



**UNCUYO**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DE CUYO



# **Cultivo de consorcio microalgal autóctono y biorremediación de efluentes urbanos**

---

**Tesis de la carrera Ingeniería en Recursos Naturales Renovables**

Directora: Dra. Stela Maris Da Silva  
Co-directora: Mic. Carolina Belén García

**Tesista: Ana Soledad Lucero**

**Marzo de 2015**



**IMD**  
INSTITUTOS  
MULTIDISCIPLINARIOS



**func**  
FUNDACION UNIVERSIDAD  
NACIONAL DE CUYO



# CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

## ÍNDICE

1.	RESUMEN .....	4
2.	INTRODUCCIÓN .....	6
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3.1.	Microalgas y Condiciones de Cultivo .....	11
3.2.	Efluentes .....	12
3.3.	Diseño Experimental .....	12
3.4.	Procedimientos .....	14
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	20
4.1.	Biomasa Seca Total.....	20
4.2.	Lípidos .....	30
4.3.	Biorremediación .....	35
5.	CONCLUSIONES.....	55
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

# CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

## TESIS DE GRADO DE LA CARRERA INGENIERÍA EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES

**Título:** Cultivo de consorcio microalgal autóctono y biorremediación de efluentes urbanos.

**Tesista:** Ana Soledad Lucero.

**Ubicación o lugar de trabajo (Procedencia):** Laboratorio de algas. Instituto Multidisciplinario. Dirección: Calle Padre Contreras 1300. Parque Gral. San Martín. Ciudad. CP: 5500.

### **Agradecimiento**

Gracias al equipo del laboratorio de algas: Stela, Carolina, Jorge, Ani, Abi, Guillermo y Ramiro, por darme todo su apoyo y buena voluntad.

Gracias a las instituciones que hicieron posible este proyecto: a la Universidad Nacional de Cuyo, a la Facultad de Ciencias Agrarias, al Instituto Multidisciplinario, a la municipalidad de Catamarca y a BIOCROM.

Le agradezco a mis familiares a Diego, a mis padres, hermanos y a mis amigos por apoyarme y acompañarme en este camino.

# CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

## 1. RESUMEN

En el presente trabajo se muestran los resultados experimentales obtenidos del cultivo del consorcio de microalgas (*Chlorella sp* y *Scenedesmus sp.*) empleando el efluente urbano pretratado proveniente de la planta de tratamiento cloacal “La Viñita”, Provincia de Catamarca, Argentina.

Los objetivos se orientan a caracterizar el consorcio de microalgas autóctonas en cuanto a la relación de la producción de biomasa y lípidos, en condiciones controladas de cultivo, en efluentes urbanos provenientes de la planta de tratamiento de líquidos cloacales “La Viñita” y analizar la eficiencia del proceso biorremediador realizado por las microalgas, considerando la eficiencia de los tratamientos, en relación a los parámetros que corresponden a días de cultivo, estado del consorcio y propiedades físico-químicas del sobrenadante.

Se emplearon tres variables (% de Inóculo, % de medio nutricional e inyección de CO<sub>2</sub>), el ensayo se realizó a lo largo de 12 días de cultivo “*indoor*”. Se analizaron los datos de producción de biomasa en cada tratamiento, se determinó la concentración de lípidos presentes en la biomasa y se hizo observación microscópica de los distintos tratamientos al finalizar el ensayo y un seguimiento macroscópico durante el ensayo. Se eligieron los tratamientos eficientes en términos de biomasa y lípidos. En todos los casos se empleó fotoperiodo 12 hs/12 hs, sin control de esterilidad y con agitación manual. Sobre cada muestra se realizaron las determinaciones de biomasa, lípidos y pH.

Considerando los aspectos de desarrollo de las microalgas y los parámetros físico-químicos, los resultados obtenidos indicaron que los tratamientos con inyección de CO<sub>2</sub> alcanzaron mayor productividad de biomasa algal y lípidos.

En las condiciones de 20% de inóculo, inyección de CO<sub>2</sub>, empleo de efluente con refuerzo de medio nutricional se obtiene en 3 días: 58 mg/L de biomasa y la producción más alta del ensayo en cuanto a lípidos (16,8 mg/L). En cuanto al proceso biorremediador se observó que disminuyó la concentración de DBO<sub>5</sub> en un 63,63 %, la de DQO en un 51,8 %, la de nitratos en un 38 % y aumentó la cantidad de fosfato, lo que podrá ser corregido con modificaciones en las concentraciones de sales en el medio de cultivo. El efluente resultante no presenta riesgo de sodicidad por lo que podría ser utilizada para riego. Se observó un cambio de color (de verde claro a verde oscuro) y se confirmó con la observación microscópica la predominancia de *Chlorella sp.* en un 90 %, la presencia de rotíferos en baja cantidad y

## CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

ausencia de otras microlagas no deseadas como filamentosas y diatomeas. No se detectó la presencia de huevo de helmintos.

**Palabras clave:** biomasa, lípidos, biocombustibles, efluentes urbanos, biorremediación, consorcio de microalgas.

# CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

## 2. INTRODUCCIÓN

Los efluentes cloacales de la ciudad de San Fernando del Valle de Catamarca son tratados en la Planta de Tratamiento de Líquidos Cloacales (PTC) denominada “La Viñita” (Figura 1), que cuenta con seis módulos de lagunas de estabilización. Cada módulo consiste en una laguna anaeróbica, seguida de una laguna facultativa y posteriormente, lagunas de maduración en tres etapas. La superficie total de las lagunas es de 70 Ha y el caudal aproximado de entrada a la planta es de 2200 m<sup>3</sup>/h (García y col., 2012).



Figura 1: Ubicación geográfica de “La Viñita”, Catamarca.

El efluente proveniente de “La Viñita”, una vez tratado, es vertido al Río Santa Cruz que deriva en el Río del Valle (Figura 1). Las características del efluente cumplimentan con el Art. 2° de la Ley 25.675 que establece que la calidad de los líquidos residuales debe ajustarse a los parámetros establecidos por la normativa vigente en la Provincia en la que se aplique la normativa. En Catamarca la Resolución que aplica es la N°65/2005 y tiene en cuenta la Ley Nacional N° 25.675 de Política Ambiental; la Ley Nacional N° 24.051 de Residuos Peligrosos y su Decreto Reglamentario 831/93; la Ley Provincial N° 4865/94 de Adhesión a la Ley Nacional N° 24.051 y el Decreto Reglamentario G y J. N° 473/01; la Ley Provincial de Aguas N° 2577, el Decreto G y J N° 895/99 y el Decreto Acuerdo N° 892/96. De acuerdo con la Resolución N° 65/2005, que establece en el Título C las condiciones físico-químicas y biológicas necesarias para el vuelco directo de efluentes cloacales tratados a curso de agua

## **CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS**

superficial, el efluente obtenido en la PTC cumple con los valores de la normativa. Es por ello que actualmente se realiza el vuelco del efluente en el Río Santa Cruz.

Sin embargo, el efluente en cuestión presenta macronutrientes como nitratos y fosfatos que si se acumulan en lagos o cuerpos de agua producen la eutrofización de los mismos. Entre los problemas ambientales de lagos y embalses, la eutrofización es uno de los más frecuentes. Este fenómeno que se define como un proceso de deterioro de la calidad del recurso, se origina por el enriquecimiento en nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo, condicionando la utilización de los mismos y ejerciendo grandes impactos ecológicos, sanitarios y económicos a escala regional (Girão y col., (2007); Stefouli y col., (2005)). Estos elementos limitantes del crecimiento han sido identificados como causante de los problemas de eutrofización cultural, ya que se han identificado que entre 70-80 % del nitrógeno y fósforo que llegan al agua superficial en el mundo son de origen antrópico. Por otro lado los nitritos son considerados especies tóxicas, ya que si se combinan con la hemoglobina en sangre se forma metahemoglobina, este tipo de hemoglobina tiene una enorme afinidad por el oxígeno y no lo cede en los tejidos, es decir, impide la unión reversible con el oxígeno molecular, produciendo la enfermedad denominada metahemoglobinemia (síndrome del bebé azul). Otro problema al que se asocia al nitrito es a la formación de nitrosaminas, compuestos cancerígenos en animales y con incidencia en cáncer de estómago en humanos (Barrenetxea y col., 2003).

En este trabajo, se propone hacer uso del efluente, antes de mezclarlo con el agua de río, con el objetivo de minimizar el contenido de macronutrientes y obtener otros productos (biomasa algal de la cual se extraen lípidos para biocombustibles). Esta alternativa propuesta permite darle otro uso y mejorar la calidad del efluente.

Desde el punto de vista ecológico, es importante destacar que los vertidos de aguas residuales son fuente de la mayor parte de la contaminación antropogénica que puede hallarse en las aguas naturales y es por ello que el control de esta contaminación mediante la depuración o tratamiento de dichas aguas constituye un aspecto fundamental (Barrenetxea y col., 2003). Para lograr el reciclaje de las aguas residuales es necesario realizar la eliminación de los compuestos que impactan en el ambiente. Según Toti y col., (2001) una opción es la descontaminación biológica que consiste en estimular los fenómenos naturales de desarrollo de los microorganismos y al acelerar el metabolismo, se agiliza el consumo de los contaminantes que se toman del medio. Este proceso utiliza las habilidades catalíticas de los

## **CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS**

organismos vivos para degradar y transformar contaminantes, tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos, y presenta un enorme potencial en la mitigación de la contaminación ambiental. Entre estos organismos podemos citar a las algas.

La capacidad depuradora de las algas, cuando son cultivada en aguas residuales humanas, ya ha sido probada (Valderrama y col., (2002)) y se ha avanzado en las demostración de los diferentes aspectos que ello implica, como el tratamiento biológico, mediante la conversión de los nutrientes presentes, en biomasa algal (Romero, (2005); Salazar, (2006); Kamilya y col., (2006); Chindah y col., (2007)). Otros trabajos como el de Charpy y col., (2004) sugieren el uso de efluentes como suplemento reutilizable para cultivo de microalgas.

De acuerdo con Illman y col., (2000); Scragg y col., (2002); Chisti, (2007); Brennan y Owende, (2010); Chen, (2011), las microlagas son reconocidas como una fuente de abastecimiento para la generación de combustibles de tercera generación, éstas tienen el potencial para generar cantidades significativas de biomasa y aceites convertibles a biodiesel y son fuente de energía, ya sea por la extracción de lípidos, por quema directa en calderas, por la producción de biogás o por otras alternativas energéticas (García y col., 2012).

El uso del cultivo de microalgas con el doble propósito de realizar el tratamiento de aguas residuales y la obtención de biocombustibles es una opción atractiva para la reducción de los costos en energía, fertilizantes y agua dulce, así como la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero (Pittman y col., (2011), Olguín. E. (2012)). Las principales ventajas del sistema planteado son: la renovabilidad del mismo, el uso de energía solar, el consumo de CO<sub>2</sub>, la remoción de microorganismos patógenos, de metales pesados, de compuestos orgánicos tóxicos y la obtención de biomasa (De Philippis y col., (2002); Choonawala y Swalaha, (2002); Larsdotter y col., (2002); Hanuk y Acoul-Gyun, (2002)). Las microalgas tienen tasas de crecimiento mayores que las plantas, permiten el uso de tierras no cultivables con lo que evitan el desplazamiento de cultivos alimenticios, permiten el uso agua no potable, la producción no es estacional y se puede cosechar a diario (Gouveia L, 2009).

De acuerdo con Khowaja, (2000) y Riquelme y Avendaño, (2003) la composición de las aguas residuales permiten sostener el metabolismo de ciertos microorganismos fotosintéticos; donde la digestión aerobia de la materia orgánica mediada por bacterias se mantiene gracias al oxígeno producido por las microalgas, las cuales incorporan los compuestos residuales de la oxidación generando un proceso depurativo eficaz. Este proceso se permite al utilizar

## **CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS**

consorcios de microalgas en condiciones no axénicas, en lugar de, cepas aisladas y en condiciones de esterilidad.

La mitigación de uno de los gases de efectos invernadero, el CO<sub>2</sub>, se puede concretar gracias al consumo del mismo en el metabolismo fotosintético de las algas (Illman y col., (2000); Chisti, (2007); Pittman y col., (2011)). El potencial para ser utilizadas como agente fijador de CO<sub>2</sub> se debe a que toleran altas concentraciones de este gas disuelto en el agua de cultivo (Stepan y col., (2002); Campbell y col., (2009); Kumar y col., (2010)) lo cual permite mitigar emisiones por captura del CO<sub>2</sub> presente en gases de chimenea industrial, entre otros (citado en García y col., 2012).

El autor Chisti, (2007) afirma que la biomasa algal permite la extracción de metabolitos secundarios aprovechables como materia prima en la industria agrícola y como fuente alternativa de energía. Scragg y col., (2002); Chisti, (2007); Pittman y col., (2011) opinan que la biomasa algal, también puede ser utilizada directamente (en combustión) o procesada para generar combustibles líquidos o gaseosos por una gran variedad de procesos de conversión bioquímicos o termoquímicos. Según Wilkie y col., (2002); Travieso y col., (2006) la biomasa puede ser utilizada como aditivo para alimento animal, fertilizantes de liberación lenta y materia prima para biodiesel.

Kumar y col., (2010), realizaron el Análisis de Ciclo de vida (ACV) y confirmaron que, el uso de aguas residuales para la producción de biocombustibles con microalgas, es un enfoque muy útil para asegurar la viabilidad económica y la sostenibilidad de todo el proceso de producción de biocombustible. Este análisis se realiza con un enfoque de sistemas y tiene como objetivo evaluar la carga ambiental asociada a todo el ciclo de vida del producto de interés (por ejemplo, biomasa proveniente de microalgas) para evitar problemas de desplazamiento entre las etapas del ciclo de vida y para identificar las oportunidades de innovación tecnológica). Según la normativa ISO 14040, el ACV es una compilación y evaluación de las entradas y salidas y los impactos ambientales potenciales de un sistema de producto a lo largo de su ciclo de vida (Pfromm y col., 2011).

