consumo de amonio.
- La cantidad de biomasa en el inóculo inicial influye proporcionalmente sobre el consumo de amonio.
- El lavado de células disminuye el nivel y velocidad de consumo de amonio; asimismo, cuando se aplica este protocolo, la cantidad de biomasa tiene mayor impacto sobre el consumo de amonio.

7.1.3.4. Análisis de consumo de fosfatos

La *Ilustración 8* no contempla los ensayos a los cuales se aplica protocolo de lavado en las células, únicamente se relaciona la incidencia de la biomasa sobre la asimilación del fosfatos en dos medios de cultivo diferentes: **B-NP**: BG11-NP y **B**: BG11(Se reducen los indicativos en la gráfica por facilidad de lectura e interpretación).

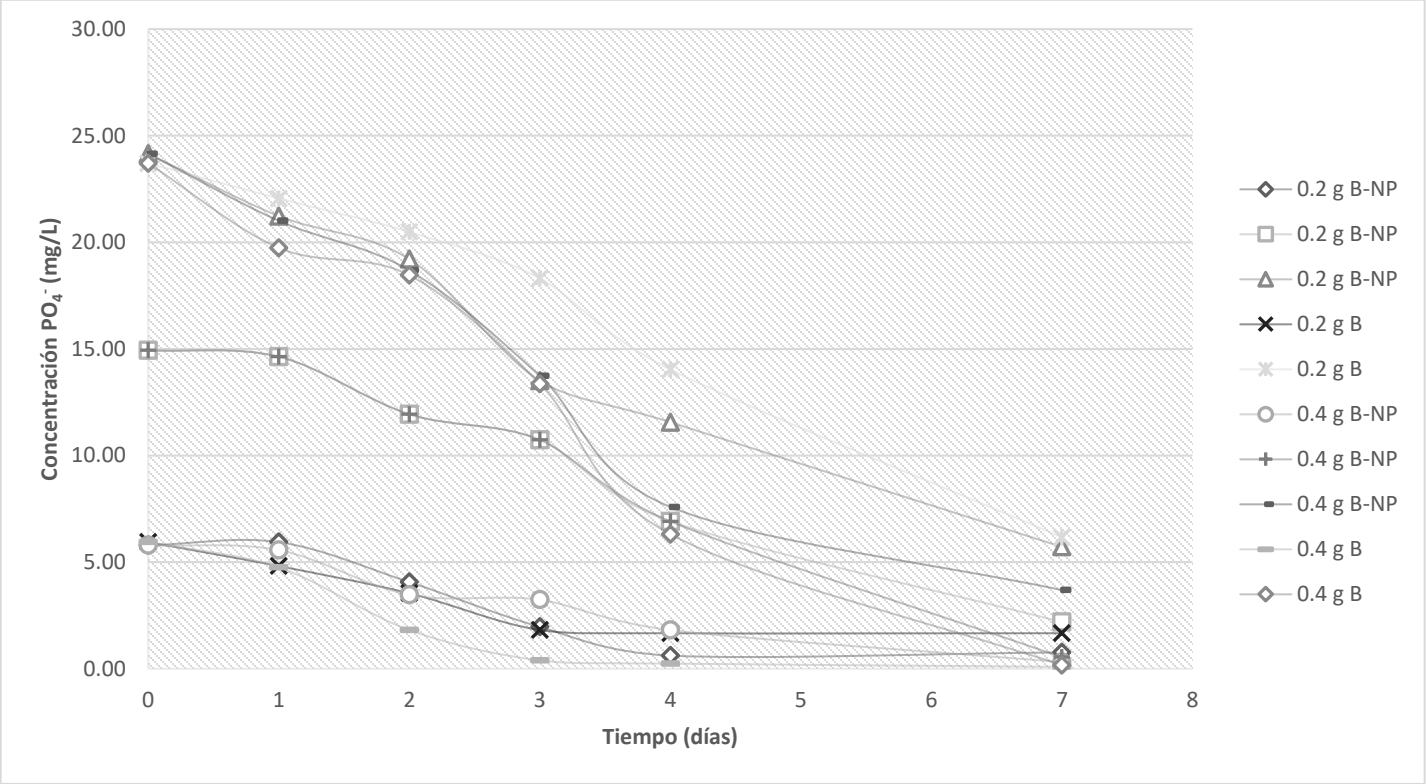


*Ilustración 9. Incidencia de **biomasa y medio** de cultivo sobre consumo de fosfatos en diferentes concentraciones*

El consumo de fosfatos marca dinámicas completamente diferentes al consumo de amonio. MF no presenta dificultades de atención para el consumo de fosfatos en alguno de los dos medios de cultivo. Se puede apreciar una corta fase de adaptación en medios de cultivo BG11-NP, pero la tendencia de remoción se mantiene.

Sin embargo, como se observó en los resultados de asimilación amonio, la cantidad de biomasa inicial optimiza el nivel y velocidad de consumo de fosfatos.

En la *Ilustración 9* se relacionan los ensayos a los cuales se aplicó protocolo de lavado en las células. Se mantiene la variación de biomasa y los medios de cultivo base. El protocolo de lavado descrito en el punto **6.2.3.3.** elimina los macronutrientes y micronutrientes en las microalgas, provenientes de los reactores de producción de biomasa. El principal objetivo de estos ensayos era determinar la incidencia de dichos elementos, a partir de la comparación de los ensayos expuestos en la *ilustración 8*, sobre el consumo de fosfatos.

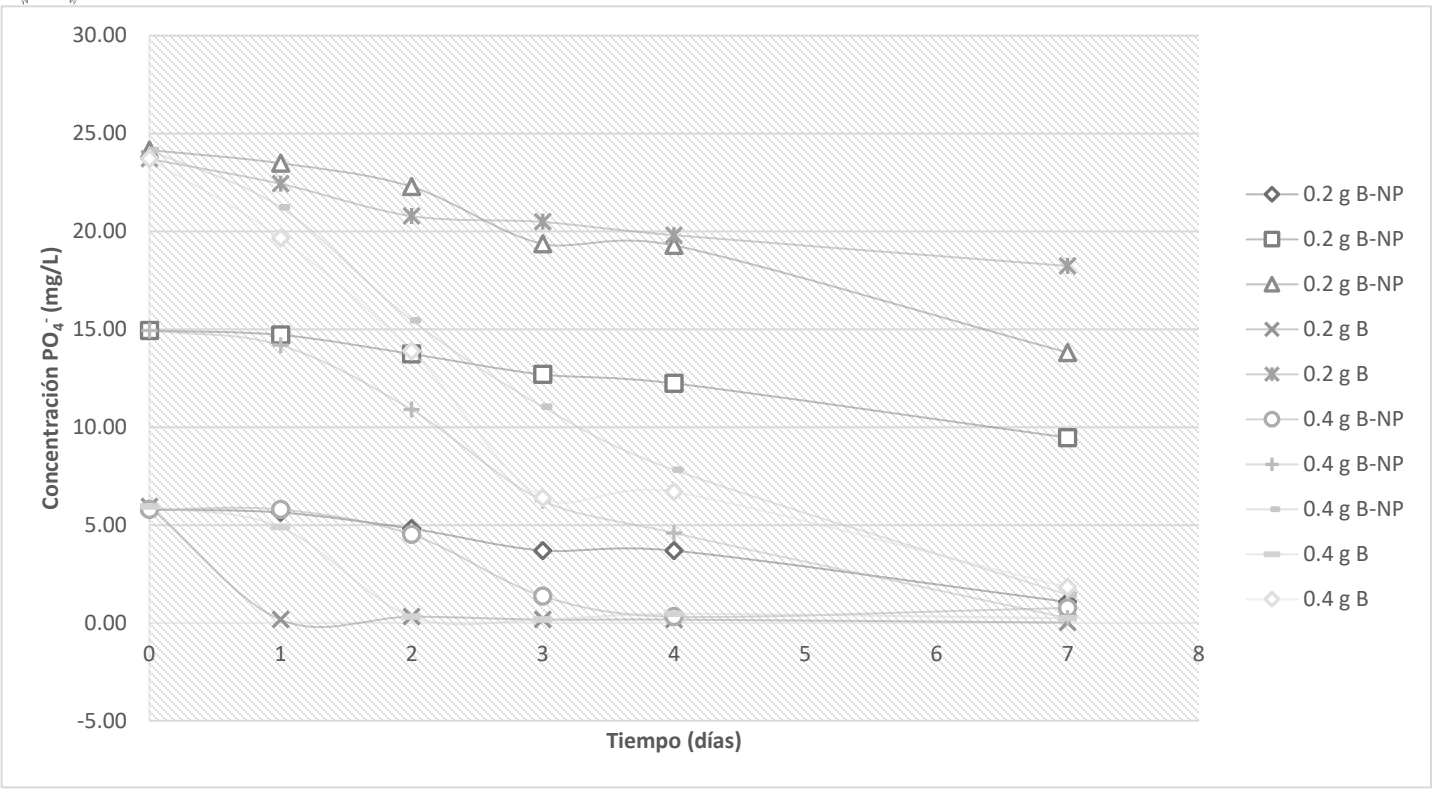


*Ilustración 10. Incidencia de **lavado de células, biomasa y medio de cultivo** sobre consumo de **fosfatos** en diferentes concentraciones.*

Tal y como se evidenció con el consumo de amonio, el consumo de fosfatos se ve impactado cuando se aplica protocolo de lavado de células. En menor medida, pero, definitivamente, incide.

Correlacionando los resultados de la *Ilustración 8* y la *Ilustración 9*, se corroboran los tres aspectos destacados en el punto anterior de *Análisis de consumo de amonio*, de cara a los ensayos que se realizaron en el BRBF:

- En medio de cultivo BG11, la microalga presenta mayor velocidad y nivel de consumo de amonio.
- La cantidad de biomasa en el inóculo inicial influye proporcionalmente sobre el consumo de amonio.
- El lavado de células disminuye el nivel y velocidad de consumo de amonio; asimismo, cuando se aplica este protocolo, la cantidad de biomasa tiene mayor impacto sobre el consumo de amonio.

Es importante destacar que, aunque se puedan extraer los mismos elementos, parece que el consumo de amonio es más sensible a variaciones de agentes externos: biomasa, medio de cultivo y concentración de analitos.

Tabla 7. Porcentajes de remoción y tasas de consumo promedio para ensayos con 0.4 g de inóculo en 50 mL de medio.

ID	Medio de cultivo	Concentración inicial (mg/L)		Concentración final (mg/L)		Porcentaje remoción %		Tasa de consumo (mg/L-día)	
		NH_4^+	PO_4^{-3}	NH_4^+	PO_4^{-3}	NH_4^+	PO_4^{-3}	NH_4^+	PO_4^{-3}
1	BG11	0	0	0	0	0	0	0	0
2	BG11-NP	20.67	5.7894	7.78	0.317	62.36%	94.52%	1.84	0.78
3	BG11-NP	29.48	14.935	10.72	0.542	63.64%	96.37%	2.68	2.05
4	BG11-NP	43.34	24.157	18.23	3.69	57.94%	84.72%	3.58	2.92
5	**BG11**	**20.89**	**5.9393**	**1.39**	**0.092**	**93.35%**	**98.45%**	**2.78**	**0.83**
6	**BG11**	**43.78**	**23.707**	**5.061**	**0.167**	**88.44%**	**99.30%**	**5.53**	**3.36**
1L	BG11	0	0	0	0	0	0	0	0
2L	BG11-NP	20.67	5.7894	9.68	0.767	53.17%	86.75%	1.57	0.71
3L	BG11-NP	29.48	14.935	16.48	0.242	44.10%	98.38%	1.85	2.09
4L	BG11-NP	43.34	24.157	29.59	1.441	31.73%	94.03%	1.96	3.24
5L	BG11	20.89	5.9393	10.06	0.242	51.84%	95.93%	1.54	0.81
6L	BG11	43.78	23.707	15.99	1.816	63.48%	92.34%	3.97	3.12
		Día 0		**Día 7**					

La *Tabla 7* resume los ensayos realizados con 0.4 g de inóculo inicial. Se exponen estos resultados debido a que, con respecto a los ensayos de 0.2 g de inóculo, los rendimientos y tasas de remoción son más altos.