Teniendo en cuenta la situación planteada se propuso el empleo de un consorcio de microalgas, como alternativa de saneamiento, donde se busca incorporar a la planta de tratamiento de efluentes urbanos “La Viñita”, una planta de cultivo de microalgas para completar el saneamiento del agua y obtener biomasa algal como un subproductos del cual

## CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

puede extraerse lípidos y otros subproductos microalgales que agreguen valor al sistema propuesto.

Hipótesis de trabajo 1: Las características físico-químicas y biológicas del medio de cultivo del consorcio de microalgas condicionan el crecimiento biomásico y la producción de lípidos para producción de biocombustibles.

Hipótesis de trabajo 2: Es posible mejorar la calidad del agua del efluente elegido, disminuyendo su potencial riesgo ambiental, utilizando el consorcio de microalgas autóctono, crecido en ausencia de esterilidad.

### Objetivos generales

- Caracterizar el consorcio de microalgas autóctonas en cuanto a la relación de la producción de biomasa y lípidos, en condiciones controladas de cultivo, en efluentes urbanos provenientes de la planta de tratamiento de líquidos cloacales “La Viñita”.
- Analizar la eficiencia del proceso biorremediador realizado por las microalgas, considerando la eficiencia de los tratamientos, en relación a los parámetros que corresponden a días de cultivo, estado del consorcio y propiedades físico-químicas del sobrenadante.

### Objetivos específicos

- Cuantificar por medio de la producción de biomasa, el crecimiento del consorcio de microalgas durante 12 días de cultivo “*indoor*”.
- Contabilizar la producción de lípidos presentes en la biomasa, por medio de la extracción con solvente n-hexano.
- Comparar el efluente urbano sin biorremediar y el sobrenadante de los tratamientos seleccionados a través del análisis de las propiedades físico-químicas (Sólidos Totales (ST), DQO, DBO, Nitrógeno orgánico, Nitratos, Fosfatos, Cloruros y metales)
- Caracterizar, el estado del consorcio, a través del seguimiento fotográfico de la observación macro y microscópica, en los tratamientos.

# CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Microalgas y Condiciones de Cultivo

El consorcio de microalgas que se utilizó está constituido por microalgas autóctonas aisladas de distintas fuentes de agua de la Provincia de Mendoza, por el grupo a-Oil. La elección de estos grupos para el stock del laboratorio son una consecuencia de su predominancia en los cuerpos de agua de esta provincia y de su resistencia a condiciones de estrés, considerando que el grupo a-Oil trabaja desde 2009 en condiciones fuera de esterilidad y en todos los cultivos han prevalecido estos dos géneros de microalgas: *Chlorella* y *Scenedesmus*.

#### 3.1.1. Generación del Inóculo

Para la generación del inóculo utilizado se realizaron sucesivos ciclos de cultivos *indoor*, con 10 % de inóculo y 20 % Bold Basal Modificado (BBM), llevado a volumen final con agua mineral, con inyección de CO<sub>2</sub> comercial, bajo fotoperiodos según la época del año (12 hs luz/12 hs oscuridad en verano y 8 hs luz/16 hs oscuridad en invierno) y sin control de esterilidad. Estos cultivos se guardaron en heladera y se reactivaron, para su empleo en los tratamientos propuestos en el plan de trabajo.

#### 3.1.2. Medio de cultivo

##### 3.1.2.1. Bold Basal Modificado (BBM)

A continuación se especifica la composición del medio: NO<sub>3</sub>K=1,262376g/L, Cl<sub>2</sub>Ca.2H<sub>2</sub>O=0,15g/L, SO<sub>4</sub>Mg.7H<sub>2</sub>O=0,45g/L, PO<sub>4</sub>HK<sub>2</sub>=0,45g/L, PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>Na=1,189998g/L, ClNa=0,15g/L, EDTANa<sub>2</sub>=0,05g/L, KOH=0,031g/L, SO<sub>4</sub>Fe. 7 H<sub>2</sub>O=0,00498g/L, SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>=0,001g/L, BO<sub>3</sub>H<sub>3</sub>=0,01142g/L, SO<sub>4</sub>Zn.7H<sub>2</sub>O=0,0088g/L, Cl<sub>2</sub>Mn. 4 H<sub>2</sub>O=0,00144g/L, MoO<sub>3</sub>=0,00071g/L, SO<sub>4</sub>Cu.5H<sub>2</sub>O=0,00157g/L y (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Co.6H<sub>2</sub>O=0,0049g/L. Bold 1949, Bischoff y Bold 1963.

##### 3.1.2.2. Agua mineral

En el caso de los controles se utilizó agua mineral marca Jor Dan. A continuación se especifica la composición del agua: Ca=34 mg/L, Mg= 10,9 mg/L, Na= 18,5 mg/L, K=3,9 mg/L,

# CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

Cloruros=49,7 mg/L, Bicarbonato=73,2 mg/L, Sulfato=57,6 mg/L, Sólidos Disueltos Totales 250 mg/L, bacteriológicamente apta.

## 3.2. Efluentes

El efluente urbano empleado provino de un pretratamiento mediante sistema de lagunaje y clorificación (Planta de Tratamiento “La Viñita, Catamarca, Argentina). En el ensayo se empleó una muestra de 40 L.

## 3.3. Diseño Experimental

El ensayo se realizó en las siguientes condiciones: recipientes abiertos, con un volumen de 2 L, fotoperiodos de 12 hs luz artificial (luz fluorescente) y 12 hs oscuridad, dentro del laboratorio (*indoor*), en ausencia de esterilidad (no axénicos) y con agitación manual. Cada uno de los 8 tratamientos y los respectivos controles se realizaron por triplicado durante 12 días.

### 3.3.1. Tratamientos

Los ocho tratamientos (Tabla 1) y sus controles (Tabla 2) se obtuvieron a partir del entrecruzamiento de las siguientes variables:

- Porcentaje de Inóculo en relación al volumen final. Se empleó 10 % de inóculo (**I10**) o 20 % de inóculo (**I20**).
- Inyección continua de CO<sub>2</sub> comercial durante 12 horas. Se empleó presencia de CO<sub>2</sub> (**+C**) o ausencia presencia de CO<sub>2</sub> (**-C**)
- Medio de cultivo: Bold Basal Modificado (BBM). Se emplearon en los tratamientos concentraciones de 0 % que corresponde a la ausencia de Bold Basal Modificado (**-B**) o a la presencia de Bold Basal Modificado de 5 % (**+B**) del volumen de referencia.

El efluente se incorporó en un 75 % del volumen final, se empleó la letra “**E**” para identificar los tratamientos (en los cuales se usó el efluente).

En el caso de los controles se utilizó en 75 % del volumen final agua mineral y se empleó la letra “**A**” para identificar los controles (en los cuales se utilizó agua mineral).

## CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

Tabla 1: Tratamientos utilizados en el ensayo.

Denominación Matriz		CO <sub>2</sub>	Inóculo		BBM	
			%	mL	%	mL
Tratamiento 1 E+I20+B+C	Sistema natural con CO <sub>2</sub> , suplemento químico y efluente	+	20	400	5	100
Tratamiento 2 E+I10+B+C			10	200		
Tratamiento 3 E+I20+B-C	Sistema natural con suplemento químico y efluente	-	20	400	0	0
Tratamiento 4 E+I10+B-C			10	200		
Tratamiento 5 E+I20-B+C	Sistema natural con CO <sub>2</sub> y efluente	+	20	400	0	0
Tratamiento 6 E+I10-B+C			10	200		
Tratamiento 7 E+I20-B-C	Sistema natural con efluente	-	20	400	0	0
Tratamiento 8 E+I10-B-C			10	200		

E: Efluente, I10: 10% de Inóculo, I20: 20% de Inóculo, B: Bold Basal, C: Inyección de CO<sub>2</sub>  
 (+) Presencia (-) Ausencia.

Tabla 2: Controles utilizados en el ensayo.

Denominación Matriz		CO <sub>2</sub>	Inóculo		BBM	
			%	mL	%	mL
Control 1 A+I20+B+C	Sistema natural con CO <sub>2</sub> y suplemento químico	+	20	400	5	100
Control 2 A+I10+B+C			10	200		
Control 3 A+I20+B-C	Sistema natural y suplemento químico	-	20	400	0	0
Control 4 A+I10+B-C			10	200		
Control 5 A+I20-B+C	Sistema natural con CO <sub>2</sub>	+	20	400	0	0
Control 6 A+I10-B+C			10	200		
Control 7 A+I20-B-C	Sistema natural	-	20	400	0	0
Control 8 A+I10-B-C			10	200		

A: Agua, I10: 10 % de Inóculo, I20: 20 % de Inóculo, B: Bold Basal, C: Inyección de CO<sub>2</sub>  
 (+) Presencia (-) Ausencia.

# CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

## 3.4. Procedimientos

La toma de muestras se realizó los días 0, 3, 5, 7, 10 y 12; en cada caso (Tratamiento 1 a 8 y Control 1 a 8) se colectó una alícuota de 50 mL, en las cuales se realizó las determinaciones gravimétricas de biomasa y lípidos. Todas las mediciones se realizaron con la balanza de precisión analítica.

Además se registraron valores de pH durante los días de toma de muestras.

### 3.4.1. Determinación de Biomasa Seca Total

A partir de las muestras obtenidas, se procesó cada una de ellas, de manera tal de obtener el valor gravimétrico de biomasa seca total, cumplimentando las siguientes etapas:

- A. Centrifugación:** se centrifugó durante 30 min a 3000 rpm y el sobrenadante se descartó.
- B. Secado:** el pellet obtenido se secó en estufa a 60°C durante 72 hs.
- C. Pesado:** una vez seco el pellet se obtuvo por gravimetría el valor de biomasa.

#### 3.4.1.1. Determinación de Productividad de Biomasa

El cálculo de productividad total se realizó según Ho y col., (2010), Ho y col., (2011) y Tang y col., (2011) con la ecuación (1), que se aplica con mayor frecuencia y que tiene en cuenta sólo los datos experimentales:

$$P_{\text{total}} = \frac{\Delta X}{\Delta t} = \frac{(X_{\text{máx}} - X_0)}{(t_m - t_0)} \quad (1)$$

Donde:

$P_{\text{total}}$  es la productividad óptima del experimento.

$X_{\text{máx}}$  es la concentración final máxima alcanzada en el final del experimento, y es el más alto valor de la curva de crecimiento.

$X_0$  es la concentración inicial de biomasa en  $\text{mg.L}^{-1}$ ;

$t_m$  es el tiempo requerido para alcanzar  $X_{\text{máx}}$ ; y

$t_0$  es igual a cero.

# CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

## 3.4.2. Extracción de Lípidos

A partir de las muestras de biomasa seca, se realizando los siguientes pasos, de manera tal de obtener el valor gravimétrico de lípidos presentes en la muestra:

- A. Debilitamiento celular por tratamiento químico:** Se agregó solvente orgánico n-hexano (2:1) en envases de vidrio.
- B. Lisis mecánica:** Se maceró con varilla de vidrio repetidamente y se dejó en contacto con el solvente durante 2 hs.
- C. Filtrado:** Se filtró el líquido obtenido mediante el uso de la bomba Shölander y filtro de papel Whatman N°1. Esta etapa se repitió hasta el agotamiento de la biomasa (mínimo 3 lavados con n-hexano), como se puede ver en la Figura 2A.
- D. Separación:** Se dejó evaporar el solvente y se obtuvo el lípido (Figura 2B).
- E. Pesado:** Se determinó la concentración de lípidos mediante gravimetría y el resultado se expresó en  $\text{g.L}^{-1}$ .

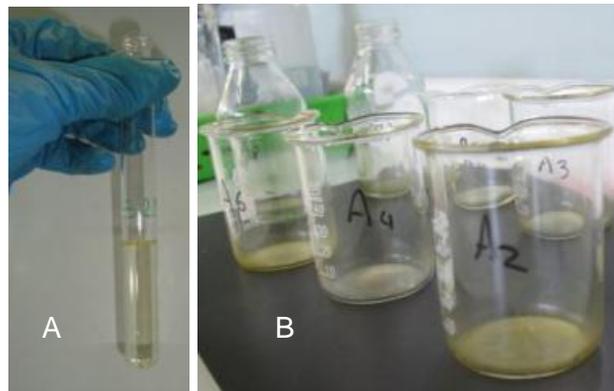


Figura 2: A-Recipiente con lípidos antes de la evaporación del solvente y B- recipientes luego de la evaporación del solvente.

### 3.4.2.1. Determinación de Productividad Diaria de Lípidos

El cálculo de productividad diaria de lípidos se realizó empleando la ecuación (2).

## CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

$$PL = (L_2 - L_1)/(T_2 - T_1) \quad (2)$$

Donde:

PL = Productividad de lípidos por litro por día (mg/L/d).

L<sub>1</sub>= contenido de lípidos a partir de algas en mg/L en el día inicial dentro del intervalo seleccionado.

L<sub>2</sub> = contenido de lípidos a partir de algas en mg/L en el día final dentro del intervalo seleccionado.

T<sub>1</sub>= tiempo inicial en días (d) en el intervalo seleccionado.

T<sub>2</sub>= tiempo final en días (d) en el intervalo seleccionado.

### 3.4.3. Determinación de la eficiencia del proceso Biorremediador

Para determinar la calidad del agua obtenida y compararla con el efluente sin biorremediar, se realizó la caracterización del efluente elegido. De la misma manera al finalizar el ensayo (día 12), se centrifugaron los cultivos para separar la biomasa final del sobrenadante de los tratamientos efectivos (en término de producción de biomasa y lípidos) y se dispusieron para posterior análisis.

Para caracterizar las muestras se utilizaron parámetros físico-químicos y biológicos. La elección de los parámetros se supeditó a las condiciones de trabajo.

#### 3.4.3.1. Parámetros Físico - Químicos

Los análisis se realizaron en el laboratorio LISAMEN-CCT-Mendoza. Los parámetros que se utilizaron se especifican a continuación:

**Sólidos Secos (Sólidos Totales, ST):** Se empleó el método SM 2540 D, con límite de detección 1 mg/L. Para determinar la cantidad de sólidos secos se preparó una muestra representativa de 50 gramos que se pesó en un crisol previamente tarado. Para la desecación de la muestra, se colocó en horno a 105 °C hasta peso constante y se calculó el porcentaje de sólidos secos según indica la siguiente ecuación:

$$\% SS = \frac{m_{seca}}{m_{húmeda}} \times 100$$

## CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

**Sólidos Volátiles (SV):** Se empleó el método SM 2540 E, con límite de detección de 1 mg/L. La muestra utilizada para determinar el contenido de sólidos secos se colocó en una mufla a 550 °C, hasta obtener peso constante. El proceso dura aproximadamente 5 horas. Es importante que no queden partes rojas (indicio de que aún hay oxidación). Es conveniente abrir frecuentemente la puerta de la mufla para obtener una entrada discreta de oxígeno.

Para determinar el porcentaje de sólidos volátiles se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%SV = \frac{(m_{seca} - m_{cenizas})}{m_{seca}} \times 100$$

**Cenizas:** El contenido en cenizas correspondería con la diferencia entre los sólidos totales (ST) los sólidos volátiles (SV) de cada muestra. La metodología es SM 2540 E, el límite de detección es 1 mg/L.

**DQO:** Se utilizó el método volumétrico SM 5210B, con un límite de detección de 2 mg O<sub>2</sub>/L.

**DBO<sub>5</sub>:** Se utilizó un método oximétrico SM 5220 D, con un límite de detección 20 µg O<sub>2</sub>/L.

**Fosfatos:** Se empleó espectrometría UV-Vis SM 4500-NO<sub>3</sub> B, con límite de detección 200ppb P/L.

**Nitrógeno orgánico (N):** Para cuantificar el nitrógeno orgánico en las muestras se utilizó el método de Kjeldahl SM 4500-N<sub>org</sub>-C (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1998), con límite de detección de 1 mg/L. El método se basa en la reacción de la muestra en medio ácido (sulfúrico concentrado) a temperaturas elevadas (400 °C), donde el nitrógeno orgánico es transformado a ión amonio, el cual es cuantificado a través de una destilación alcalina y su posterior titulación.

Los **metales** se determinaron a través de inducción de plasma acoplado (ICP-MS) EPAS2000.8, en la siguiente tabla se observan los metales determinados y el límite de detección en cada caso:

# CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

Tabla 3: Lista de metales analizados con el límite de detección.

Metal		Límite de detección	Metal		Límite de detección
Calcio	Ca	2 mg/L	Sodio	Na	2 mg/L
Magnesio	Mg	2 mg/L	Plomo	Pb	0,04 mg/L
Cinc	Zn	0,02 mg/L	Mercurio	Hg	0,04 mg/L
Arsénico	As	0,1 mg/L	Cadmio	Cd	0,02 mg/L

**Cloruro:** Se empleó un método volumétrico SM4500-Cl<sup>-</sup> A, con límite de detección 0,1 mEq/L.

**Cloro libre residual:** Se empleó el método por yodometría SM 4500-Cl A, con límite de detección de 0,02 mg/L.

**Detergente:** Se empleó espectrometría UV-Vis SM 5540 C, con límite de detección de detección de 0,1 mg/L.

### 3.4.3.2. Parámetros Biológicos

Con el objetivo de describir las condiciones del consorcio de microalgas y complementar la descripción con la observación de los organismos presentes, se realizaron observaciones macroscópicas y microscópicas, con conteo celular. Estas observaciones se realizaron en el efluente, en el inóculo y en los tratamientos.

#### Observación macroscópica

Se realizó la observación directa de los tratamientos, se plasmó en el seguimiento fotográfico de los frascos en los días 0, 5 y 10 y se completó la descripción de los tratamientos con lo observado a simple vista.

#### Observación microscópica

Se realizó la observación microscópica de las muestras elegidas, según los resultados obtenidos en términos de biomasa. Se observaron los ocho tratamientos en el día 12 de desarrollo, el efluente y el inóculo inicial de microalgas.

La observación microscópica se realizó en objetivo de 4 x y 20 x de preparados frescos y se obtuvo un registro fotográfico de las muestras en 40 x. En todos los casos para la preparación

## CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

de las muestras se utilizó el vortex con la finalidad de homogeneizar y romper los flóculos de biomasa formados durante el tiempo de conservación en heladera a 4°C. Para la observación se empleó el microscopio óptico, primo start.

Conteo de células: se utilizó la cámara de Neubauer para obtener el valor de células por mililitro de las microalgas presentes en los tratamientos con mayor biomasa algal. Esta metodología se implementó en las muestras que permitieron realizarlo según las condiciones del consorcio.

### 3.4.4. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos de la producción de biomasa y lípidos, así como el análisis de las variables empleadas, se realizaron utilizando el software STATGRAPHICS Centurión XVI.

# CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Biomasa Seca Total

Los resultados alcanzados indican una variación de la producción de biomasa total (con sales y cenizas) a lo largo del tiempo de desarrollo del cultivo. Estos resultados son representados en la Figura 3, donde se presenta la biomasa en mg/L de los tratamientos y en la Figura 4 se representan la biomasa en mg/L de los controles.

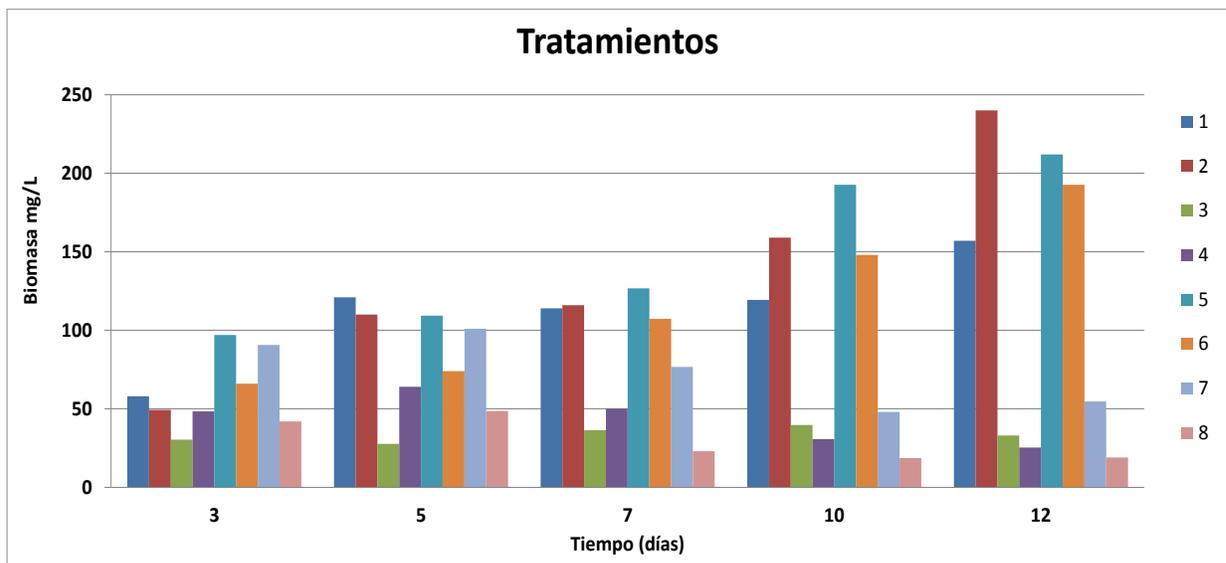


Figura 3: Producción de biomasa microalgal en los 8 tratamientos, a lo largo de 12 días de cultivo.

De acuerdo con la Figura 3 se observa que en corto tiempo (día 3 de desarrollo), los tratamientos más efectivos en términos de producción de biomasa son los tratamientos 5 y 7, que presentan 97mg/L y 90mg/L de biomasa, respectivamente, indicando un rápido crecimiento y mejor adaptación de las microalgas al medio. Estos valores, a pesar de ser los más efectivos, no alcanzan los valores de Mahapatra y col., (2014) que han realizado experimentos similares con microalgas en consorcio (constituido por los géneros Bacillariophyceae, Chlorophyceae (de las especies *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus oblicuos*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella pyrenoidosa*, entre otras), Cianofíceas y Euglenophyceae en reactor de 10 litros, cultivada en efluente urbano a lo largo de 12 días, y han obtenido valores de 720 mg/L en el cuarto (4to) día de cultivo. La diferencia de biomasa es atribuida a la falta de esterilidad del efluente empleado en la presente tesis; esta condición como factor de reducción de biomasa, es un aspecto corroborado por Smith y Crews (2014),

## CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

que indican que la disminución de biomasa se debe a la presión por herbivoría, características en cultivos no axénicos (ver apartado 4.3.2.2 observación microscópica).

A partir del día 7, se diferencian los tratamientos con inyección continua durante 12 horas de CO<sub>2</sub> (tratamientos 1, 2, 5 y 6), de los que no se suplementaron con CO<sub>2</sub> (3, 4, 7 y 8). La respuesta favorable ante la inyección del CO<sub>2</sub>, indicó la importancia del mismo durante la etapa exponencial y lineal del desarrollo del cultivo. Esta diferencia se observa como tendencia en los días siguientes del ensayo (días 10 y 12), donde los tratamientos 3, 4, 7 y 8 presentan producción de biomasa en disminución y los tratamientos 1, 2, 5 y 6 continúan aumentando la producción llegando a obtener los mayores valores de biomasa del ensayo (día 12 de desarrollo, el tratamiento 2: 240 mg/L). Mahapatra y col., (2014) en sus ensayos, obtuvieron en el día 12 de desarrollo, 480 mg/L de biomasa; como ya se indicó esta diferencia refleja la presión de otros microorganismos presentes, consumidores de microalgas (Smith y Crews, 2014).

En el caso de los tratamientos sin inyección CO<sub>2</sub> (3, 4, 7 y 8) se observó que no superan los 50 mg/L y sus controles llegaron a valores de 120 mg/L (control 8 el día 12 de desarrollo). Esta diferencia reflejó la presión de otros microorganismos presentes que actúan como consumidores de microalgas (Smith y Crews, 2014). En los tratamientos sin suplemento de CO<sub>2</sub> la proliferación de microcrustáceos no se controló a través de las condiciones del medio, ya que presentan valores de pH > 7, y lograron proliferar, consumiendo microalgas; a diferencia de los controles que al emplear agua sin microorganismos no deseados, las microalgas logran desarrollarse.

Los resultados obtenidos a lo largo del ensayo (12 días) indicaron que los controles (Figura 4) no superan el valor de biomasa de 150 mg/L. Esta diferencia se atribuyó a las condiciones autótrofas (utilizan la luz como única fuente de energía que se convierte en energía química a través de las reacciones fotosintéticas) de los controles y a las condiciones mixotróficas (capaces de obtener energía metabólica tanto de la fotosíntesis como de compuestos orgánicos) de los tratamientos. En concordancia con Santos (2011) se observó menores producciones de biomasa microalgal para nutriciones autótrofas, que son superadas por las producciones de biomasa en condiciones mixotróficas de crecimiento.

# CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

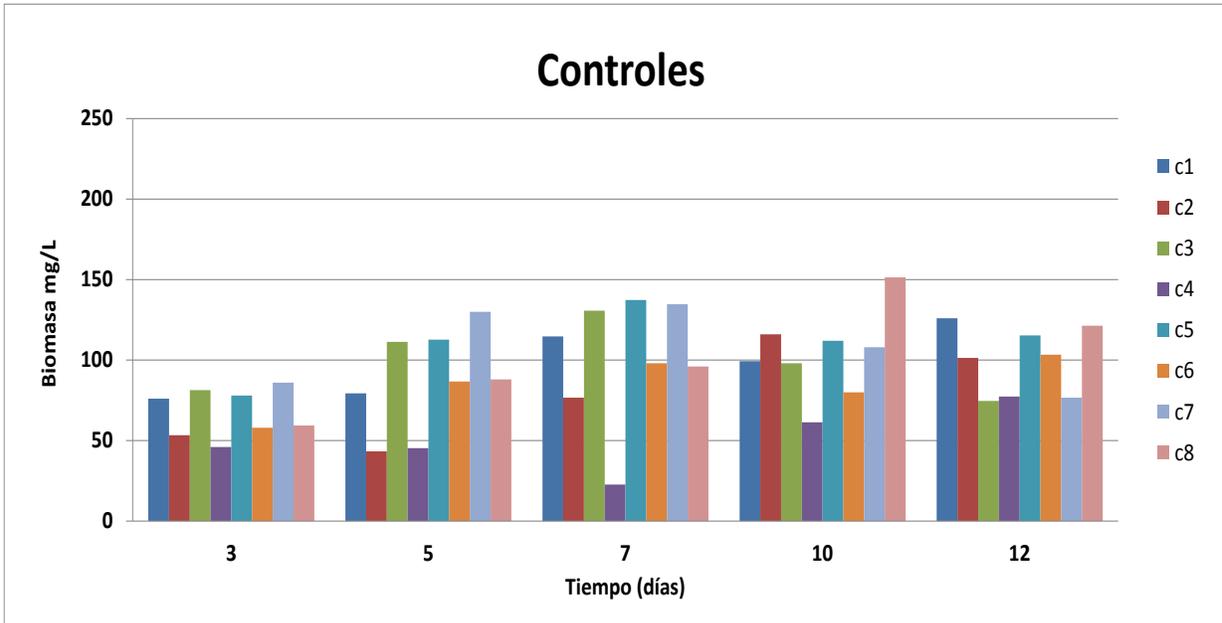


Figura 4: Producción de biomasa microalgal en los 8 controles respectivos, a lo largo de 12 días de cultivo.