7.2. SEGUNDA ETAPA

7.2.1. Diseño del Biorreactor Rotativo de Biopelícula fija

1) **Predimensionamiento:**

Se propuso un reactor de biodiscos unidos por un único eje, cuyo contenedor sea traslucido y geométricamente regular, adicionalmente, teniendo en cuenta las velocidades de rotación manejada, se propone un mecanismo de agitación mecánica con aspas.

El predimensionamiento es realizado a partir de los siguientes criterios y observaciones:

- En cultivos de recuperación se observó que MF tiene la capacidad de formar biopelícula sobre diferentes materiales como vidrio y plástico.
- La necesidad de luz por parte de MF, requiere que su material de adhesión y sujeción, así como su contenedor permitan el paso de luz.
- Se planean dos anillos exteriores para cada biodisco. Esto con el fin de facilitar su manipulación.
- Cada biodisco se compone de dos medias partes, cuya unión proporciona una matriz de sostén para facilitar la adhesión y sujeción de MF.
- Cuatro paletas constituyen cada una de las aspas.

- El contenedor se propone de cristal o acrílico, de tal forma que se permita el mayor ingreso de luz posible al interior del reactor.
- La unión biodisco-aspa es unión tipo rosca.
- El largo del BRBF se constituye de las uniones biodisco-paleta, paleta-biodisco.
- Las paletas y biodiscos serán hechos con impresión 3D. Se planea consultar prestadores del servicio para finiquitar detalles sobre material y tipo de construcción.
- Se planea usar rodamientos para la fijación del eje del reactor a su contenedor. Esto permite que el reactor se sujete al contenedor mientras gira el eje central.
- El material del reactor no puede ser biodegradable.

2) **Elaboración:**

Para la construcción de los biodiscos, se adoptó un diseño de red interconectada por dos capas solapadas apiladas de manera no uniforme. Este diseño permitía la interconexión de toda la red de filamentos del biodisco y conjuntamente el paso de fluidos y luz. El diseño se realizó en conjunto con el fabricante SERINSY 3D, quienes adicionalmente aportaron la información necesaria para seleccionar el material de fabricación.

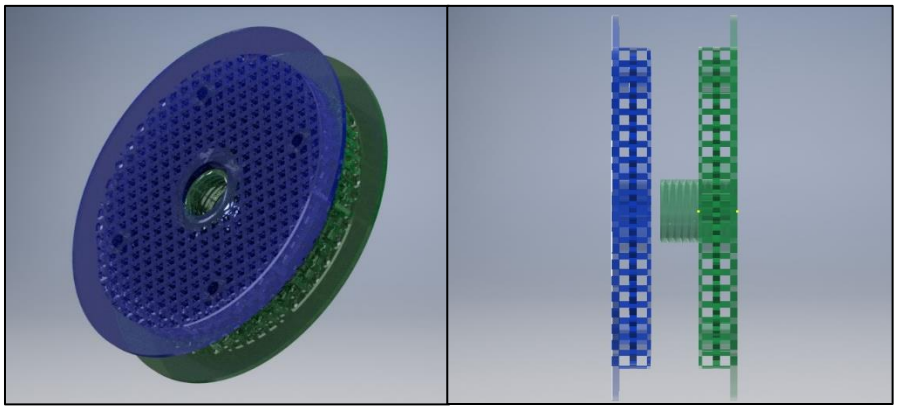


Ilustración 11. Montaje biodiscos. SERINSY 3D.

La impresión 3D es una técnica reciente y no existen experiencias de construcción de reactores con esta técnica; en diálogos con el fabricante e información de la técnica se encuentra que las piezas se construyen a través de tejido, un elemento importante teniendo en cuenta la morfología filamentosa de MF, es decir, se prevé una mayor sujeción y adhesión debido a dicha característica de tejido.

El material escogido es el Tereftalato de Polietileno (**PETG**). El PETG es el plástico más usado en el mundo y uno de los materiales más usados en la impresión 3D, la G del final se refiere a Glycol-modificado, e indica un cambio en la estructura química del polímero que lo hace más transparente, menos frágil, más fácil de procesar y resistente a temperaturas de hasta 80°C (BITFAB, 2019). Adicionalmente, el PETG es un material aprobado para uso alimentario con gran resistencia química y reciclable.

Escogido el material y hechas todas las precisiones posibles, se desarrolla el diseño final para impresión:

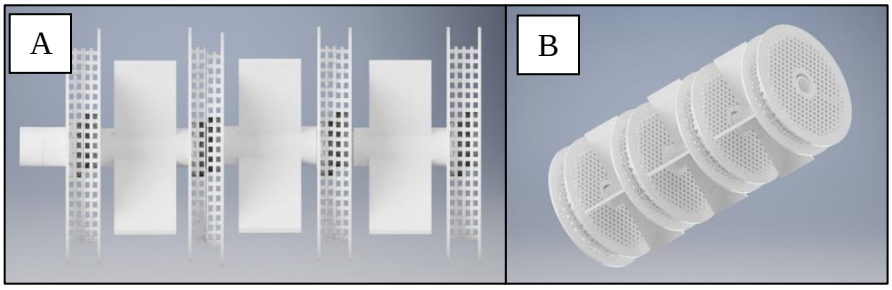


Ilustración 12. Diseño final para impresión. SERINSY 3D. ***A.*** *Vista perfil BRBF –* ***B.*** *Vista isométrica.*

El diseño final, si bien no es completamente traslucido, proporciona el ingreso de luz requerido.

Para el diseño y construcción del contenedor se descarta el vidrio como material. Una vez consultados varios fabricantes, se expone la fragilidad de dicho material ante la perforación y flexibilidad; por esta razón se escoge el acrílico. Definido el material, se diseñó el contenedor con cada uno de sus orificios:

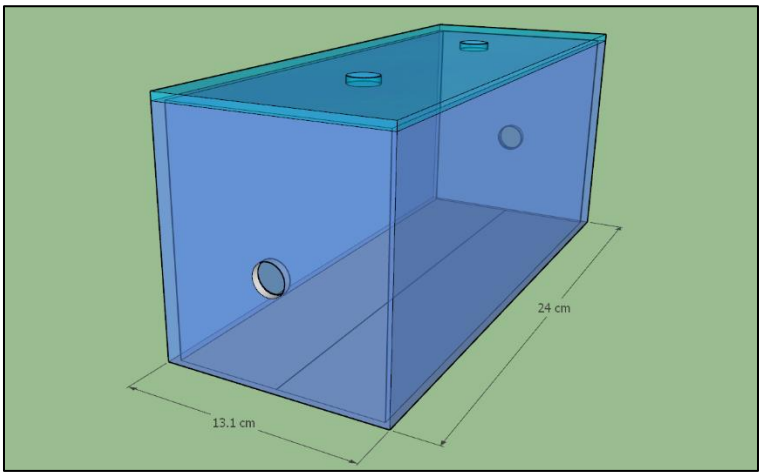


Ilustración 13. Diseño final de cubeta. Autores.

El contenedor consta de dos orificios superiores para el escape de gases y toma de muestras, y dos orificios laterales para el soporte de los biodiscos y paletas.

El volumen efectivo del BRBF es de 2.2 litros, lo cual equivale a un 45% de sumergencia en los discos:

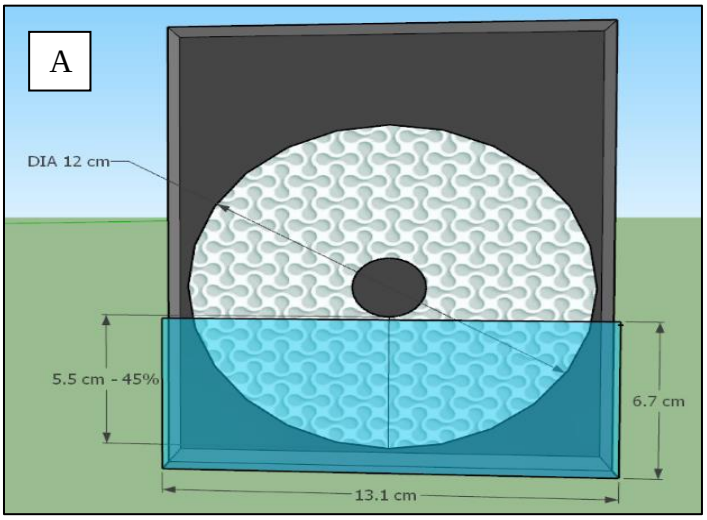


Ilustración 14. Dimensiones efectivas del BRBF. Autores. ***A****. Vista frontal BRBF-Biodisco –* ***B****. Vista isométrica de cubeta.*

3) **Ensamblaje:**

Una vez se construyen cada una de las piezas, se procede a realizar el montaje completo del BRBF y se comprueba su funcionamiento con todas las partes ensambladas:

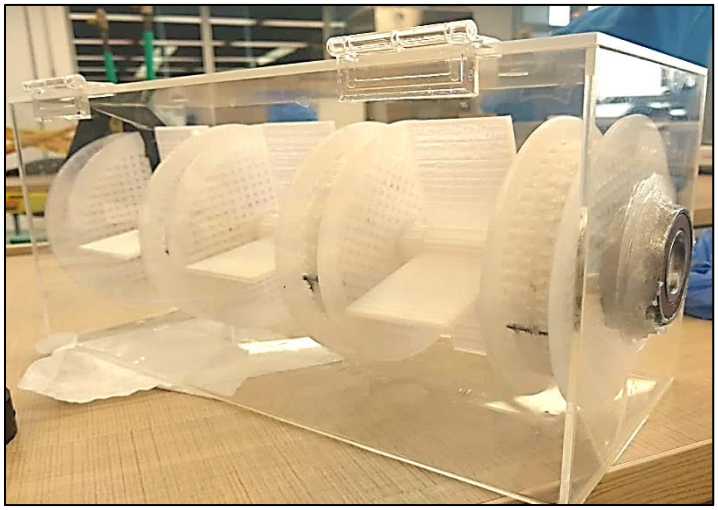


Ilustración 15. Construcción BRBF. Autores.

7.2.2. Formación de biopelícula

En la fotografía se aprecian biodiscos, aspas, el contenedor y los rodamientos que sujetan y permiten la rotación del eje. Para la rotación del eje se utilizan motores monofásicos de 6 RPM.

Para el **crecimiento y adhesión** del organismo en el BRBF se puso en marcha el reactor con cultivos de MF en suspensión (Ver *Ilustración 15*).

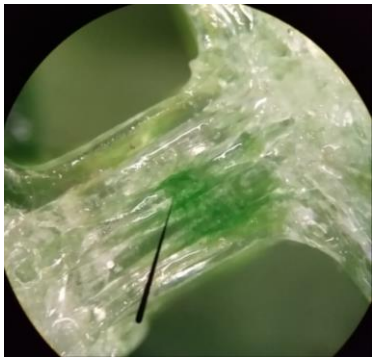


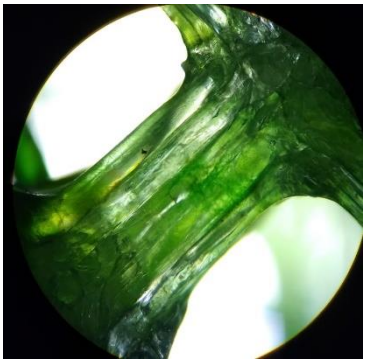
Ilustración 16. Adhesión y crecimiento de MF en el BRBF. Autores.