## 4.1.1. Productividad

Los valores máximo obtenidos en cuanto a **productividad total** (Tabla 4) de 16,8 mg/L/día correspondió al tratamiento 2 (10 % inóculo, 5 % BBM y CO<sub>2</sub>). Este tratamiento alcanzó el valor más alto de biomasa, reflejando el crecimiento exponencial del tratamiento.

Se observó como los tratamientos con inyección de CO<sub>2</sub> (tratamientos 1: 8,42 mg/L/día, 2: 16,8 mg/L/día, 5: 13,3 mg/L/día y 6: 13,5 mg/L/día) presentaron valores de productividad total mayores que sus respectivos controles (c1: 5,17 mg/L/día, c2: 9,60 mg/L/día, c5: 12,48 mg/L/día y c6: 5,94 mg/L/día), esto indicó la importancia del suplemento de CO<sub>2</sub> como proveedor de carbono para el desarrollo del consorcio y como controlador de las condiciones favorables de pH para evitar la proliferación de organismos como microcrustáceos. Estos valores son inferiores a los datos obtenidos por Zouhayr Arbib y col., (2014) donde *Chlorella vulgaris* presenta 73 mg/L/día, *Scenedesmus obliquus* 163 mg/L/día y un consorcio natural presenta 171 mg/L/día; todos en aguas residuales. Esta diferencia se pudo atribuir a la mayor productividad que presentan las cepas y a las condiciones de esterilidad, en relación al consorcio y al trabajo no axénico, realizado en este informe.

## CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

Por otro lado se observó la diferencia entre el tratamiento 3 (-1,2 mg/L/día) y el control 3 que llega a una productividad de 13,24 mg/L/día, lo que refleja la presión por herbivoría realizada por los protozoos y microcrustáceos sobre el tratamiento 3.

**Tabla 4: Resultados de Biomasa máxima:  $X_{m\acute{a}x}$ , Biomasa día 0:  $X_0$ , tiempo al cual se llega a  $X_{m\acute{a}x}$  y productividad total:  $P_{total}$  para los 8 tratamientos y sus controles.**

Tratamiento	$X_{m\acute{a}x}$	$X_0$	$t_m$	$P_{total}$	Control	$X_{m\acute{a}x}$	$X_0$	$t_m$	$P_{total}$
1	157	56	12	8,42	C1	126	64	12	5,17
2	240	38	12	16,8	C2	116	20	10	9,60
3	39,6	52	10	-1,2	C3	130,6	38	7	13,24
4	64	24	5	8,0	C4	77,3	30	12	3,94
5	212	52	12	13,3	C5	137,3	50	7	12,48
6	192,6	30	12	13,5	C6	103,3	32	12	5,94
7	101	58	5	8,6	C7	134,6	46	7	12,67
8	48,6	28	5	4,1	C8	151,3	26	10	12,53

En relación a la **productividad diaria** (Figura 5) se reflejó el mismo comportamiento entre los tratamientos con  $CO_2$  de los que no presentan inyección del gas, encontrando mayor productividad en los tratamientos 1, 2, 5 y 6.

Al corto plazo (3 días) el tratamiento 5 presentó el mayor valor (32,3 mg/L/día), y luego de este día decayó la productividad hasta 17 mg/L/día. Al finalizar el ensayo (12 días) el tratamiento 2 obtuvo los valores más altos (20 mg/L/día).

Los controles c3, c5, c7 y c8 presentan los mejores valores de productividad total y en los días 5, 7 y 10, presentan los valores más altos de productividad diaria, independizándose de la inyección de  $CO_2$ , lo cual apoya la teoría de la presión por herbivoría en el caso de los tratamientos.

**CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE  
EFLUENTES URBANOS**

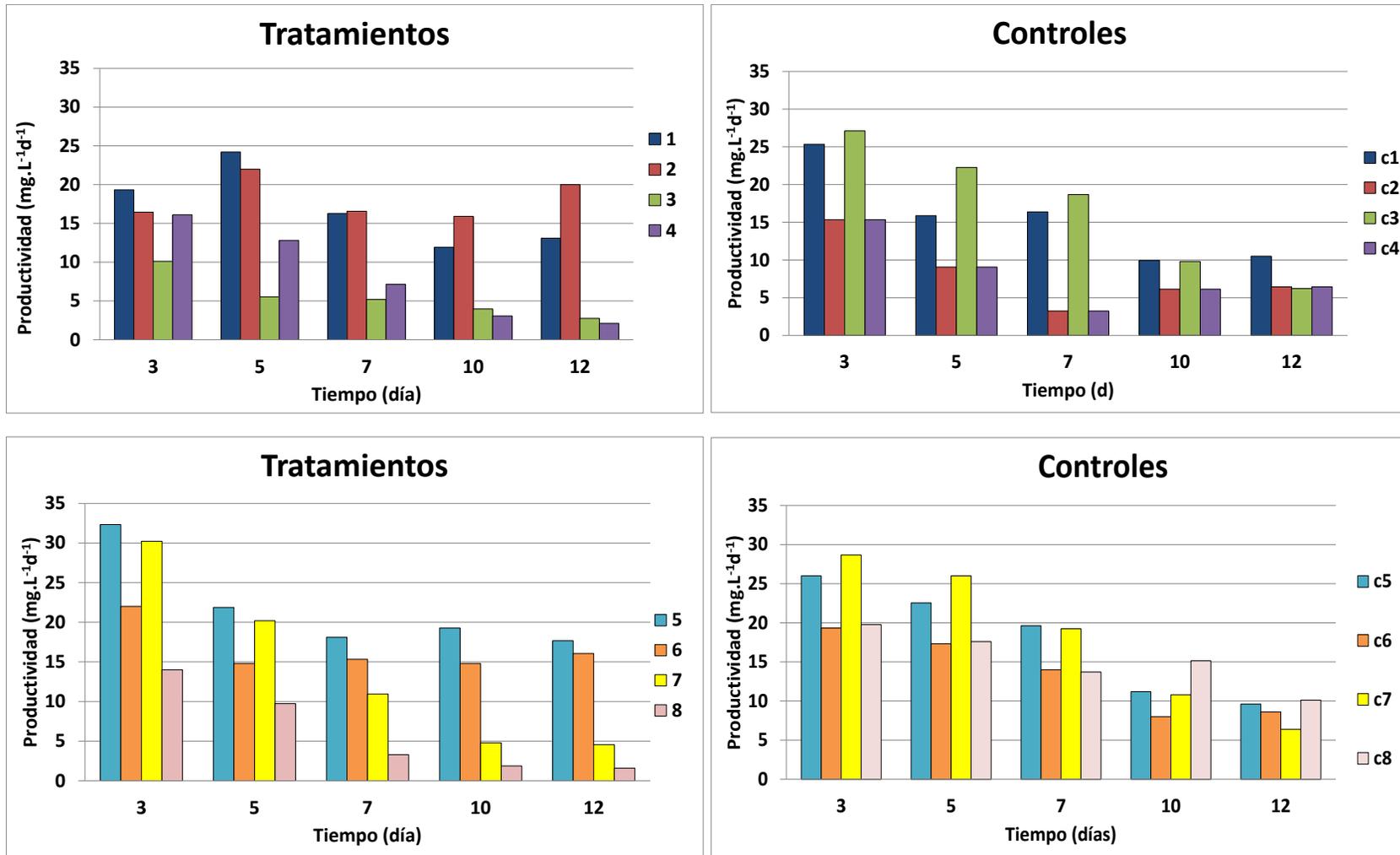


Figura 5: Productividad de biomasa en los 8 tratamientos y en sus respectivos controles en los 12 días de cultivo.

# CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

## 4.1.2 Curva de Crecimiento

Teniendo como referencia las curvas de crecimiento y disponibilidad de nutrientes citada por Mata y col., (2010); se compararon las curvas de crecimiento obtenidas en los tratamientos 4, 7 y 8 sin inyección de CO<sub>2</sub> (Figura 6). Se observó que hasta el día 5, las curvas de crecimiento de los tratamientos se asemejaron con la etapa de crecimiento estacionario y desde este día hasta el día 12, se asociaron con la fase de muerte. Esto se atribuye a la gran proliferación de microorganismos en los tratamientos debido a la falta de esterilidad del efluente y al declinamiento de la disponibilidad de nutrientes, ya que no se suplementaron con CO<sub>2</sub>.

Los microorganismos como microcrustáceos del orden Cladóceros (ver apartado 3.3.2) se desarrollaron en los primeros 3 días del ensayo y consumieron microalgas, esto se refleja en el decaimiento de la producción de biomasa a partir del día 5 del ensayo.

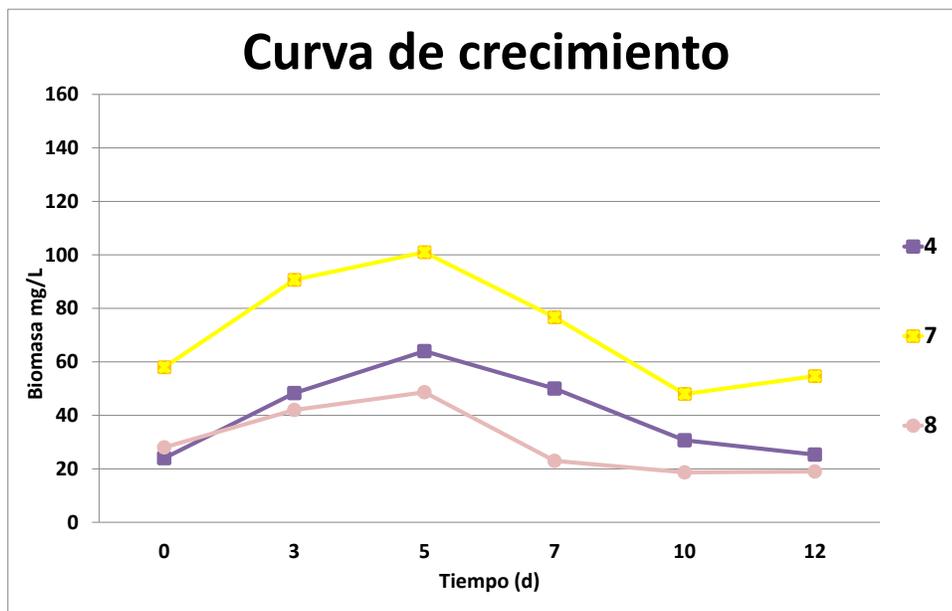


Figura 6: Curva de crecimiento de los tratamientos 4, 7 y 8.

En el caso de los tratamientos con inyección de CO<sub>2</sub>, se diferencian dos grupos; un grupo donde sus curvas de crecimiento se asocian a la fase lineal de la curva de referencia citadas por Mata y col., (2010) en los tratamiento 1 y 5 (Figura 7) y otro grupo donde las curvas de crecimiento se asociaron a la fase exponencial de la curva de crecimiento citada por Mata y col., (2010) en los tratamiento 2 y 6 (Figura 8). Lo cual refleja que el porcentaje de inóculo, que corresponde a la diferencia entre estos grupos, marca la mayor disponibilidad de nutrientes. La

## CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

mayor cantidad de microalgas presente en un 20 % de inóculo (tratamiento 1 y 5) requieren mayor cantidad de nutrientes para su desarrollo, en comparación con un 10 % de inóculo (tratamientos 2 y 6), por lo que refleja menor disponibilidad de nutrientes.

Al fenómeno de agotamiento de los nutrientes se le suma el empleo de CO<sub>2</sub> como controlador del pH, condición que controla la proliferación de otros microorganismos, que consumen microalgas.

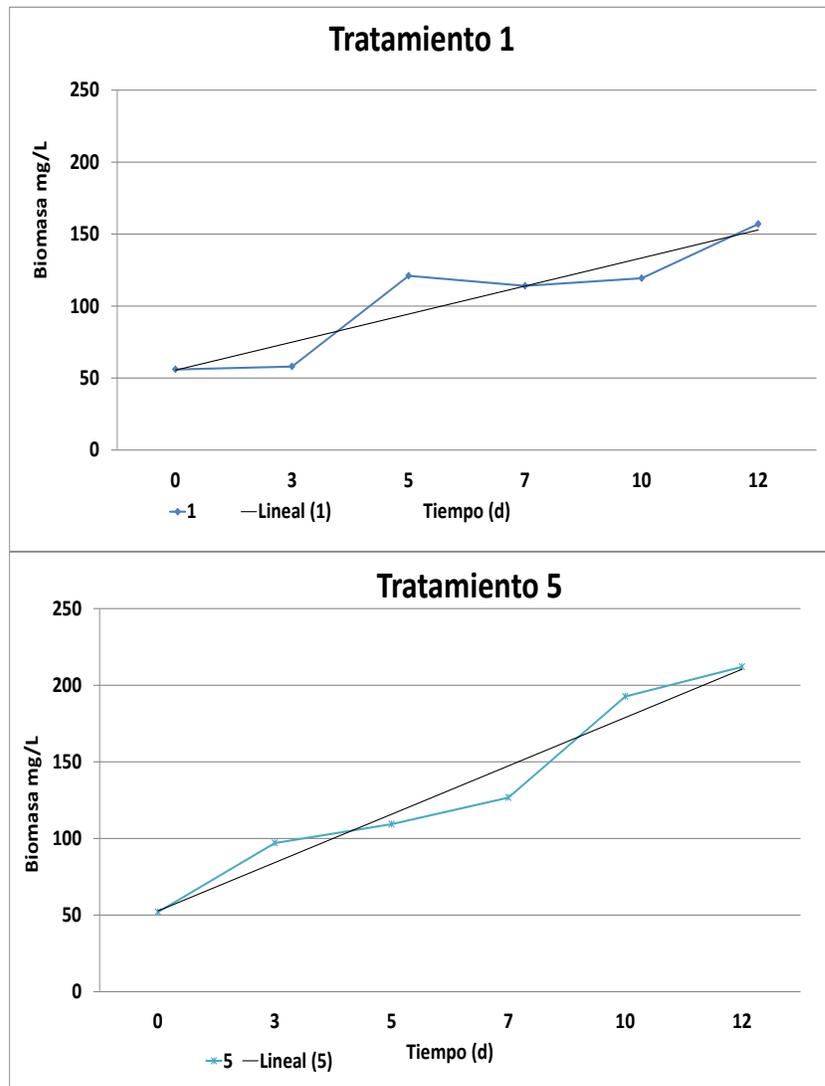


Figura 7: Curva de crecimiento y línea de tendencia de los tratamientos 1 y 5.

# CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

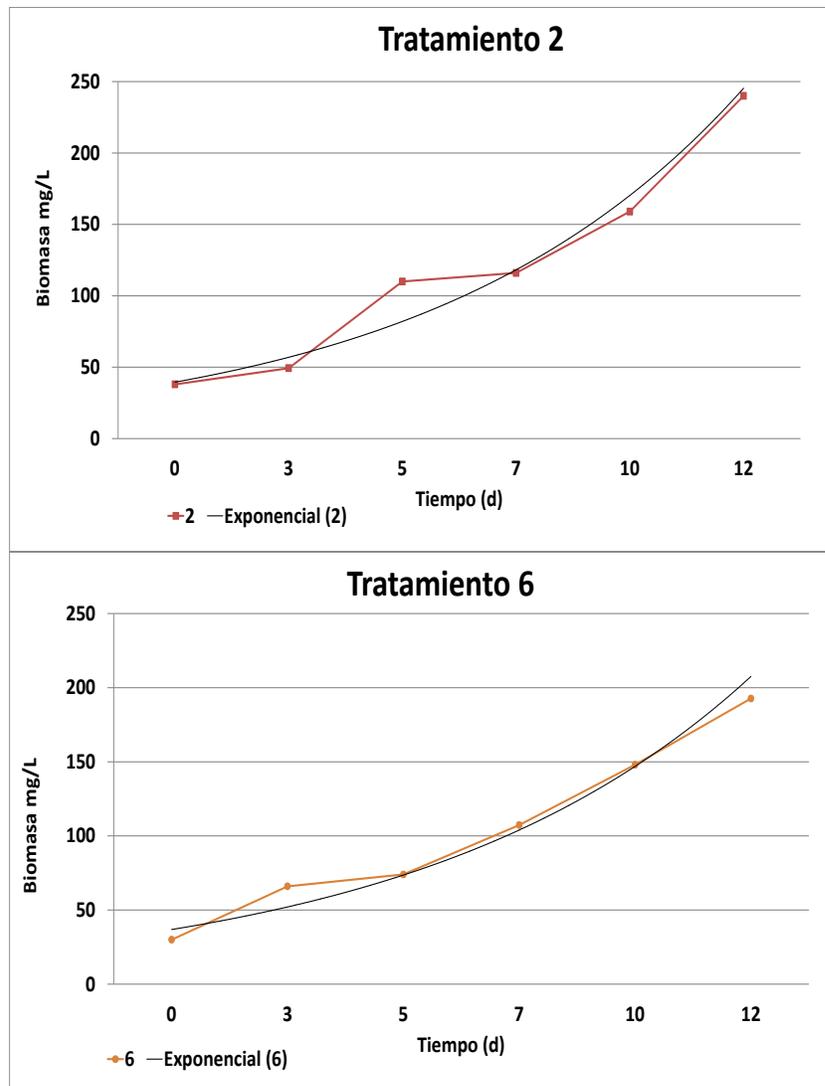


Figura 8: Curva de crecimiento y línea de tendencia de los tratamientos 2 y 6.

## 4.1.2. Análisis Estadístico

Se realizó un análisis de varianza ANOVA utilizando el método suma de cuadrados tipo III, sobre los valores obtenidos de biomasa de cada triplicado de cada tratamiento a lo largo de los 12 días del ensayo.

### 4.1.2.1. Variables Analizadas

El análisis multifactorial incluyó a las tres variables del ensayo: porcentaje de inóculo, presencia de Bold Basal Modificado e inyección de CO<sub>2</sub> comercial.

# CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

## Porcentaje de Inóculo

En concordancia con lo citado por Abdel-Raouf y col., (2012) el principal factor biótico en influir significativamente en el crecimiento de algas es la densidad inicial. En el caso de los tratamientos con 10 % de inóculo se obtuvo una media de  $82,7 \pm 5,6$  mg/L y  $101,2 \pm 5,6$  mg/L en los tratamientos con 20 % de inóculo, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

Se cumple que cuanto mayor es la concentración de algas, mayor es el crecimiento, esto se reflejó claramente en los controles donde no operan otras variables como la presencia de herbívoros. En el caso de los tratamientos, esta diferencia se observó en la reacción de los primeros días (día 3) antes del crecimiento de microcrustáceos, con excepción del tratamiento 3 donde la presión por herbivoría superó el crecimiento biomásico.

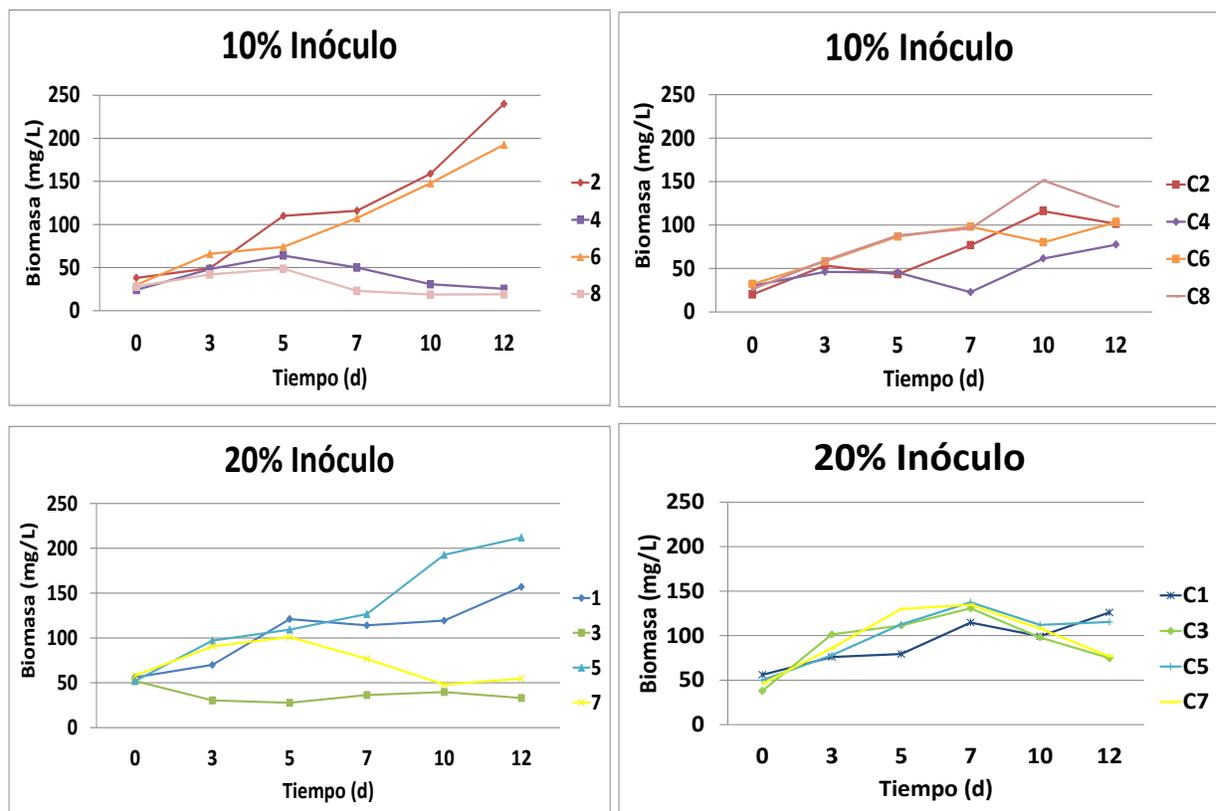


Figura 9: Resultados de biomasa según la variable 10 - 20 % de inóculo y sus controles.

# CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

## Inyección de Dióxido de Carbono Comercial

En concordancia con R. Ramaraj (2013), L.M. V. Patil y col., (2008) se observa que las algas son eficientes fijadores de dióxido de carbono. Esta diferencia es estadísticamente significativa y se plasma al comparar los valores medios de biomasa en los tratamientos con inyección de CO<sub>2</sub> de **118,1±5,6mg/L** y los tratamientos sin inyección de CO<sub>2</sub> de **65,8±5,6mg/L**.

En la Figura 10 se observó la marcada diferencia entre los tratamientos con CO<sub>2</sub> de los que no lo tienen. Es destacable como se complementaron los nutrientes disponibles en el efluente empleado y el carbono disponible con la inyección de CO<sub>2</sub> resultando en valores de biomasa superiores a los obtenidos en los controles con inyección del CO<sub>2</sub>.

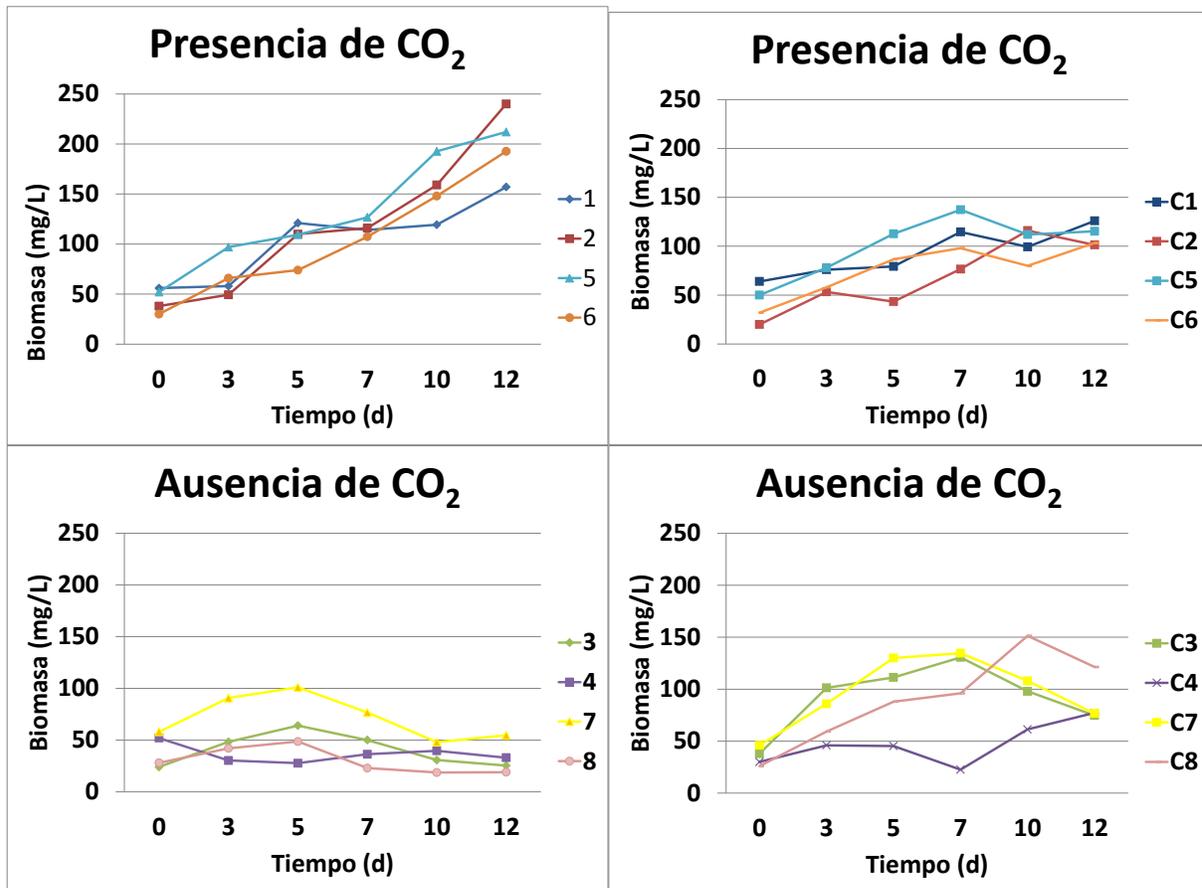


Figura 10: Resultados de biomasa según la variable presencia - ausencia de inyección de CO<sub>2</sub> comercial.

# CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

## **Bold Basal Modificado (BBM)**

La variable presencia de 5 % de BBM (P: **94,5±5,6 mg/L**) presenta un valor superior que ausencia de BBM (A: **89,5±5,6 mg/L**) pero esta diferencia no es estadísticamente significativa.

En concordancia con Khowaja, (2000), Riquelme y Avendaño, (2003); se observa que la composición de las aguas residuales permite sostener el metabolismo del consorcio. Esta afirmación permite pensar que la obtención de biomasa sin el agregado de medio enriquecido, disminuiría los costos en el proceso de producción, y permitiría el uso de agua residual urbana.

## **4.2. Lípidos**

Los resultados de producción de lípidos alcanzados (Figura 11) indicaron una variación a lo largo del ensayo (12 días). En la tabla 5 se observaron los porcentajes de lípidos en relación a la biomasa seca total correspondiente. En este grupo se diferencian los tratamientos con inyección de CO<sub>2</sub> que presentan valores de producción de lípidos en incremento desde el día 3 de desarrollo del cultivo hasta el día 10.

Se observó que los tratamientos más efectivos en términos de producción de lípidos son el tratamiento 1 (16,8 mg/L de lípidos al día 3, representó un 22,41 % de la biomasa seca total del día 3) y el tratamiento 2 (12,6 mg/L de lípidos al día 3, representó el 25,67 % de la biomasa seca total del día 3). Por otro lado sus controles presentan valores inferiores (control 1: 2,2 mg/L representó el 8,77 % de la biomasa y c2: 2 mg/L representó el 11,25 % de su biomasa).

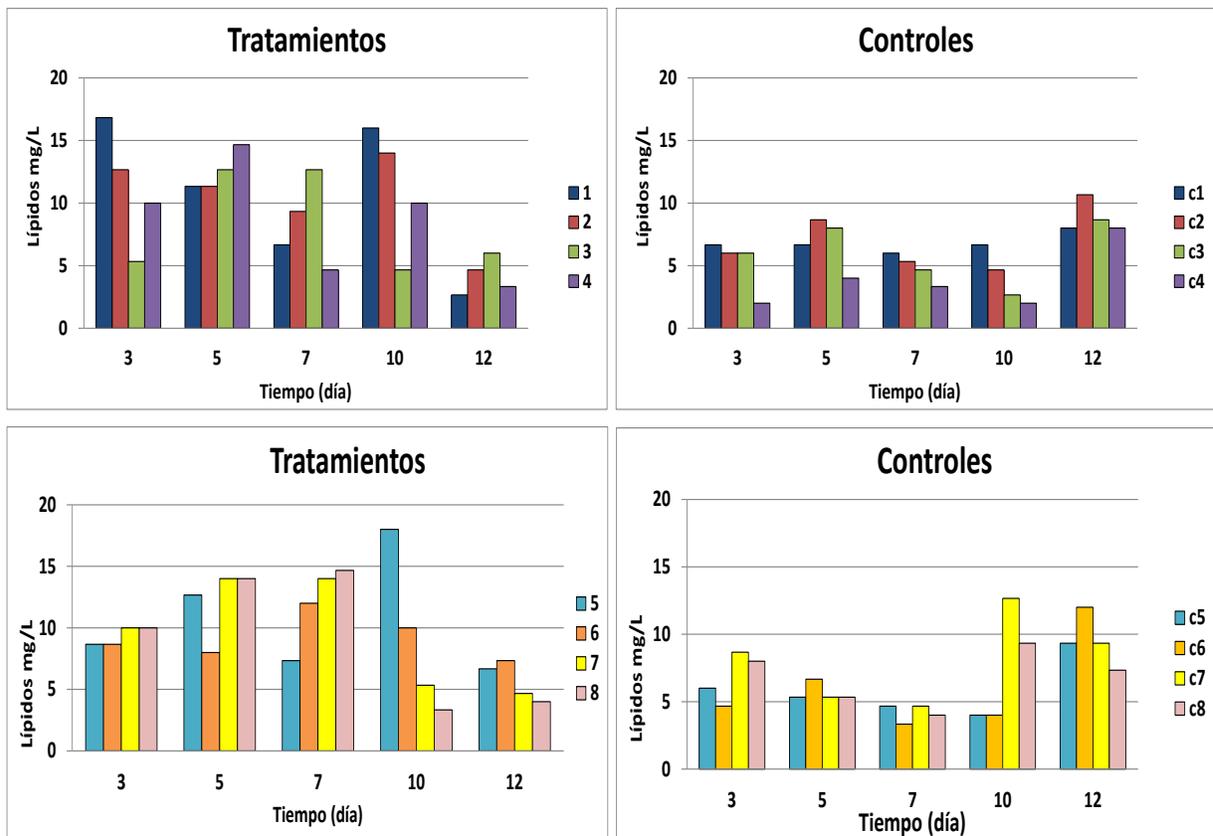
En el día 12 todos los tratamientos disminuyeron la producción de lípidos, llegando a valores menores a 8 mg/L y los controles presentaron un aumento (c1: 8 mg/L representó el 6,35 %; c2: 10,6 mg/L representó el 10,53 %; c3: 8,6 mg/L representó el 11,61 %; c4: 8 mg/L representó el 10,34 %; c5: 9,3 mg/L representó el 8,09 %; c6: 12 mg/L representó el 11,61 %; c7: 9,3 mg/L representó el 12,17 % y c8: 7,3 mg/L representó el 6,04 %), pero a pesar del aumento los valores obtenidos en los controles no alcanzan los valores obtenidos con los tratamientos, demostrando el beneficio de utilizar efluentes en la producción de lípidos.

Los resultados obtenidos concuerdan con los valores obtenidos por Singh y Singh, (2010) donde *Chlorella vulgaris*, produce entre el 20 a 50 % en peso de biomasa seca en contenido de aceite y con Mahapatra y col., (2014) quienes han obtenido valores del contenido lipídico total máximo de los consorcios de algas de 28,5% y en *Chlorella vulgaris* cultivada en aguas residuales artificiales obtuvieron entre 20-42 % (Feng y col., 2011); mayores en comparación

## CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

con 16 % en *Chlorella minutissima* UTEX2341 crecido en medios optimizado según Li y col., (2011). Estos valores se relacionan a dos condiciones: inyección de CO<sub>2</sub> y estrés ambiental, fenómenos que favorecen la acumulación de lípidos en las microalgas (Rodolfi y col., 2009).

En el caso de los tratamientos sin inyección de CO<sub>2</sub> como el 8 (10 % inoculo, sin Bold Basal y sin inyección CO<sub>2</sub>) donde la producción de lípidos presenta valores altos los días 3, 5 y 7 (10 mg/L, 14 mg/L y 14,6 mg/L, respectivamente) así como corresponde a los porcentajes más altos de todo el ensayo (23,80 %, 28,76 % y 63,76 %, respectivamente), estos datos reflejan la producción de lípidos a partir de la biomasa de todos los microorganismos presentes (microalgas y microcrustáceos), por lo que no son valores representativos para producción de lípidos a partir de microalgas exclusivamente.



**Figura 11:** Resultados de lípidos obtenidos en los tratamientos y sus controles, durante el ensayo 12 días de desarrollo del cultivo.

## CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

Tabla 5: Porcentaje de lípidos a partir de la biomasa seca según los días en los tratamientos y controles.

Tiempo (días)	Tratamientos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
3	22,41	25,67	10,34	8,79	8,93	13,13	11,02	23,8
5	9,36	10,3	11,45	22,89	11,58	10,81	13,86	28,76
7	5,84	8,04	4,66	17,43	5,78	11,18	18,26	63,76
10	13,4	8,8	16,3	5,88	9,34	6,75	11,11	17,85
12	1,69	1,94	6,57	9,09	3,14	3,8	8,53	21,05
Tiempo (días)	Controles							
	1	2	3	4	5	6	7	8
3	8,77	11,25	5,92	4,35	7,69	8,05	10,08	13,48
5	8,4	20	7,19	8,82	4,73	7,69	4,1	6,06
7	5,23	6,96	3,57	14,71	3,4	3,4	3,47	4,17
10	6,71	4,02	2,72	3,26	3,57	5	11,73	6,17
12	6,35	10,53	11,61	10,34	8,09	11,61	12,17	6,04

### 4.2.1. Productividad de lípidos

Se observó una tendencia de disminución de la productividad con el correr de los días de crecimiento del consorcio. La mayor productividad de lípidos (Figura 12) se obtuvo en el tratamiento 1 (20 % inoculo con CO<sub>2</sub>) en el día 3 (5,6 mg/L/día). En concordancia con Lizzul y col., (2014) que trabajaron con una cepa de *Chlorella sorokiniana* en efluente urbano que obtuvieron una productividad de lípidos al día 2 del ensayo de 8 mg/L/días con inyección de CO<sub>2</sub>.

Se observó que los valores de productividad de los tratamientos (máx. valor el día 3 tratamiento 1: 5,6 mg/L/día) superan a los valores de productividad de los controles, donde el máximo valor se obtiene el día 3 en el control 7 (2,8 mg/L/día).

Se reflejó el mismo comportamiento observado en términos de producción de lípidos donde los tratamientos sin inyección de CO<sub>2</sub> presentan altas productividades y decaen luego del día 7 (control 7: 2,8 mg/L/día al día 3 de desarrollo del cultivo), pero estos datos reflejaron la producción de lípidos a partir de la biomasa de microalgas y microcrustáceos, por lo que no son valores representativos para productividad de lípidos a partir de microalgas exclusivamente.

## CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

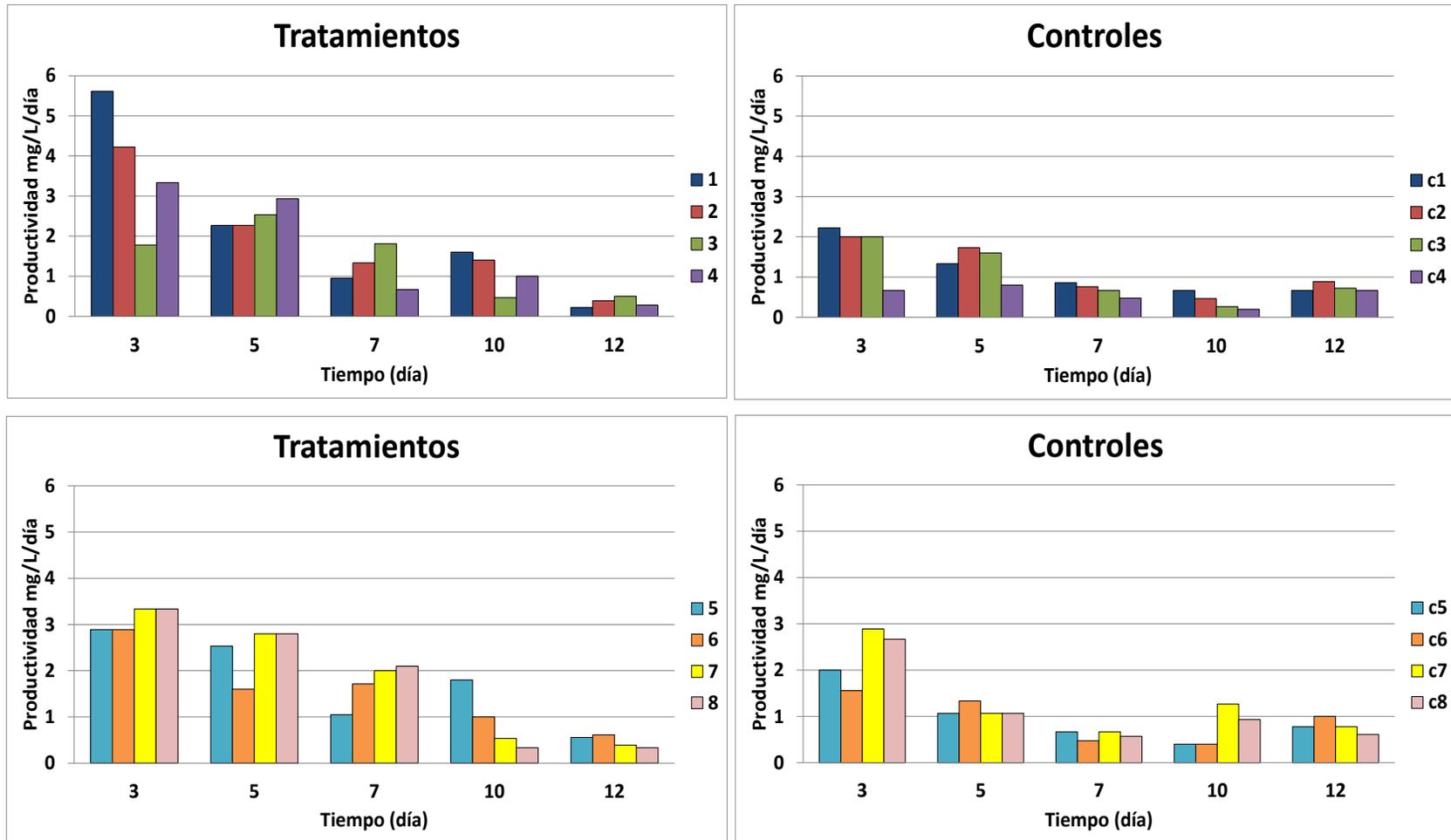


Figura 12: Productividad de lípidos en los tratamientos y sus controles durante los 12 días de ensayo.

# CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

## 4.2.1. Análisis Estadístico

Se realizó un análisis de la varianza ANOVA multifactorial utilizando el método suma de cuadrados tipo III, sobre los valores obtenidos de biomasa de cada triplicado de cada tratamiento a lo largo de los 12 días del ensayo.

### 4.2.1.1. Variables Analizadas

El análisis multifactorial incluyó a las tres variables del ensayo: porcentaje de inóculo, presencia de Bold Basal Modificado e inyección de CO<sub>2</sub> comercial.

#### Inyección de Dióxido de Carbono Comercial

Los mayores valores de lípidos se obtuvieron en los tratamientos con inyección de CO<sub>2</sub>, (**10,76±0,59 mg/L**) y la ausencia de la inyección del gas en los tratamientos obtuvo un valor medio de **8,9±0,59 mg/L** siendo esta diferencia estadísticamente significativa. En concordancia con Lizzul y col., (2014) que trabajaron con una cepa de *Chlorella sorokiniana* en efluente urbano quienes obtuvieron una producción de lípidos en medio enriquecido con CO<sub>2</sub> superior en comparación con las obtenidas en condiciones de ausencia del CO<sub>2</sub>.

Según Ji M.K. y col., (2013) observaron que en condiciones de estrés ambiental, se produce el cese de la división celular de microalgas y la célula deja de realizar la síntesis de CO<sub>2</sub> y favorece la producción de lípidos para el almacenamiento de energía, con un consecuente aumento del contenido de lípido a partir de biomasa de microalgas. Yongmanitchai y Ward (1991) informaron que el contenido en lípidos de *Phaeodactylum tricorutum* aumentó cuando las células se cultivaron en condiciones de alto suministro de CO<sub>2</sub>.

#### Porcentaje de Inóculo

Si bien hay diferencias entre los valores obtenidos de lípidos en los tratamientos con 10 % de inóculo donde la media es de **9,53±0,59 mg/L** de aquellos con 20 % de inóculo donde la media es de **10,13±0,59 mg/L**, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Estos resultados indicaron la independencia de la cantidad inicial de biomasa algal en el desarrollo del consorcio, para la posterior producción de lípidos por parte de las microalgas.

# CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

## **Bold Basal Modificado (BBM)**

Se encontró que no hay diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la obtención de lípidos entre los tratamientos con medio nutricional con una media de **9,8±0,59 mg/L** en relación a aquellos que no se le agregó refuerzo de nutrientes (**9,86±0,59 mg/L**). Esto indica que las concentraciones de nutrientes del efluente urbano empleado permiten la producción de lípidos a partir de biomasa algal sin el agregado de medio nutricional. En cuanto a los controles la media en aquellos donde se utilizó medio nutricional (6,5±3,1 mg/L) y los que no se utilizó (5,7±3,1 mg/L) esta diferencia no es estadísticamente significativa.

### **4.3. Biorremediación**

Según Metcalf y Eddy (1991) y Mujeriego (1990) la composición de un agua residual viene definida por las cantidades reales de los componentes físicos, químicos y biológicos presentes en ella y puede variar según la composición del agua de abastecimiento público, el número y tipo de establecimientos comerciales e industriales y según la naturaleza de la población residente.

#### **4.3.1. Parámetros Físico Químicos**

En este apartado se analizó la calidad del agua obtenida (sobrenadante) como consecuencia del centrifugado de los tratamientos 1 y 5, por ser estos los tratamientos eficientes en términos biomásicos, ya que lograron los valores más altos de biomasa algal.

La purificación de aguas residuales en el sistema de tratamiento de aguas residuales tiene por objetivo la disminución de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), sólidos suspendidos, nutrientes ( $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{NO}_2^-$ -N;  $\text{NH}_4^+$ -N y  $\text{PO}_4^{3-}$ -P) y bacterias (Abdel-Raouf y col, 2012).

Según Abdel-Raouf y col., (2012) las algas se pueden usar en el tratamiento de aguas residuales para una gama de propósitos, algunos de los cuales se utilizan para la reducción de tanto química y bioquímica de la demanda de oxígeno, la eliminación de N y/o P, la eliminación de coliformes y de metales pesados.

A continuación se analiza cada uno de los parámetros de interés en agua residual según Metcalf y Eddy (1991) y Mujeriego (1990).

## CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

### **Materia en suspensión (incluye la porción volátil y la porción inorgánica)**

Cuando se vierte agua residual sin tratamiento a un medio acuático puede dar lugar al desarrollo de depósitos de fango, de condiciones anaerobias y puede obstruir el sistema de riego. A continuación se comparan los valores típicos que estos parámetros toman en un agua residual municipal bruta (sin tratar) según Metcalf y Eddy (1991) y Mujeriego (1990) con los obtenidos, tanto en el efluente como en los resultados de los tratamientos eficientes: 1 y 5 (día 12):

**Tabla 6: Resultados del material en suspensión.**

Componente	Unidad	Valores típicos			Valores encontrados		
		Alta	Media	Baja	Efluente	Tratamiento 1, día 12	Tratamiento 5, día 12
Materia sólida,	mg/L	1200	720	350	575	907	948
disuelta total	mg/L	850	500	250	572	907	948
en suspensión	mg/L	350	220	100	3	< 1	< 1

Según los valores presentados en la tabla anterior se puede calificar al efluente empleado en el ensayo con carga media de materia sólida y materia sólida disuelta total y con carga muy baja en cuanto a sólidos en suspensión. En cuanto al efecto de los tratamientos se corroboran los datos de Abdel-Raouf N y col., (2012) que indican que este tratamiento no disminuye el parámetro de sólidos disueltos debido al tamaño de las microalgas empleadas (2-10  $\mu\text{m}$ ) y al método de cosecha de la producción.

### **Materia orgánica biodegradable**

Estas sustancias están compuestas principalmente por proteínas, carbohidratos y grasas. Una vez vertidas en el medio ambiente, su descomposición biológica puede dar lugar al agotamiento del oxígeno disuelto en las aguas receptoras y a la aparición de condiciones anaerobias. A continuación se comparan los valores típicos que estos parámetros toman en un agua residual municipal bruta (sin tratar) según Metcalf y Eddy (1991) y Mujeriego (1990) con los obtenidos tanto en el efluente como en los resultados del día 12 de los tratamientos 1 y 5 con microalgas:

## CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

**Tabla 7: Resultados de DBO<sub>5</sub> y DQO.**

Componente	Unidad	Valores típicos			Valores encontrados
		Alta	Media	Baja	Efluente
DBO <sub>5</sub> a 20°C	mg/L	400	220	110	55
DQO	mg/L	1000	500	250	108

Según la tabla presentada anteriormente, se puede clasificar al efluente empleado en el ensayo como de muy baja concentración en ambos parámetros, esperable ya que este efluente presenta tratamiento primario, secundario y cloración.

En relación a la legislación de la Provincia de Catamarca la DQO obtenida en ambos tratamientos es inferior al valor límite exigido en la Resolución 65/2005.

**Tabla 8: Valores establecidos en la legislación de la Provincia de Catamarca y los valores de los tratamientos 1 y 5 del día 12.**

Componente	Resolución 65/2005		Valores encontrados	
	Unidad	Límite	Tratamiento 1, día 12	Tratamiento 5, día 12
DBO <sub>5</sub>	mg/L	<50	20	28
DQO	mg/L	<80	64	52

En relación al efecto del tratamiento con algas se observa una disminución de 51,8 % en DQO y 63,63 % de DBO<sub>5</sub> en el tratamiento 1 y una disminución de 40,74 % de DQO y 49,09 % de DBO<sub>5</sub> en el tratamiento 5.

### **Patógenos**

Es importante destacar que no se realizó una determinación de patógenos en el presente informe, pero la detección de huevo de helmintos en la observación microscópica indica la presencia de estos organismos en algunos tratamientos, por lo que se propone en futuros ensayos la detección estos organismos como huevos de helmintos para determinar el grado de control de este parámetro.

Los mejores resultados obtenidos en la observación realizada se obtiene en el tratamiento 1 donde no se observan huevos de helmintos (Ver apartado 4.3.2 Parámetros biológicos) y se detecta una disminución de protozoos y rotíferos. Todos estos parámetros se proponen evaluar en futuros ensayos.

# CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

## Elementos nutritivos

El nitrógeno y el fósforo son elementos nutritivos esenciales para el crecimiento de las plantas y su presencia en el agua aumenta el valor para el riego. Cuando se vierte nitrógeno o fósforo en el medio acuático, puede darse el desarrollo de formas de vida acuáticas indeseables. Cuando se vierten cantidades excesivas de estos elementos en el terreno, el nitrógeno puede llegar a contaminar las aguas subterráneas. A continuación se comparan los valores típicos que estos parámetros toman en un agua residual municipal bruta (sin tratar) según Metcalf y Eddy (1991) y Mujeriego (1990) con los obtenidos en el tratamiento con algas:

**Tabla 9: Resultados de Nitrógeno Orgánico, Nitratos y Fosfatos.**

Componentes	Unidades	Valores típicos			Valores encontrados
		Alta	Media	Baja	Efluente
Nitrógeno orgánico	ppm	35	15	8	1,44
Nitratos	ppm	0	0	0	50
Fosfatos	ppm	5	3	1	1,09

Según la tabla antes presentada se puede clasificar al efluente empleado con una baja cantidad de nitrógeno orgánico, muy alta cantidad de nitratos y baja cantidad de fósforo.

La legislación de la provincia de Catamarca no contempla estos parámetros, por lo que se emplean la legislación de la Provincia de Mendoza, en la cual los parámetros máximos permitidos y tolerados para los vertidos directos e indirectos al dominio público hidráulico se determinan en el Anexo I de la Resolución N° 778/96, se observa que ambos tratamientos obtienen valores permitidos en cuanto a nitratos, pero no ocurre lo mismo en cuanto a fosfatos, donde los valores exceden el máximo tolerable en el tratamiento 1 y en el tratamiento 5 el valor se encuentra entre el máximo permitido y tolerable.

## CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

Tabla 10: Valores establecidos en la legislación de la Provincia de Mendoza y los valores de los tratamientos 1 y 5 del día 12.

Componente	Resolución N° 778/96 -Anexo I			Valores encontrados	
	Unidad	Máx. permitido	Máx. tolerable	Tratamiento 1, día 12	Tratamiento 5, día 12
Nitratos	ppm	<45	45	31	3
Nitrógeno orgánico	ppm	-	-	1,44	0,72
Fosfatos	ppm	0,4	0,7	2,17	0,53

En cuanto a los resultados de biorremediación se observa que en el Tratamiento 1 disminuye un 38 % del Nitrato y que el fosfato aumentó debido a la incorporación de medio nutricional. En el tratamiento 5 se eliminó el 50% Nitrógeno orgánico, 94% del nitrato y el 48% del fosfato.

### Actividad del ion hidronio

El pH del agua residual afecta a la solubilidad de los metales así como a la alcalinidad del suelo. El intervalo esperado de pH en un agua residual municipal se sitúa entre 6,5 - 8,5. En relación a los valores de pH se diferencian los tratamientos según el empleo de CO<sub>2</sub>. En concordancia con Mahapatra y col., (2014) que a lo largo de su ensayo de 12 días el pH aumentó gradualmente hasta pH: 8,6 en el ensayo realizado para el presente trabajo de tesis el pH aumentó en los tratamientos sin inyección del gas. Esto se debe al aumento simultáneo de la fotosíntesis y a la acumulación de iones oxidrilo (OH<sup>-</sup>). En el caso de los tratamientos con inyección CO<sub>2</sub> se observa que este parámetro se ve controlado en valores <7.

En la Figura 13 se muestra la evolución del pH según los días del ensayo, en los 8 tratamientos empleados en este ensayo:

## CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

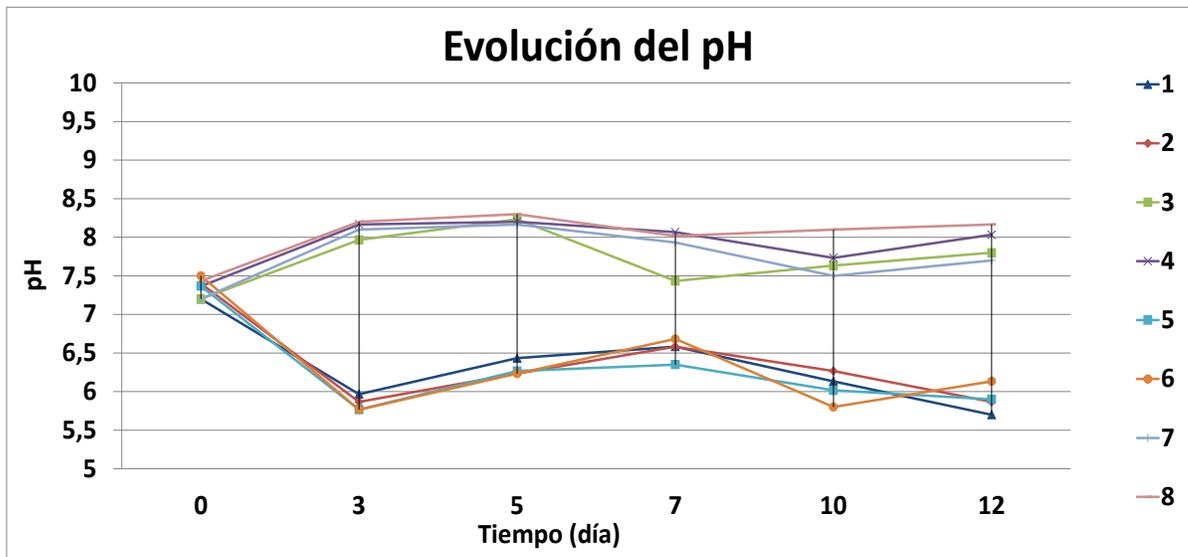


Figura 13: Resultados de los valores obtenidos de pH en el ensayo realizado.

Se observa en la Figura anterior que los tratamientos con inyección variable de CO<sub>2</sub> (1, 2, 5 y 6) presentan valores de pH bajos (pH: 5,5-6,5), estos valores evitan la proliferación de otros microorganismos indeseables y son adecuado para el cultivo de microalgas. Por otro lado, los tratamientos sin inyección de CO<sub>2</sub> (3, 4, 7 y 8) presentan valores altos (pH: 7,5-8,5), pero dentro del rango esperado para aguas residuales urbanas.

Según lo establecido en la Resolución 65/2005 de la Provincia de Catamarca, el rango permitido de pH se encuentra en entre 6 - 8,2, por lo que lo que se aconseja controlar este parámetro para mantenerlo dentro del límite permitido.

### Metales pesados

Elementos como Cd, Zn y Hg son algunos metales pesados que se acumulan en el medio ambiente y son tóxicos para los animales y las plantas. Su presencia en el agua residual puede limitar su idoneidad para agua de riego, según la Resolución N°65/2005 de la provincia de Catamarca se citan los siguientes límites.

## CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

Tabla 11: Resultados de metales pesados: cadmio, mercurio, plomo, cinc y arsénico.

Componente	Unidad	Resolución N° 65/2005	Valores encontrados		
		Máx. permitido	Efluente	Tratamiento 1, día 12	Tratamiento 5, día 12
Mercurio	ppm	<0,01	< 0.08	< 0.08	< 0.08
Arsénico	mg/L	<0,1	<0.2	< 0.2	< 0.2
Plomo	mg/L	<0,1	< 0.08	< 0.08	< 0.08
Cinc	mg/L	<2	<0.2	< 0.21	< 0.11
Cadmio	mg/L	<0,1	< 0.04	< 0.06	< 0.04

En el caso de mercurio y arsénico los datos no son concluyentes ya que el límite de detección de la metodología empleada no permite llegar a los valores exigidos en la legislación

En el caso del cadmio hay un aumento en el tratamiento con medio y en el caso del zinc hay una disminución en el tratamiento sin medio nutricional. El plomo no presenta variación. En los tres metales los valores se encuentran por debajo de lo establecido en la legislación.