La metodología propuesta se diseñó para aprovechar la capacidad de sujeción, adhesión y auto floculación del organismo, así como la disposición, técnica de construcción y material de los biodiscos, permitiendo que MF colonizara la estructura interna del BRBF.

El monitoreo del crecimiento de *Phormidium sp.* en los biodiscos por medio de microscopia a 40x, arrojó los siguientes resultados:

Tabla 8. Visualización microscópica de biodiscos en 40x.

	Día de cultivo 3. El organismo demostró la capacidad de crecer al interior de las hebras del biodisco. Se apreció una porción que representa el crecimiento generalizado en el biodisco.

	Día de cultivo 8. Se visualizó una colonización homogénea sobre los biodiscos. Sin embargo, la porción del biodisco, visualizada en el lente objetivo, sugiere que los discos podían densificarse aún más.
	Día de cultivo 15. Los biodiscos tenían una significativa densificación celular, el color que se aprecia evidencia una colonización densa y homogénea. Se decidió establecer este punto de crecimiento como el inicio de los ensayos finales en el BRBF.

En el día 15, una vez se observó la densificación celular suficiente en los discos (Ver *Ilustración 16*), se liberó el medio en suspensión y se preparó el BRBF para el primer lote de análisis para la remoción de amonio y fosfatos.

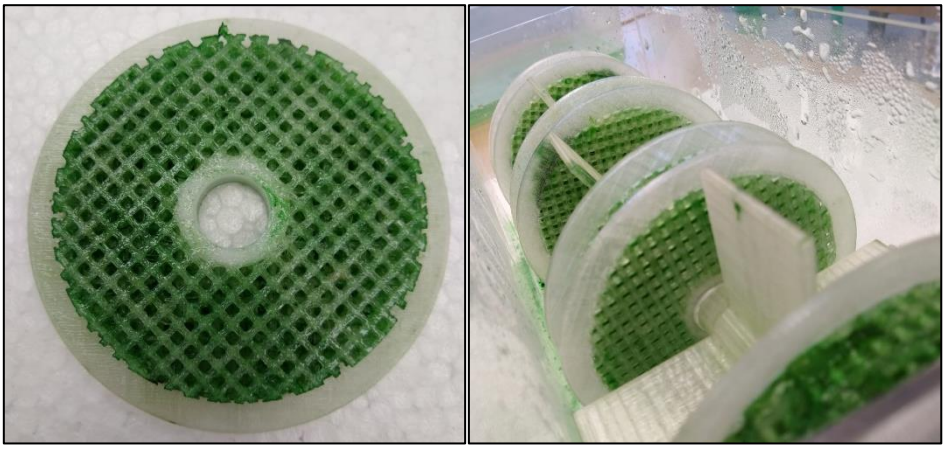


Ilustración 17. Crecimiento celular en biodiscos de BRBF. Autores.

7.2.3. Asimilación de amonio y fosfatos en el BRBF

7.2.3.1. Primer ensayo en el BRBF

Los resultados del *Primer ensayo* se encuentran contenidos en la *Tabla 9*. Con base en resultados de los ensayos realizados en la *Primera etapa*, se esperaba tomar lecturas diarias durante 7 días.

Como se aprecia en la *ilustración 17*, para la hora 19, la concentración de amonio era de 0.384x mg/L y la concentración de fosfatos era de 0.691 mg/L, lo cual corresponde a una remoción del 99.05% para amonio y 97.44% para fosfatos, y una tasa de remoción promedio de 23.136 mg/L-d para N-NH_4^+ y 15.151 mg/L-d para P-PO_4^{-3}. El pH del ensayo no tuvo variación alguna y se mantuvo en 7.0.

Tabla 9. Resultados Primer Ensayo.

Primer ensayo				**Edad de cultivo (h)**		**168**
Hora	**Amonio**			**Fosfato**		
	Absorbancia	Concentración (mg/L)	Tasa de remoción (mg/L-d)	Absorbancia	Concentración (mg/L)	Tasa de remoción (mg/L-d)
0	0.766	40.679	23.136	0.378	27.080	15.151
19	0.025	0.384		0.026	0.692	

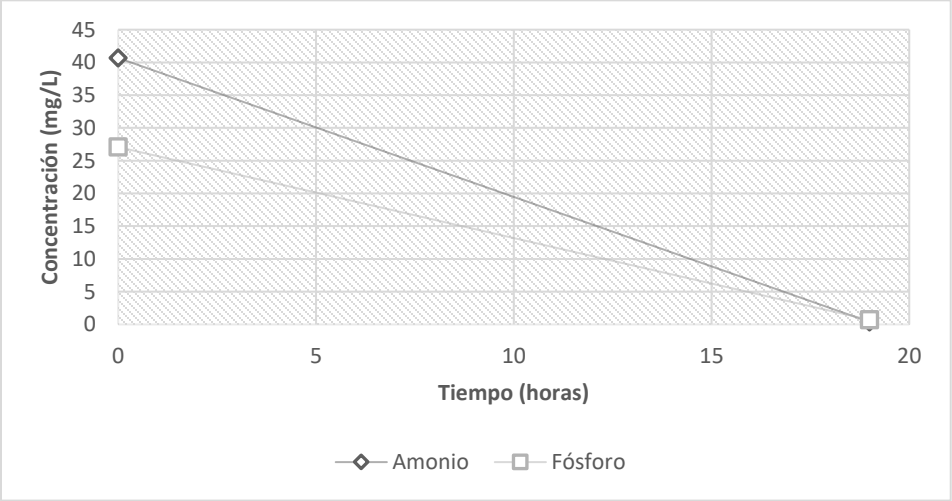


Ilustración 18. Primer ensayo: metabolización NH_4^+ y PO_4^- en BRBF.

7.2.3.2. Segundo ensayo en el BRBF

Los resultados del *Segundo ensayo* se encuentran contenidos en la *Tabla 10*.

Como se visualiza en la *Ilustración 18*, la remoción del amonio y de fosfato se apreció desde la hora 2 de ensayo y la tendencia se mantuvo hasta la hora 6, con una tasa promedio de remoción de 1.393 mg/L-d para el amonio y 0.448 mg/L-d para fosfato. Tasas muy inferiores,

con respecto a las obtenidas en el *Ensayo 1*. El pH del ensayo tuvo una ligera variación, situándose en 7.2 en las mediciones realizadas.

Tabla 10. Resultados segundo ensayo.

Segundo ensayo				**Edad de cultivo (h)**		**191**
Hora	**Amonio**			**Fosfato**		
	Absorbancia	Concentración (mg/L)	Tasa de remoción (mg/L-d)	Absorbancia	Concentración (mg/L)	Tasa de remoción (mg/L-d)
0	0.675	35.731	-	0.338	24.082	-
2	0.638	33.719	1.155	0.316	22.432	0.947
4	0.603	31.816	1.093	0.310	21.982	0.258
6	0.575	30.293	0.874	0.308	21.833	0.086
22	0.48	25.127	2.966	0.292	20.633	0.689
24	0.452	23.604	0.874	0.286	20.183	0.258

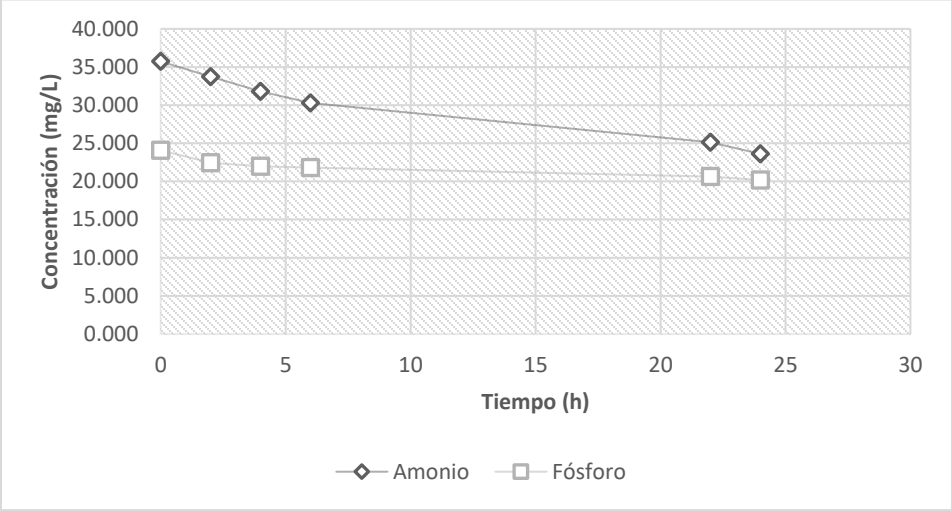


Ilustración 19. Segundo ensayo: metabolización NH_4^+ y PO_4^- en BRBF

7.2.3.3. Tercer ensayo en el BRBF

Los resultados del *Tercer ensayo* se encuentran contenidos en la *Tabla 11*.

La remoción de macronutrientes N-P observada en la *Ilustración 19* se da a una menor tasa, con respecto al *Segundo ensayo*. Se tomaron 14 muestras, obteniendo tasas promedio de remoción de 0.352 mg/L-d para amonio y 0.200 mg/L-d para fosfatos, con un porcentaje de remoción de 18.9% de $N\text{-}NH_4^+$ y de 18% de $P\text{-}PO_4^{-3}$. El pH del ensayo tuvo una ligera variación, situándose en 7.4 en las mediciones realizadas.

Tabla 11. Resultados tercer ensayo.

ENSAYO 3				Edad de cultivo (h)		214
Hora	LECTURA AMONIO			LECTURA FOSFATO		
	Absorbancia	Concentración (mg/L)	Tasa de remoción (mg/l-d)	Absorbancia	Concentración (mg/L)	Tasa de remoción (mg/l-d)
0	0.854	45.465	-	0.378	27.080	-
1	0.792	42.093	1.936	0.373	26.705	0.215
2	0.786	41.767	0.187	0.374	26.780	-0.043
3	0.76	40.353	0.812	0.353	25.206	0.904
4	0.744	39.483	0.500	0.357	25.506	-0.172
5	0.744	39.483	0.000	0.35	24.981	0.301
6	0.736	39.048	0.250	0.349	24.906	0.043
7	0.722	38.287	0.437	0.346	24.681	0.129
24	0.72	38.178	0.062	0.311	22.057	1.507
25	0.715	37.906	0.156	0.314	22.282	-0.129
26	0.712	37.743	0.094	0.314	22.282	0.000
27	0.709	37.580	0.094	0.314	22.282	0.000
28	0.705	37.362	0.125	0.313	22.207	0.043
29	0.701	37.145	0.125	0.313	22.207	0.000
30	0.696	36.873	0.156	0.313	22.207	0.000

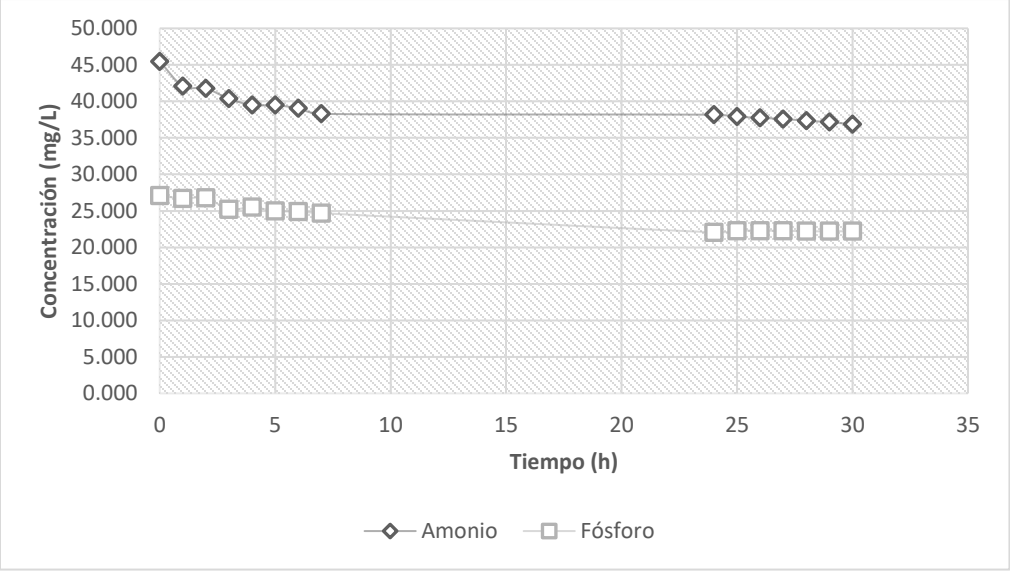


Ilustración 20. Tercer ensayo: metabolización NH_4^+ y PO_4 en BRBF

7.2.3.4. Cuarta ensayo en el BRBF

Los resultados del *Cuarto ensayo* se encuentran contenidos en la *Tabla 12*.

La remoción de macronutrientes N-P observada en la *Ilustración 20* presenta tasas de promedio de 1.142 mg/L-d para el amonio y 0.550 mg/L-d para fosfato, lo cual corresponde a un porcentaje de remoción de 87.017% de $N\text{-}NH_4^+$ y 98.27% de $P\text{-}PO_4^{-3}$. El pH del ensayo no tuvo variación alguna y se mantuvo en 7.4.

El *Cuarto ensayo* permite confirmar la incidencia del $NaNO_3$ y del K_2HPO_4 sobre la metabolización de amonio y fosfatos.

Tabla 12. Resultados cuarto ensayo.

Cuarto ensayo				**Edad de cultivo (h)**		**238**
Hora	**Amonio**			**Fosfato**		
	Absorbancia	Concentración (mg/L)	Tasa de remoción (mg/l-d)	Absorbancia	Concentración (mg/L)	Tasa de remoción (mg/l-d)
0	0.935	49.870	-	0.247	17.259	-
1	0.931	49.652	0.125	0.245	17.110	0.086
2	0.923	49.217	0.250	0.238	16.585	0.301
3	0.922	49.163	0.031	0.223	15.460	0.646
4	0.870	46.335	1.624	0.220	15.235	0.129
5	0.860	45.791	0.312	0.215	14.861	0.215
6	0.852	45.356	0.250	0.210	14.486	0.215
7	0.850	45.247	0.062	0.166	11.187	1.894
8	0.792	42.093	1.811	0.114	7.289	2.238
9	0.615	32.468	5.526	0.106	6.689	0.344
10	0.612	32.305	0.094	0.090	5.490	0.689
24	0.315	16.154	9.273	0.019	0.167	3.056
25	0.310	15.882	0.156	0.018	0.092	0.043
26	0.302	15.447	0.250	0.017	0.017	0.043
27	0.291	14.849	0.343	0.016	0.017	0.003
28	0.260	13.163	0.968	0.016	0.009	0.002
29	0.207	10.281	1.655	0.003	0.001	0
30	0.204	10.118	0.094	0.002	0	0
31	0.186	9.139	0.562	0.001	0	0
32	0.158	7.616	0.874	0.001	0	0
33	0.136	6.420	0.687	0.001	0	0
34	0.137	6.474	-0.031	0.001	0	0
35	0.130	6.094	0.219	0.001	0	0

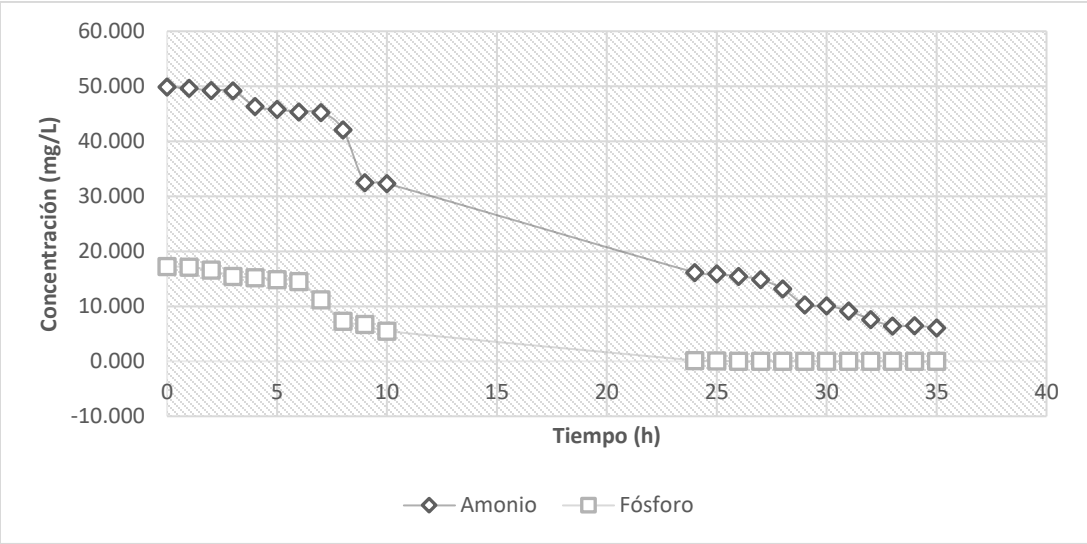


Ilustración 21. Cuarto ensayo metabolización NH4+ y PO4-3 en BRBF

A continuación, se presenta una tabla para resumir la información presentada anteriormente, con relación a los *ensayos 1*, *2*, *3* y *4* en el BRBF.

Tabla 13. Resumen y síntesis de ensayos en el BRBF

		Amonio		Fosfato		Tasa promedio remoción		Porcentaje de remoción	
ID	Duración	Concentración inicial	Concentración final	Concentración inicial	Concentración final	Amonio	Fosfato	Amonio	Fosfato
Unidades	(Horas)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L-hora)	(mg/L-hora)	(%)	(%)
Ensayo 1	20	40.679	0.383	27.080	0.691	2.120	1.388	99.056	97.448
Ensayo 2	24	35.730	25.126	24.081	20.633	0.482	0.156	29.677	14.318
Ensayo 3	30	45.464	38.014	27.08	22.282	0.275	0.177	16.386	17.717
Ensayo 4	35	49.869	6.474	25.259	0.4365	1.276	0.730	87.017	98.271

El análisis de la metabolización de amonio y fosfatos por parte de MF, dispuesta en el BRBF, se llevó a cabo en cuatro ensayos. Si bien los ensayos se preparaban para iniciar con 40 mg/L de amonio y 25 mg/L de fosfatos, la determinación experimental de dichas concentraciones en la hora 0, no correspondían exactamente a las concentraciones teóricas. Los mejores resultados, en cuanto a tasas y porcentajes de remoción, se obtuvieron en los ensayos *1* y *2*.

Si bien en algunos ensayos de la *Primera etapa*, se obtuvieron niveles de remoción por encima del 90% para amonio y fosfatos (*Tabla 7*), la disposición de MF en el BRBF permitió demostrar que dichos niveles de remoción pueden ser alcanzados en menor tiempo, al disminuir el número de horas necesarias para este propósito de 168 a 19 (ensayo 1- BRBF), un aumento en la eficiencia de remoción del 88.7%.

8. DISCUSION

8.1. DETERMINACIÓN DE AMONIO (NH_4^+) Y FOSFATO (PO_4^{-3})

8.1.1. Establecimiento y validación del método

8.1.1.1. Especificidad

La nulidad en los resultados de los ensayos realizados para especificidad se debe a las reacciones acaecidas en los métodos propuestos. En principio, la reacción del reactivo de Nessler con amoníaco es:

$$2\ K_2[HgI_4] + 3\ KOH + H_3N = HgI\ (H_2N)\ .\ HgO + 7\ KI + 2\ H_2O$$

Con catión amonio, la ecuación iónica es:

$$2\ [HgI_4]_2\text{-} + 4\ OH^- + H_4N^+ = HgI\ (H_2N)\ .\ HgO + 7\ I^- + 3\ H_2O$$

En este sentido, el analito debe estar presente para una solución coloreada por lo cual, cualquier otro compuesto no seguirá la reaccion anterior y no generará coloración alguna.

De igual manera sucede con la reacción del método de RVM, como sigue:

$$(PO_4)^{3-} + (VO_3)^- + 11(MoO_4)^{2-} + 22\ H^+ \leftrightarrow P(VMo_{11}O_{40})^{3-} + 11\ H_2O$$

Esta reacción no sucede en presencia de analitos placebo, por lo que no se observarán compuestos coloreados. Es importante aclarar que el RVM otorgo una coloración ligeramente amarilla, por lo que la interferencia se eliminó mediante la preparación de blancos y ajustada en el espectrofotómetro mediante las curvas de calibración.

8.2. EVALUACIÓN DE MICROALGA FRENTE A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AMONIO Y FOSFATOS

De los resultados de la *Primera etapa* se pueden extraer tres elementos principales del comportamiento del microrganismo en relación con el contenido de biomasa utilizado, la volatilización del N-NH_3 y la incidencia en el crecimiento de las concentraciones diferenciadas de macronutrientes N-P.

Los porcentajes de remoción de N-P guardan una relación proporcional con la cantidad de biomasa añadida al ensayo. Es común que la tasa de consumo de nutrientes incremente cuando se aumenta la concentración de microorganismos como se describe en el modelo cinético de Michaelis – Menten (Michaelis & Menten , 1913), el cual es estructuralmente similar al modelo de Monod, y está regulado por la concentración intracelular N-P de cada organismo: comportamiento explicado en el modelo de Droop (Droop, 1968).

El equilibrio amoniaco/amonio (NH_3/NH_4^+) oscila entre dos fenómenos opuestos ocurriendo en el sistema: Eliminación física de amoniaco y la utilización biológica del amonio (de la Noüe & Talbot , 1993).

$$NH_3 + H_2O \underset{Eliminación\ física - Utilización\ biológica}{\Longleftrightarrow} OH^- + NH_4^+$$

Dependiendo de la tasa de utilización del ion amonio por parte del alga, el aumento del pH por encima de 8.0 (R.O. Cañizares-Villanueva, 1994), la temperatura (Proceso fuertemente catalizado por altas temperaturas (de la Noüe & Talbot , 1993)) y la aireación del medio (González, Cañizares, & Baena, 1997), el equilibrio se puede desplazar hacia la izquierda y ser volatilizado. A un pH bajo < 8, cuyo caso es el de esta investigación, la forma iónica del amonio (NH_4^+) es predominante (> 96% (Wetzel, 1983)), este resultado es consistente con el porcentaje de pérdida por volatilización estimado en la etapa de *Análisis de volatilización del amonio* de esta investigación (2.45% - 4.42%). Es, por lo tanto, poco probable que el amoniaco se volatilizara a la atmosfera ya que este proceso ocurre cuando el amoniaco está en su forma molecular (NH_3 (Idelovich & Michail, 1981)). En consecuencia, se demostró que el amoniaco desapareció principalmente debido al consumo algar activo.

Los ensayos previos también demostraron que MF tiene un comportamiento consistente en cuanto a las tasas y nivel de asimilación, según la literatura, ante la variación de concentraciones de ortofosfatos y amonio. En la *tabla 8* se muestran los ensayos realizados para las concentraciones máximas y mínimas de estos nutrientes; los resultados de estos ensayos no indican una restricción metabólica, en términos de tasa de crecimiento (generación de biomasa), entre 20 y 40 ppm de amonio ($N\text{-}NH_4^+$) y 5 y 25 ppm de ortofosfatos ($P\text{-}PO_4^{-3}$). La restricción metabólica puede ser atribuida a la interacción de las cianobacterias con el ion amonio debido a su rol antagónico en el crecimiento (R. Blier, G. Laliberté & J. de la Noüe, 1996) en dos aspectos: inhibición y toxicidad; cuya condición de ocurrencia dependen a su vez de las concentraciones de esta molécula y en la forma química en la cual está presente. De esta manera, teniendo en cuenta la forma dominante de amonio ($N\text{-}NH_4^+$) presente en los ensayos, debe esclarecerse que la concentración de esta molécula necesaria para empezar a inhibir el crecimiento está en el intervalo de 2.83mMol (51mg/L) $N\text{-}NH_4^+$/L y 3.2mMol (58mg/L) $N\text{-}NH_4^+$/L (Markou & Georgakakis, 2011), y que las concentraciones trabajadas en esta investigación llegaron a un máximo de 2.21mMol (40mg/L) $N\text{-}NH_4^+$/L, razón por la cual no se concibe una dinámica de inhibición, dada la concentración utilizada en esta investigación. Es importante aclarar que, si bien el amoniaco libre en solución (NH_3) no estuvo presente en el ensayo en cantidades significativas, este tiene un impacto mayor en la restricción metabólica de las cianobacterias, estando la concentración suficiente para inhibición situada en valores entre 2.06mMol (35mg/L) $N\text{-}NH_3$/L y 2.5mMol (42.6 mg/L) $N\text{-}NH_3$/L (R. Blier, G. Laliberté & J. de la Noüe, 1996) (Abeliovich & Azov, 1976) y en niveles tóxicos a concentraciones de 2.9mMol (50 mg/L) $N\text{-}NH_3$/L (R. Blier, G. Laliberté & J. de la Noüe, 1996).

8.3. BIORREACTOR ROTATIVO DE BIOPELÍCULA FIJA

8.3.1. Análisis de cinética de degradación (K)

Tabla 14. Resultados cinética de degradación en el BRBF

		Amonio			Fosfato			% remoción	
ID	Duración	Concentración i	Concentración f	K	Concentración i	Concentración f	K	Amonio	Fosfato
Unidades	(Horas)	(mg/L)	(mg/L)	d^{-1}	(mg/L)	(mg/L)	d^{-1}	(%)	(%)
Ensayo 1	20	40.679	0.383	5.89	27.08	0.691	4.63	99.056	97.448
Ensayo 2	24	35.73	25.126	0.57	24.081	20.633	0.32	29.677	14.318
Ensayo 3	30	45.464	38.014	0.35	27.08	22.282	0.16	16.386	17.717
Ensayo 4	35	49.869	6.474	1.63	25.259	0.4365	6.69	87.017	98.271

La cinética de degradación (K) permite correlacionar la dinámica de un sustrato en un periodo determinado. Como se observa en la *Tabla 14*, en el *Ensayo 1* se lograron mayores tasas y nivel de asimilación de amonio y fosfatos por parte de MF, seguido de los *Ensayos 4, 2 y 3*.

En procesos de tratamiento biológico de amonio con cianobacterias, las constantes K alcanzadas oscilan entre 0.13 d^{-1} y 0.35 d^{-1}, mientras que las constantes reportadas para el tratamiento biológico de fosfatos oscilan entre 0.25 d^{-1} y 0.8 d^{-1} (Converti, Convertí, & Lodi, 2005); (Acevedo , Pino , & Peñuela , 2017) y (Carreño, 2016).

8.3.2. Proporción N/P

Los resultados obtenidos en el biorreactor sugieren que los mayores porcentajes de remoción y las mayores tasas de absorción de N-P obedecen a los ensayos que cuentan con la presencia de nitrato de sodio remanente del BG-11 como consecuencia de la resuspensión de células, en el medio utilizado, sin lavado previo. Numerosos estudios indican que este comportamiento puede explicarse a través del cambio en la proporción N/P en el medio que contiene las cianobacterias. De acuerdo a la literatura, la concentración N-P y proporción N/P, pueden modificar significativamente la composición bioquímica de las células del alga; elementos que, según (Gardner-Dale. D.A., 2017) (Sterner & Elser, 2002), inciden en la disminución de tasas de consumo de N-P.

La proporción N/P del medio BG-11 es de 60:1, la cual es superior a la proporción N/P del medio utilizado en el BRBF, que es de 3.875/1. En este sentido, se determina que la relación N/P no es óptima para el crecimiento de *Phormidium sp.* lo cual es congruente con lo expresado por (P. Talbot, 1993), que sitúa el valor de esta proporción en 54:1 para este tipo de cianobacteria.

8.3.3. Consumo de Fosfatos

La eliminación de fosforo en cultivos de algas es el resultado de dos fenómenos: Absorción celular directa bajo condiciones aeróbicas y precipitación química como fosfatos de hierro y

calcio (en forma de hidroxiapatita), este último es fuertemente dependiente de las condiciones ambientales, tales como pH por encima de 8, y la presencia de iones metálicos (Ca^{+}, Fe^{+}). (González, Cañizares, & Baena, 1997) (R. Blier, G. Laliberté & J. de la Noüe, 1996). La forma en la que el fosforo es consumido por microalgas es el ortofosfato ($P\text{-}PO_4^{-3}$) (Markou & Georgakakis, 2011) y está influenciado por varios factores: La cantidad de luz en el sistema, ya que el proceso de utilización del fosforo es dependiente de la energía y su tasa de consumo será más lenta en ambientes oscuros que en ambientes luminosos (Falkner, Horner, & Simonis, 1980); el pH en el medio, pues las tasas de consumo decrecen en ambientes ácidos y en ambientes relativamente alcalinos (Rigby, Craig, & Budd, 1980); y la presencia de otras sustancias en el medio, específicamente de iones dado que la carencia de estos – como K^{+}, Na^{+} y Mg^{+} – disminuye la tasa de asimilación del fósforo (Seale, Boraas, & Warren, 1987).

Teniendo en cuenta esta información, se precisan tres elementos importantes: Ya que el pH del medio es neutro, se admite que la forma química presente del fósforo es el ortofosfato y que es justamente esta condición de ausencia de acidez y alcalinidad la que permite obtener tasas de remoción relativamente altas. Adicionalmente, los resultados obtenidos en los ensayos de remoción de fosfatos en el BRBF, se deben principalmente a la absorción celular por parte de MF y no a la precipitación química; ya que el BRBF no proporciona las condiciones necesarias para que se dé tal precipitación, como un pH mayor a 8 y presencia zonas anóxicas.

La mayor tasa de remoción promedio de fosfatos fue 15.151 mg $P\text{-}PO_4$/l-d, medida en el ensayo 1, seguida de 10.549mg $P\text{-}PO_4$/l-d h en el ensayo 4, 3.262 mg $P\text{-}PO_4$/l-d en el ensayo 2 y 2.302 mg $P\text{-}PO_4$/l-d en el ensayo 3. La disminución abrupta de la tasa de asimilación entre el ensayo 1 y 3 en el biorreactor, puede explicarse a través de: el cambio en las condiciones del medio, el contenido disponible de N y el impacto que estos elementos tienen sobre el crecimiento del organismo. Para aproximarse al comportamiento de consumo y utilización de nutrientes N-P de una microalga en un sistema, debe realizarse dicho análisis teniendo en cuenta las condiciones a las cuales fue sometida con anterioridad (Shoener, y otros, 2019), por ejemplo, si el organismo estaba previamente en condiciones suficientes de Nitrógeno aprovechable, como sucedió cuando se encontraba en medio BG-11 (proporción N/P 60:1) y pasa a condiciones de insuficiencia de este macronutriente, como las condiciones en el BRBF (proporción N/P 3.875:1), MF empezará a crecer a expensas de las reservas de fósforo almacenadas previamente (R. Blier, G. Laliberté & J. de la Noüe, 1996) y disminuirá las tasas de consumo del macronutriente en el reactor, debido a la modificación de las proporciones de N/P internas, condicionando a su vez, la velocidad de consumo y utilización del fosforo del medio. (Gardner-Dale. D.A., 2017). Es evidente, por lo tanto, que las tasas de remoción de fosfatos por parte de *Phormidium sp* son altamente dependientes de la cantidad de N disponible en el medio. Comportamiento consistente con los valores de las tasas de remoción obtenidos en la *Ilustración 23.*

En este sentido, el comportamiento de las tasas de remoción calculadas de $P\text{-}PO_4^{-3}$ se muestran en la *Ilustración 21*, donde se evidencian dos elementos principales: La aparición de tasas de remoción negativas durante el ensayo 3 (valor máximo de -3.262 mg $P\text{-}PO_4$/l-d)

seguido de un aumento (valor máximo de 17.17 mg P-PO_4/l-d); y la disminución del valor promedio de las tasas de remoción generales entre los ensayos 2 y 3, calculadas a partir del promedio de las tasas obtenidas en los intervalos comparables.

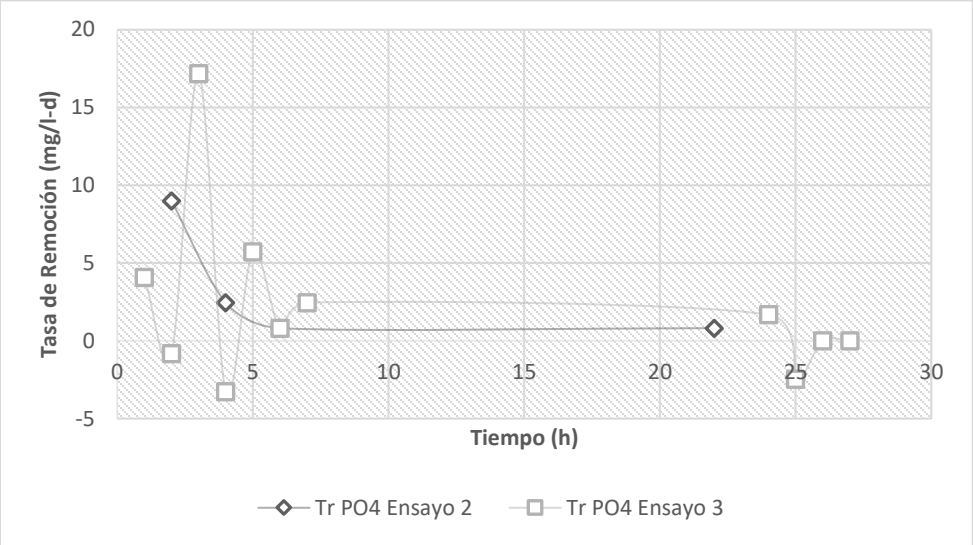


Ilustración 22. Tasas de Consumo de PO_4^{-3} Ensayos 2 - 3 en BRBF

En cianobacterias, el ortofosfato es almacenado como gránulos de polifosfatos, los cuales juegan un rol importante en la regulación del transporte de fosfato, pueden ser liberados al medio en la subsecuente muerte celular (Laliberté, Lessard, de la Noüe, & Sylvestre, 1997). Tal comportamiento puede explicar la presencia de tasas negativas al existir liberación de fosfato en el medio, mientras que el ulterior incremento en los valores de las tasas de remoción se debe al aprovechamiento de los nutrientes liberados en el proceso de muerte celular por los organismos remanentes; en un comportamiento similar al descrito por Monod en su dinámica de crecimiento de microorganismos con relación al sustrato disponible (Monod, 1949),específicamente a la fase endógena de la curva de crecimiento, lo cual es constatado con el comportamiento de crecimiento de *Phormidium sp*. durante el ensayo 3, al correlacionar los datos obtenidos en los análisis de biomasa y las tasas de remoción (datos no mostrados).

En relación al aumento de la tasa de asimilación promedio de P-PO_4^{-3} mostrada en el ensayo 4, 10.331 mg P-PO_4^{-3}/l-d cabe preponderar el cambio de escenario a la que fue sometida MF. En este último ensayo, se iniciaron las mediciones en el medio del BRFB con un periodo previo de aclimatación de los organismos en los discos en medio BG-11 durante 24 horas, transformando las proporciones de N/P de 3.875 a 63:1 del medio durante este intervalo, causa por la cual el organismo podía asimilar el fosforo de manera más eficaz. Adicionalmente, se asume que para el inicio de este ensayo las células de MF eran fosforo-deficientes debido a las bajas concentraciones de fosforo a la que había sido sometida durante los ensayos anteriores. En este sentido, cabe resaltar que las células fosforo-deficientes consumen fosfatos a tasas más altas que las células fosforo-suficientes (Prieto, Pardo, Garbisu, Llama, & Serra, 1997), por lo que el aumento de las tasas de remoción promedio y

el reporte del valor pico de consumo de fosfatos durante la investigación (58.058 mg $P\text{-}PO_4^{-3}$/l-d) presentados en el ensayo 4 puede deberse a la conjunción de estas circunstancias.

Por otro lado, se ha reportado en la literatura que las células Nitrógeno-suficientes de *Phormidium sp* no consumen fosfatos durante la ocurrencia de periodos oscuros (Garbisu, Hall, & Serra, 1993) lo que indica que las mediciones obtenidas, en términos de porcentajes de remoción al final de los ensayos, pueden corresponder a la toma y utilización de fosfatos en el periodo oscuro del fotoperiodo definido para esta investigación (12:12), al ser el medio N-insuficiente y crear esta misma condición al interior de las células (Gardner-Dale. D.A., 2017), MF sostuvo el consumo de fosfatos durante todo el tiempo de ocurrencia de los ensayos realizados.

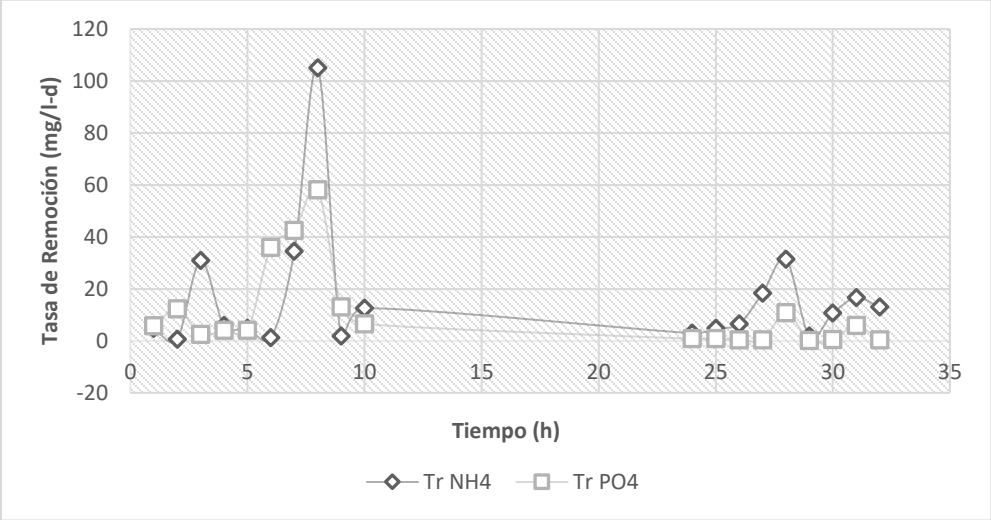


Ilustración 23. Comparación de Tasas de Remoción PO_4^{-3} - NH_4^+ en Cuarto ensayo en el BRBF

Al mismo tiempo, es necesario comparar los rendimientos obtenidos en esta investigación, en términos de las tasas de remoción de $P\text{-}PO_4^{-3}$, con otros trabajos en condiciones similares; de acuerdo a esta revisión bibliográfica, se encontró que el intervalo de resultados más comunes está entre 1.6 – 7.3 mg $P\text{-}PO_4^{-3}$/l-d (Garbisu, Hall, & Serra, 1993) (R. Blier, 1995) (R. Blier, G. Laliberté & J. de la Noüe, 1996) y el valor más alto encontrado es de 13.8 mg $P\text{-}PO_4^{-3}$/l-d (Laliberté, Lessard, de la Noüe, & Sylvestre, 1997), lo que sitúa el rendimiento medido en esta investigación por encima de estos, con una tasa de remoción promedio de 15.1514 mg $P\text{-}PO_4^{-3}$/l-d y una máxima de 58.058 mg $P\text{-}PO_4^{-3}$/l-d, reconociendo entonces unos escenarios prometedores para el tratamiento de aguas residuales.

Por último, la literatura consultada indica que las concentraciones utilizadas en esta investigación de $P\text{-}PO_4^{-3}$ para el sostenimiento de *Phormidium sp.* son insuficientes para lograr tasas de crecimiento óptimas.

8.3.4. Remoción de Amonio

Para el análisis del comportamiento de la remoción de amonio ($N\text{-}NH_4^+$) en el BRFB, se precisan primero dos elemento: (i) El orden por el cual las cianobacterias prefieren utilizar el nitrógeno en el medio es $NH_4^+ > NO_3^- > NO_2^- > N_2$ cuando se encuentran todas estas especies químicas biodisponibles al mismo tiempo y no utilizaran otras fuentes de nitrógeno hasta que todo el amonio sea consumido (Y. Su, 2012) (Markou & Georgakakis, 2011); (ii) el género *Phormidium* ha sido empleado, entre otros elementos, por su amplia tolerancia a altas concentraciones de amonio (54 mg $N\text{-}NH_4^+$/L) (R.O. Cañizares-Villanueva, 1994); en este sentido, es favorable el uso de MF para tratar aguas contaminadas con diferentes fuentes de nitrógeno y en altas concentraciones de amonio, como las especies químicas y concentraciones usadas en esta investigación.

Paralelamente, las tasas de remoción alcanzadas por *Phormidium sp*. tuvieron un rendimiento prometedor para el tratamiento de aguas residuales alcanzando un valor máximo, durante el ensayo 4, de 105 mg $N\text{-}NH_4^+$/l-d y un valor promedio de 23.138 mg $N\text{-}NH_4^+$/l-d. En este sentido se hace necesario comparar las tasas de remoción de esta sustancia con las obtenidas por otros autores en investigaciones similares, encontrando que los resultados más comunes tienen valores de 3.1 – 12.5 mg $N\text{-}NH_4^+$/l-d (Proulx, Lessard, & de la Noüe, 1994) (R. Blier, G. Laliberté & J. de la Noüe, 1996) (de la Noüe & Talbot , 1993), y los valores más altos para tasas de remoción están en el orden de 18 – 19.9 mg $N\text{-}NH_4^+$/l-d (Laliberté, Lessard, de la Noüe, & Sylvestre, 1997); por lo cual, es evidente que el rendimiento alcanzado en la presente investigación es superior a los reportados.

En relación con las implicaciones del crecimiento de MF, la literatura reporta que la concentración de biomasa algar es significativamente inferior cuando los cultivos son suplementados con amonio que cuando son suplementados con nitratos ($N\text{-}NO_3^-$) (Li, Hu, Gan, & Yang, 2010), lo que explica la diferencia en el comportamiento de la biomasa generada por *Phormidium sp.* durante los ensayos 1 y 4 donde el microorganismo se encontraba previamente en medio BG-11, cuya fuente de nitrógeno es el $NaNO_3$ en una relación nutricional N/P 60:1; y los ensayos 2 y 3, con medios suplementados con NH_4^+ como fuente de nitrógeno en una relación nutricional N/P 3.875:1 (N-insuficientes); los resultados indicaron un fuerte decrecimiento de la tasa de generación de biomasa en los intervalos de medición así como un descenso en la cantidad de biomasa general (datos no mostrados). En efecto, la disminución de la biomasa generada tiene un impacto extensivo en la cantidad de amonio removido pues, como se ha especificado anteriormente, existe una relación directa entre la cantidad de biomasa y la tasa de remoción de nutrientes, siguiendo el modelo cinético de Michaelis – Menten (Michaelis & Menten , 1913).

La literatura consultada indica que las concentraciones utilizadas en esta investigación de $N\text{-}NH_4^+$para el sostenimiento de *Phormidium sp.* son insuficientes para lograr tasas de crecimiento óptimas. Sin embargo, es necesario aclarar que si se aumentan las concentraciones de amonio en el medio para lograr proporciones N/P deseables (54:1 (R. Blier, G. Laliberté & J. de la Noüe, 1996)) con solo este compuesto, se incidiría negativamente en el crecimiento de MF, pues las concentraciones serían inhibitorias. En este

sentido, es necesario suplementar el medio con alguna otra fuente de Nitrógeno, que sitúe el contenido de macronutrientes N/P en las proporciones correctas, fomentando el crecimiento del alga y que se alcancen de las tasas máximas de remoción de manera sostenida en el cultivo; lo cual es congruente con lo expresado por (Romero Rojas, 2016) en relación a la práctica común y extendida de suplementar cultivos de microalgas, con diferentes fuentes de nitrógeno, en las plantas de tratamiento de aguas con tecnología algar en el país.

En cuanto a la metabolización del amonio por parte de MF, diversos autores indican que la ruta metabólica más importante para la utilización de este compuesto es a través del sistema enzimático glutamina-sintetasa (Chaiklahan, Nattayaporn, Wipawan, & Kalyanee, 2010) (Oliver & Ganf, 2000), la cual tiene una incidencia directa en las condiciones de cultivo de la cianobacteria ya que cuando el amonio es usado como única fuente de nitrógeno por medio de este sistema, el pH disminuye debido a la liberación de iones H^+ (Grobbelaar, 2004), lo que es congruente con la *Ilustración 23* y con los escenarios de cultivo presentados durante esta investigación pues no existió una alteración significativa del pH, permitiendo el desarrollo de todos los ensayos en condiciones neutras.

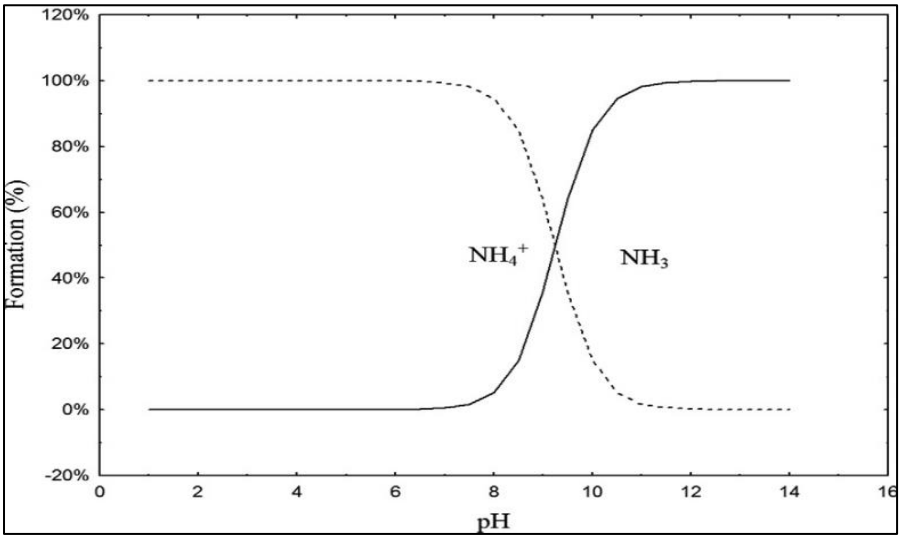


Ilustración 24. Formación de las especies amoniaco/amonio como una función del pH (G. Markou, 2011)

8.3.5. Análisis de macronutrientes y micronutrientes

Además de los nutrientes esenciales mencionados anteriormente, las cianobacterias también requieren para su crecimiento una variedad de otros macronutrientes en cantidades considerables como el calcio (Ca) y el magnesio (Mg) y potasio (K) (Travieso , Sánchez, Benitez, & Conde, 1993) (Utkilen, 1982). Los micronutrientes requeridos incluyen Molibdeno (Mo), Hierro (Fe), Níquel (Ni), Cobre (Cu), Zinc (Zn), Cobalto (Co) y Manganeso (Mn) (Reuter & Petersen, 1987) (Cavet, Borrelly, & Robinson, 2003). El medio BG-11 empleado en esta investigación se ha preparado con las instrucciones de la Universidad de Texas en Austin, en su división de colección de cultivo de algas, y se ha establecido que

contiene todos los elementos listados anteriormente. Para efectos prácticos, se asume que los contiene en cantidad suficiente para el desarrollo óptimo de MF.

8.3.6. Contaminación y competición

El crecimiento de *Phormidium sp.* se dio en cultivos monoespecíficos, pero no axénicos durante la fase de cultivo en BG-11 y en su posterior utilización en los ensayos previos y en el biorreactor. Como consecuencia, los resultados de biomasa obtenidos (datos no mostrados) con *Phormidium sp.* deben ser interpretados con prudencia ya que los cultivos fueron propensos a cierta contaminación con *Chlorella sp.* (de la Nöue & Basséres, 1989) encontraron que la contaminación de *Phormidium sp.* por otras especies de microalgas ocurre fácilmente cuando el inoculo es pequeño, lo que podría explicar la contaminación de los medios usados en los *ensayos previos* con *Chlorella sp.*, pues la cantidad de MF en cada frasco era limitada.

Como seguimiento a este suceso, se realizaron muestreos rutinarios durante los ensayos en el BRBF y se analizaron por microscopia, encontrando que los niveles de contaminación por esta especie de microalga disminuyeron drásticamente, al punto de no encontrar ningún individuo de *Chlorella sp.* en los muestreos. Esto puede explicarse de dos maneras: (i) Las condiciones de cultivo empleadas estaban diseñadas especialmente para *Phormidium sp.*, por lo que el crecimiento de *Chlorella sp.* era restringido y no le era posible competir con MF y, (ii) La inmovilización del cultivo: (de la Nöue & Basséres, 1989) y (Sánchez, Travieso, & Weiland, 1995) establecieron que la contaminación de cultivos de *Phormidium sp.* por parte de otras especies de microalgas es completamente eliminada si se emplean cultivos inmovilizados en diferentes tipos de soportes, con mejores resultados en Quitosano y en matrices de polímeros plásticos, como el empleado en la construcción de los biodiscos (PETG) durante esta investigación.

8.3.7. Luz

Como se ha indicado anteriormente, los bioprocesos que hacen posible el tratamiento de aguas contaminadas por parte de *Phormidium sp.* son altamente dependientes de la energía. La cantidad de luz disponible en el sistema y susceptible de aprovechamiento, medida en la superficie exterior de la tapa del BRBF, fue de 4000 lux provenientes de un bombillo incandescente de luz blanca – 56 $\mu E/m^2s$ – que, según varios autores, es una cantidad relativamente baja para el cultivo de este tipo de microorganismo pues los valores nominales habitualmente usados son del orden de 80 – 165 $\mu E/m^2s$ (5920 – 12210 Lux) (R. Blier, 1995) (R. Blier, 1995) (A. Dumas, 1998). Adicionalmente, es importante aclarar que las mediciones realizadas en el BRBF fueron hechas durante la fase oscura del fotoperiodo establecido para esta investigación (12:12).

En este contexto, es posible que la conjunción de estas dos condiciones fueran determinantes para el desarrollo de *Phormidium sp.* (y de la eficiencia de sus bioprocesos) así como de los resultados reportados. Llama la atención que las tasas de remoción obtenidas para los macronutrientes N-P sean ya superiores a las encontradas en la literatura consultada, por lo

cual es posible que los rendimientos que pueden ser alcanzados, mediante la implementación de esta tecnología, sean mayores a los logrados y/o reportados en esta investigación.

9. CONCLUSIONES

Se demostró la capacidad de una cepa de microalga filamentosa dispuesta en un Biorreactor Rotativo de Biopelícula Fija para la remoción de amonio ($N\text{-}NH_4^+$) y de fosfato ($P\text{-}PO_4^{-3}$). La disposición de MF en el BRBF tuvo un impacto positivo sobre las tasas y nivel de remoción de amonio y fosfato, se obtuvieron rendimientos de 99.056% para NH_4^+ y de 97.448% para PO_4^{-3}, superiores a los comúnmente logrados en el tratamiento de aguas residuales con tecnología algar y los encontrados en la literatura consultada: del orden de 46% para NH_4^+ y de 52% para PO_4^{-3}.

La presencia de $NaNO_3$ potenció las tasas y nivel de consumo de amonio. La cantidad de biomasa inicial es importante cuando MF no cuenta con $NaNO_3$ en el medio.

El *Análisis de evaporación de amonio* permitió demostrar que, en las condiciones *in vitro* del ensayo: ±22°C, humedad relativa de 45-55% y presión atmosférica de 560 mmHg; la pérdida por volatilización de NH_4^+ es mínima (3.99%, máximo) y que dichas pérdidas guardan cierta proporción con la concentración inicial.

Se redujo la contaminación por bacterias y otras cianobacterias presentes en cultivos de producción gracias a algunas consideraciones de diseño como: técnica de inmovilización, material de construcción y selectividad del medio.

El Tereftalato de Polietileno Glycol-modificado (PETG) resultó ser un material efectivo para la construcción del biorreactor: es un material inerte, resistente, liviano y flexible que permite un crecimiento denso y homogéneo de organismos filamentosos.

La construcción de biorreactores con tecnología de impresión 3D resultó ser clave para los resultados obtenidos en la investigación. La impresión 3D emplea una técnica de tejido que le permitió a MF crecer y sujetarse de manera homogénea, gracias a las hebras que constituyen cada una de las piezas impresas. No existen precedentes bibliográficos, pero es un aporte clave en esta investigación.

10. RECOMENDACIONES

1. **Tipo de reactor**

Se recomienda evaluar la pertinencia y eficiencia del BRBF en flujo continuo y semicontinuo.

2. **Modelización**

Desarrollar el modelo matemático que permita perfilar el comportamiento del BRBF en diferentes escenarios, tamaños, cargas de biomasa y concentración de nutrientes.

3. **Diseño del contenedor**

- Se sugiere evaluar otro material para la construcción del BRBF, ya que el acrílico es un material sensible a la deformación y cualquier tipo de intervención le hace más frágil.
- Un ensayo sin tapa permitiría determinar pérdidas por evapotranspiración del medio y de amonio.
- Se recomienda evaluar la geometría del contenedor de tal forma que los biodiscos encajen en un sistema de semicírculo.
- Se recomienda que el contenedor del medio de cultivo en el biorreactor sea fabricado con un material que no permita el paso de luz.

4. **Condiciones de luz**

Según la bibliografía, la luz es un factor que condiciona la efectividad con la cual las cianobacterias consumen nitrógeno y fósforo, así que se recomienda llevar a cabo el ensayo con diferentes intensidades lumínicas.

5. **Uso de aguas industriales**

Se recomienda evaluar la metodología propuesta en aguas con altas concentraciones de amonio y fosfatos.

6. **Biomasa**

- Determinar la capacidad de carga de biomasa en los biodiscos, en términos de formación de biopelícula de cada disco.
- Establecer la vida útil de los biodiscos, en términos de viabilidad de la biomasa.

11. BIBLIOGRAFÍA

A. Dumas, G. L. (1998). Biotreatment of fish farm effluents using the cyanobacterium Phormidium Boneri . *Aquacultural Engineering*, 57 - 68.

Abe, K., Bito, T., Sato, A., & Aburai , N. (2014). Effects of light intensity and magnesium supplementation in pretreatment cycle on ammonium removal from wastewater of photobioreactor using a biofilter composed of the aerial microalga Trentepohlia aurea. *Springer Science+Business Media Dordrecht* , 341-347.

Abeliovich, A., & Azov, Y. (1976). Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds. *Appl. Eviron. Microbiol. 31*, 801-806.

Acevedo , S., Pino , N., & Peñuela , G. (2017). Remoción de nitrógeno, fósforo y producción de biomasa de Scenedesmus sp en agua residual domestica. *Revista científica y tecnológica - Universidad del Valle.*

Amaral, M. d. (2011). Tratamiento de aguas residuales con microalgas en reactores abiertos. *Universidad de Almería* .

Amaral, M. d. (18 de Noviembre de 2016). *Tratamiento de aguas residuales con microalgas en reactores abiertos.* Universidad de Almería. Obtenido de http://cms.ual.es/UAL/estudios/doctorado/tesis/tesisdoctoral/DOCTORADO8903?plan=8903&anyo=2016-17&exp_numord=28&tes_codnum=1&idioma=es

APHA. (1980). *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*. Washington D.C.: American Public Health Association.

Bagchi, S. N., & Kleiner , D. (1991). Interrelationship between hydrogen peroxyde, ammonia, glutamine, hydroxylamine and nitrite metabolism in the cyanobacterium Phormidium uncinatum. *Archives of Microbiology (Springer-Verlag)*, 367-369.

Basséres, J. d. (1989). Biotreatment of Anaerobically Digested Swine Manure with Microalgae. *Biological Wastes*, 17 - 31.

BITFAB. (2019). *Todo sobre el PETG en impresión 3D*. Obtenido de https://bitfab.io/es/blog/petg-impresion-3d/

Carreño, C. L. (2016). *Biotecnología ambiental de aguas y aguas residuales.* Lima: ECOE.

Cavet, J. S., Borrelly, G. P., & Robinson, N. J. (2003). Cu and Co in cyanobacteria: selective control of metal availability. *FEMS Microbiol. Rev.*, 165-181.

Chaiklahan, R., Nattayaporn, C., Wipawan, S., & Kalyanee, P. (2010). Cultivation of Spirulina platensis using pig wastewater in a semicontinuous process. *J. Microbiol.Biotechnol.*, 20:609-14.

Converti, A., Convertí, S., & Lodi, A. (2005). Ammonium and urea removal by Spirulina platensis. *Microbiol Biotechnol*, 8-16.

de la Nöue, J., & Basséres, A. (1989). Biotreatment of Anaerobically Digested Swine Manure with Microalgae. *Biological Wastes*, 17 - 31.

de la Noüe, J., & Talbot , J. (1993). Tertiary treatment of wastewater with Phormidium Bohneri (Schmidle) under various light and temperature conditions. *Wat. Res. Vol 27*, 153-159.

Droop, M. (1968). Vitamin B12 and marine ecology. IV. The kinetics of uptake, growth and inhibition in Monochrysis lutheri. *Journal of Marine Biology Association U.K.*, 689-733.

EcuRed. (2018). *Alteración del Ciclo del Agua*. Obtenido de https://www.ecured.cu/Alteraci%C3%B3n_del_ciclo_del_agua

Estrada , M., Torres-Idavoy, D., Padrón-Morales, S., Valdés-Hernández, J., Díaz-Martínez, M., & Bonilla-Hernández, M. (2015). Application of Neesler reagent in the ammonium quantification used in the fermentations of biotechnology product. *Vaccimonitor vol.24*.

Falkner, G., Horner, F., & Simonis, W. (1980). The regulation of the energy-dependent phosphate uptake by blue-green alga Anacystis nidulans. *Planta*, 149:138-43.

G. Laliberté, P. L. (1997). Effect of Phosphorus addition on nutrient removal from wastewater with the cyanobacterium Phormidium Bohneri. *Bioresourse Technology*, 227 - 233.

G. Markou, D. G. (2011). Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy*, 3389-3401.

Garbisu, C., Hall, D. O., & Serra, J. L. (1993). Removal of phosphate by foam-inmovilized Phormidium laminosum in batch in batch and continuos-flow bioreactors. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 181-189.

Gardner-Dale. D.A., I. J. (2017). Influence of solids residence time and carbon storage on nitrogen and phosphorus recovery by microalgae across diel cycles. *Water Resources*, 231-239.

González, L. (2016). Nitrógeno amoniacal, importancia de su determinación. *Mente y Materia*, 12-13.

González, L., Cañizares, R., & Baena, S. (1997). Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae Chlorella Vulgaris and Scenedesmus Dimorphus. *Bioresourse Technology*, 259-262.

Grobbelaar, J. U. (2004). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. *Algal nutrition*, 97-115.

HACH COMPANY. (2000). *MANUAL DE ANALISIS DE AGUA.* Loveland: Hach Company.

HAMMER. (1977). *Water and Wastewater Technology.* Wiley.

IDEAM . (2018). *Estudio Nacional del Agua.* Bogotá.

Idelovich, E., & Michail, M. (1981). Nitrogen removal by free ammonia stripping from high pH ponds. . *J. Water Pollut.*, 1391-1401.

Jonte, L., Rosales Loaiza, N., Bermudez Gonzalez, J., & Morales , E. (2013). Cultivos discontinuos alimentados con urea de la cianobacteria Phormidium sp. en función de la salinidad y edad del cultivo. . *Revista Colombiana de Biotecnología* , 38-46.

Komárek, J. (2008). *Cyanoprokaryota.* Springer Spektrum.

L. González, R. C. (1997). Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae Chlorella Vulgaris and Scenedesmus Dimorphus. *Bioresourse Technology*, 259-262.

L. Travieso, E. S. (1995). Final treatment for cattle manure using immobilized microalgae. I. Study of the support media. *Resourses, Conservation and recycling*, 167-175.

La República . (16 de Marzo de 2018). Solamente 48.2% de los municipios cuentan con plantas de tratamiento de aguas residuales . pág. 1.

Laliberté, G., Lessard, P., de la Noüe, J., & Sylvestre, S. (1997). Effect of Phosphorus addition on nutrient removal from wastewater with the cyanobacterium Phormidium Bohneri. *Bioresourse Technology*, 227 - 233.

Li, X., Hu, H., Gan, K., & Yang, J. (2010). Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalga Scenedesmus sp. LX1 under different kinds of nitrogen sources. *Ecol. Eng.*, 379-381.

Markou, G., & Georgakakis, D. (2011). Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy*, 3389-3401.

MERCK. (s.f.). *Reactivo de Vanadato Molibdato*. Obtenido de https://www.merckmillipore.com/CO/es/product/Vanadate-molybdate-reagent,MDA_CHEM-108498

Metcalf & Eddy. (1979). *Wasteeater Engineering: Treatment, Disposal, Reuse, 2° edición.* McGraw Hill.

Michaelis, L., & Menten , M. L. (1913). Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem*, 333-369.

Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Annu. Rev. Microbiol.*, 371-394.

noemagico. (12 de Septiembre de 2006). *La investigación Descriptiva*. Obtenido de https://noemagico.blogia.com/2006/091301-la-investigaci-n-descriptiva.php

Oliver, R. L., & Ganf, G. G. (2000). The ecology of cyanobacteria: Their diversity in time and space. *Freshwaters blooms*, 94-149.

P. Talbot, J. d. (1993). Tertiary treatment of wastewater with Phormidium Bohneri (Schmidle) under various light and temperature conditions. *Wat. Res. Vol 27*, 153-159.

Prieto, B., Pardo, M. A., Garbisu, C., Llama, M. J., & Serra, J. L. (1997). Phosphate uptake by phosphorus-starved cells of the cyanobacterium Phormidium laminosum. *World Journal Microbiological Biotechnology*, 699-705.

Proulx, D., Lessard, P., & de la Noüe, J. (1994). Traitement tertiaire d'un effluent domestique secondaire par culture intensive de la cyanobacterié Phormidium bohneri. *Enviromental Technology*, 449-458.

Püts, P. (2014). *Analítica de laboratorio y sistema de control de proceso nutrientes: fosfato.* United For Water Quality .

R. Blier, G. L. (1995). Tertiary treatment of cheese factory anaerobic effluent with Phormidium Bohneri and Micractinium Pusillum. *Bioresourse Technology*, 151-155.

R. Blier, G. Laliberté & J. de la Noüe. (1996). Production of the Cyanobacterium Phormidium Bohneri in parallel with Epuration of a Dairy Anaerobic Effluent. *Process Biochemistry Vol. 31*, 587-593.

R.O. Cañizares-Villanueva, A. R.-L. (1994). Phormidium treatment of anaerobically treated swine wastewater. *Wat. Res. Vol. 28*, 1891 - 1895.

Reuter, J. G., & Petersen, R. R. (1987). Micronutrient effects on cyanobacterial growth and physiology. *New Zeal. J. Mar. Freshwater Res.* , 435-445.

Rigby, C., Craig, S., & Budd, K. (1980). Phosphate uptake by Synechococcus leopoliensis (Cyanophyceae): Enhancement by calcium ion. *J. Phycol.*, 16:389-39.

Rojas, J. A. (2016). *Tratamiento de aguas residuales. Teoría y principios de diseño.* Bogotá: Editorial Escuela Colombiana de Ingeniería.

Rojas, J. R. (2016). *Tratamiento de aguas residuales domésticas.* Bogotá: Escuela de Ingenieros Julio Garavito.

Romero Rojas, J. A. (2016). *Tratamiento de aguas residuales: Teoría y principios de diseño.* Bogotá: Escuela Colombiana de Ingeniería.

Sánchez, E., Travieso, L., & Weiland, P. (1995). Final treatment for cattle manure using immobilized microalgae I Study of the support media. *Resourses, Conservation and recycling*, 167-175.

Seale, D. B., Boraas, M. E., & Warren, G. J. (1987). Effects of sodium and phosphate on growth of cyanobacteria. *Water Res.*, 21:625-31.

Shoener, B. D., Schramm, S. M., Béline, F., Bernard, O., Martínez, C., Plósz, B. G., . . . Guest, J. S. (2019). Microalgae and cyanobacteria modeling in water resourse recovery facilities: A critical review. *Water Research*.

Sterner, R. W., & Elser, J. J. (2002). Ecological Stoichiometry: The Biology of Elements from Molecules. *Princeton University Press*.

Travieso , L., Sánchez, E. P., Benitez, F., & Conde, J. L. (1993). Arthospira sp. intensive cultures for food and biogas purification. *Biotechnol. Lett.*, 1091-1094.

Universidad Nacional del Nordeste. (2010). *Hipertextos del Área de la Biología*. Obtenido de Ciclos Biogeoquímicos: http://www.biologia.edu.ar/ecologia/CICLOS%20BIOGEOQUIM.htm

Uribe, F. H. (2016). *Efecto de la deficiencia de nitrógeno y la radiación UV en la actividad fotosintética y en los compuestos antioxidantes de las cianobacterias Spirulina (Arthrospira) maxima y Phormidium persicinum.* La Paz, Baja California Sur.

US EPA. (1996). *Safe Drinking Water Act.*

UTEX. (Marzo de 2009). *UTEX Culture Collection of Algae at The University of Texas at Austin*. Obtenido de http://web.biosci.utexas.edu/utex/Media%20PDF/bg-11-medium.pdf

Utkilen, H. C. (1982). Magnesuim-limited growth of the cyanobacterium Anacystis nidulans. *J. Gen. Microbiol.*, 1849-1862.

Villaseñor Camacho, J., Fernández Marchante, C. M., & Rodríguez Romero, L. (2018). Análisis de un fotobiorreactor que se amplía para el tratamiento de aguas residuales terciarias: desnitrificación, eliminación de fósforo y producción de microalgas. *Environmental Science and Pollution Research*.

Vogel, A. (1953). *Química analítica cualitativa.* Buenos Aires: Kapelusz.

VWR. (s.f.). *Reactivo de Nessler, Supelco*. Obtenido de https://es.vwr.com/store/product/826309/reactivo-de-nessler-supelco

Wang, J.-H., Zhuang, L.-L., Xu, X.-Q., Deantes-Espinosa, V., Wang, X.-X., & Hu, H.-Y. (2018). Microalgal attachment and attached systems for biomass production and wastewater treatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 331-342.

Wetzel, R. G. (1983). *Limnology 2nd Edition.* USA: Saunders College Publishing.

World Water Forum. (2018). *Worl Water Council* . Obtenido de https://www.worldwatercouncil.org/es/brasilia-2018

Y. Su, A. M. (2012). Comparison of nutrient removal capacity and biomass settleability of four high-potencial microalgal species. *Bioresourse Technology*, 157-162.

Zarza, L. F. (20 de Junio de 2017). *Fondo para la comunicación y la educación ambiental, A.C.* Obtenido de https://agua.org.mx/desertificacion-sequia-la-otra-cara-del-agua/

12. ANEXOS

12.1. ANEXO 1

Tabla 15. Curva calibración NH4+: Precisión y exactitud

CURVA DE CALIBRACIÓN NH_4^+						Longitud de onda		425 nm
Concentración (mg/L)	**Absorbancia**				**Promedio**	**Desv. Est.**	**Precisión (C.V. (%))**	**Exactitud (%)**
0	0	0	0	0	0	0	-	-
10	0.2	0.189	0.205	0.195	0.197	0.007	3.473	99.986
20	0.401	0.398	0.405	0.365	0.392	0.018	4.689	100.961
30	0.598	0.58	0.615	0.625	0.605	0.020	3.271	102.023
40	0.761	0.799	0.759	0.709	0.757	0.037	4.876	102.785
50	0.906	0.833	0.873	0.91	0.881	0.036	4.060	103.403

12.2. ANEXO 2

Tabla 16. Curva calibración PO4-3. Precisión y exactitud.

CURVA DE CALIBRACIÓN PO_4^{-3}						Longitud de onda		420 nm
Concentración (mg/L)	**Absorbancia**				**Promedio**	**Desv. Est.**	**Precisión (C.V. (%))**	**Exactitud (%)**
0	0	0	0	0	0	0	-	-
5	0.098	0.1	0.103	0.092	0.098	0.005	4.729	99.491
15	0.226	0.231	0.217	0.235	0.227	0.008	3.416	100.136
25	0.352	0.361	0.333	0.345	0.348	0.012	3.397	100.739
35	0.475	0.48	0.496	0.461	0.478	0.014	3.022	101.390

12.3. ANEXO 3

Tabla 17. Desviación estándar por promedio multiensayo. Análisis de dispersión estadística para ensayos por triplicado.

ID	1	2	3	4	5	6	1L	2L	3L	4L	5L	6L
Medio	BG11	BG11-NP	BG11-NP	BG11-NP	BG11	BG11	BG11	BG11-NP	BG11-NP	BG11-NP	BG11	BG11
Desv. promedio	0.00	0.11	0.18	0.21	0.13	0.21	0.00	0.10	0.11	0.12	0.14	0.22

12.4. ANEXO 4

Tabla 18. Coeficiente de variación de promedio multiensayo. Ensayos Previos por triplicado.

ID	1	2	3	4	5	6	1L	2L	3L	4L	5L	6L
Medio	BG11	BG11-NP	BG11-NP	BG11-NP	BG11	BG11	BG11	BG11-NP	BG11-NP	BG11-NP	BG11	BG11
Desv. promedio	0.00	0.03	0.01	0.01	0.02	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.11	0.01