### **Sustancias inorgánicas disueltas**

Materia disuelta total, conductividad eléctrica, elementos como Na, Ca, Mg y B. Un grado excesivo de salinidad puede perjudicar ciertos cultivos. Determinados iones como los cloruros, el sodio y el boro son tóxicos para ciertas plantas, lo que condiciona el uso posterior del sobrenadante. El sodio puede causar problemas de permeabilidad en los suelos según Metcalf y Eddy (1991) y Mujeriego (1990).

Según el Manual de uso e interpretación de aguas de la Provincia de Córdoba la estimación del peligro de sodificación del suelo donde se toma de referencia al Laboratorio de salinidad de RIVERSIDE (U.S.) clasifica la peligrosidad de sodificación del suelo por el agua de riego en función de su índice R.A.S: (relación de absorción del sodio), que se calcula con la siguiente fórmula:

$$RAS = \frac{Na}{\sqrt{\frac{(Ca + Mg)}{2}}}$$

## CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

Con respecto al riesgo de sodificación, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) propone el siguiente cuadro de clasificación:

**Tabla 12: Clasificación del riesgo de sodicidad según FAO.**

Clasificación	R.A.S.	Riesgo de Sodificación
S1	< 3	SIN RIESGO
S2	3 - 9	RIESGO MODERADO
S3	> 9	ALTO RIESGO

En el caso de estos parámetros no contemplados en la resolución 65/2005, se realiza la comparación con los valores de la legislación de la provincia de Mendoza. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 13:

**Tabla 13: Resultados de calcio, magnesio sodio y RAS.**

Componente	Unidad	Resolución N° 778/96, Anexo I		Valores encontrados		
		Máx. permitido	Máx. tolerable	Efluente	Tratamiento 1, día 12	Tratamiento 5, día 12
Calcio	mg/L	-	-	78	105	55
Magnesio	mg/L	0,1	0,5	17	15	10
Sodio	mg/L	150	275	124	115	90
RAS	N <sup>ro</sup>	6	x	2,9	2,74	3,2

Según la tabla anterior se puede observar que el tratamiento 1 es el que obtuvo un valor favorable ya que no presentan riesgo de sodicidad (RAS: 2,7). En cambio el tratamiento 5 (RAS: 3,2), presentó un riesgo moderado de sodicidad, por lo que no es recomendable utilizar el sobrenadante, de este tratamiento, para riego.

En relación al magnesio los valores se encuentran sobre el máximo permitido y en relación al sodio, se encuentra muy por debajo del límite máximo permitido.

### **Cloro residual**

## CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

Una concentración excesiva de cloro libre, superior a 0.05 mg/L, puede provocar quemaduras en las puntas de las hojas y estropear algunas especies de plantas sensibles. No obstante, la mayor parte del cloro presente en un agua residual es cloro combinado, que no perjudica a las plantas.

A continuación se comparan los valores típicos que este parámetro toma en un agua residual municipal bruta (sin tratar) según Metcalf y Eddy (1991) y Mujeriego (1990) con los obtenidos en el tratamiento con algas:

**Tabla 14: Resultados de cloruros con sus valores de referencia y cloro libre residual.**

Componente	Unidad	Valores típicos			Valores encontrados		
		Alta	Media	Baja	Efluente	Tratamiento 1, día 12	Tratamiento 5, día 12
Cloruros	mg/L	100	50	30	0,0097	0,01029	0,01346
Cloro libre residual	mg/L	-	-	-	<0,02	0,05	<0,02

Los valores obtenidos en el efluente y en los tratamientos no presentan riesgo para las plantas.

### **Otras condiciones**

Se observa una diferencia de color entre el efluente (amarillo claro) y el sobrenadante de ambos tratamientos (incoloro), así como se observó un cambio en el olor, donde el efluente presentó olor a orina y en ambos tratamientos no se detectó olor. El detergente disminuyó en relación al efluente (0,2 ppm) tanto en el tratamiento 1 (0,15 ppm) como en el tratamiento 5 (0,11 ppm), estas condiciones indican mejoras en la calidad del sobrenadante en relación al efluente.

### **4.3.2. Parámetros Biológicos**

La observación de microorganismos se realizó teniendo en cuenta los grupos principales que participan en el proceso biorremediador es decir, los diferentes tipos de algas, bacterias, protozoos, rotíferos y micro crustáceos. De la misma forma se tuvo en cuenta la densidad celular de microalgas y la observación de otros microorganismos.

## CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

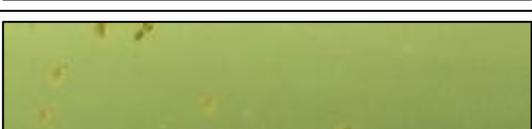
### 4.3.2.1. Observación Macroscópica

Durante la observación macroscópica se observó que los tratamientos con inyección de CO<sub>2</sub> (1, 2, 5 y 6), donde al pasar los días del ensayo se notó la pérdida de transparencia de los cultivos, lo que indicó un aumento de la biomasa algal (Figuras 14 y 15), esta afirmación se corroboró en el apartado 4.1 biomasa seca total, donde se observó el aumento de la producción de biomasa a lo largo del ensayo (12 días). En estos tratamientos no se observaron microcrustáceos (Tabla 15).

En el caso de los tratamientos 3, 4, 7 y 8 (sin inyección de CO<sub>2</sub>), se detectaron la proliferación de microcrustáceos al día 3 de desarrollo del cultivo (Tabla 15), estos tratamientos mostraban gran parte de la biomasa precipitada a partir del día 5, en los tratamientos 4 y 8 (10 % de inóculo); y a partir del día 10 en los tratamientos 3 y 7 (20 % de inóculo) como se observa en la Figura 15. La presencia de microcrustáceos es atribuida a la falta de esterilidad del efluente empleado en el ensayo para la presente tesis; esta condición actuó como factor reductor de biomasa (apartado 4.1 resultado de biomasa seca total), esta afirmación es corroborada por Smith y Crews (2014), que indicaron que la disminución de biomasa se debe a la presión por herbivoría, características en cultivos no axénicos.

## CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

Tabla 15: Resultados de la observación macroscópica de los 8 tratamientos del ensayo a los 12 días.

Muestra	Observación	
	Micro Crustáceos	Imágenes
<b>Tratamiento 1</b> E+I20+B+C	Ausencia	
<b>Tratamiento 2</b> E+I10+B+C	Ausencia	
<b>Tratamiento 3</b> E+I20+B-C	Presencia	
<b>Tratamiento 4</b> E+I10+B-C	Presencia	
<b>Tratamiento 5</b> E+I20-B+C	Ausencia	
<b>Tratamiento 6</b> E+I10-B+C	Ausencia	
<b>Tratamiento 7</b> E+I20-B-C	Presencia	
<b>Tratamiento 8</b> E+I10-B-C	Presencia	

# CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

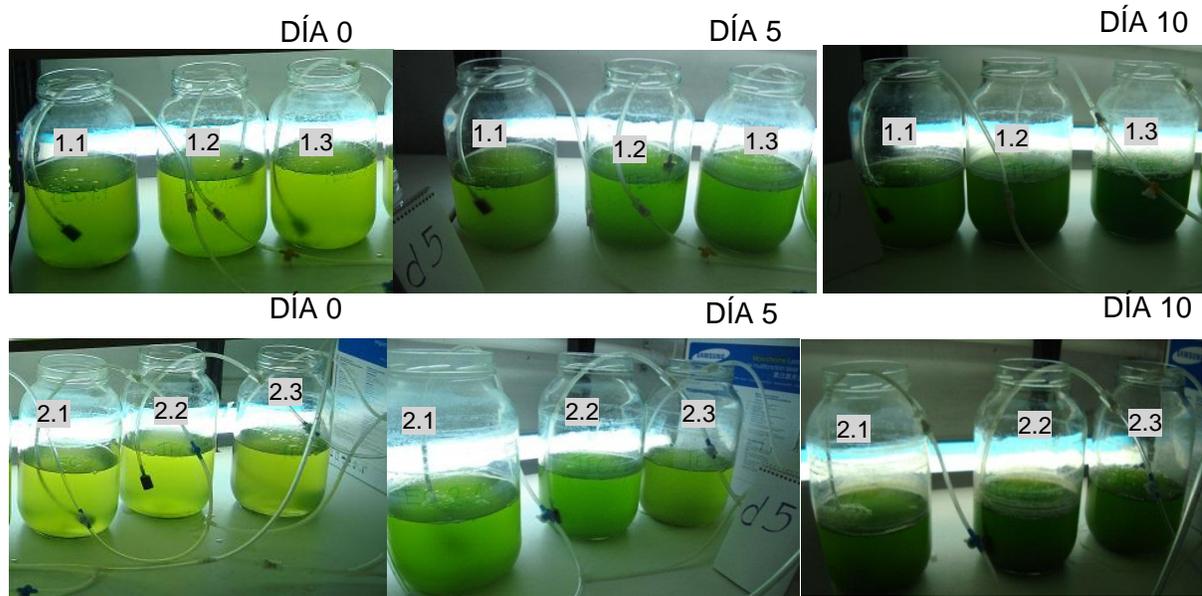


Figura 14: Seguimiento macroscópico del ensayo en los Tratamientos 1 y 2.

# CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

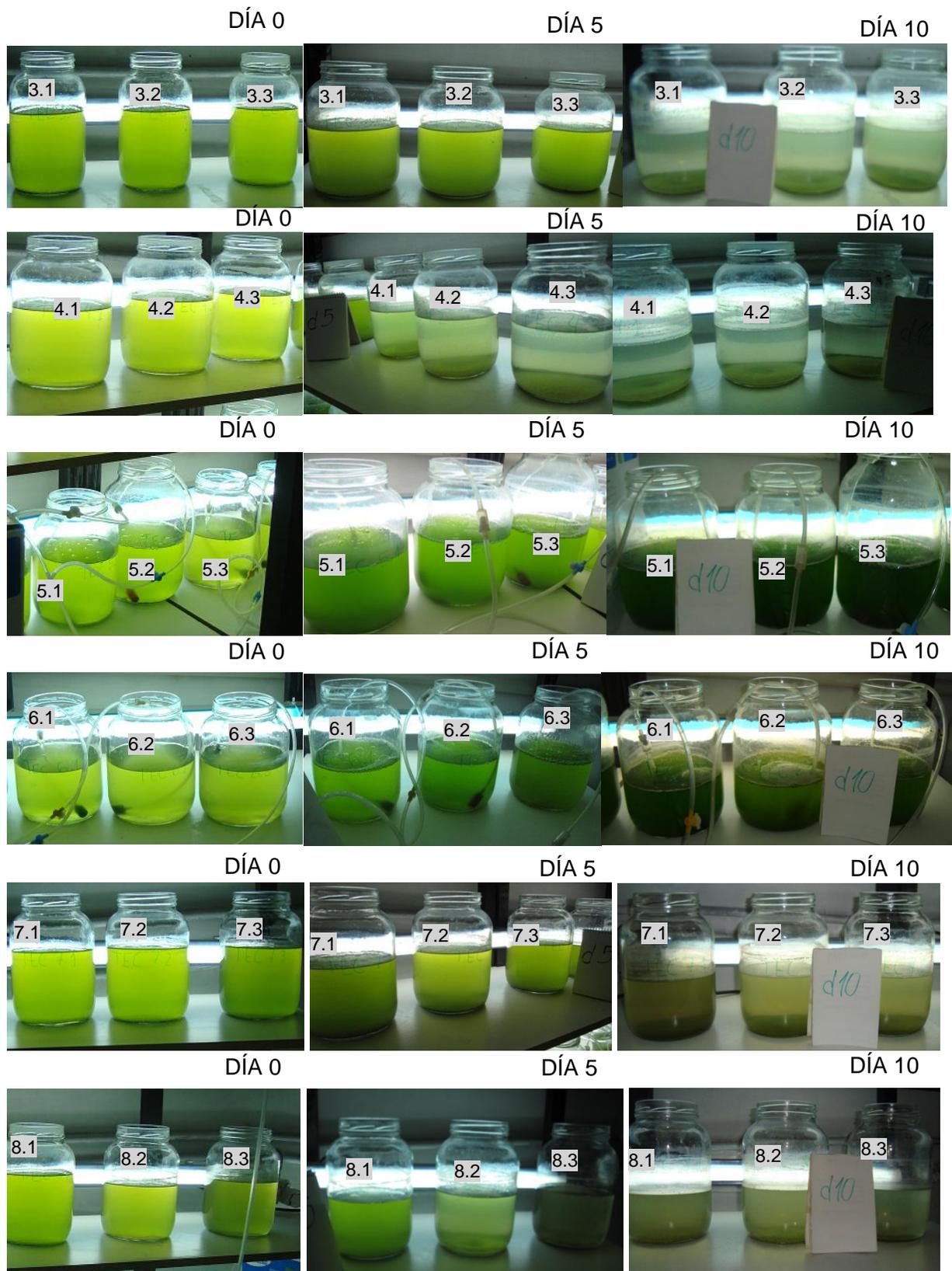


Figura 15: Seguimiento macroscópico del ensayo en los Tratamientos 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

## CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

### 4.3.2.2. Observación Microscópica

De la observación microscópica se desprende la Tabla 16 de descripción de los 8 tratamientos en el día 12 de desarrollo, así como se describió el efluente y el inóculo, utilizados en el ensayo.

Se observó la presencia de productores primarios (microalgas: *Chlorella sp.*, *Scenedesmus sp.*, filamentosas, diatomeas), consumidores primarios (protozoos, rotíferos y microcrustáceos) y secundarios (rotíferos y helmintos) entre los organismos identificados.

En concordancia con Smith y col., (2010) y por Kazamia y col., (2012), que indicaron la relevancia inmediata del control realizado por los consumidores secundarios sobre los consumidores primarios y de los consumidores primarios sobre los productores primarios (de arriba hacia abajo en la cadena trófica), para el desarrollo de algas. Se detectó que en los tratamientos con los valores más altos de biomasa del ensayo (tratamiento 1, 2, 5 y 6) se detectaron rotíferos. Los rotíferos se alimentan principalmente de pequeños animales, algas y partículas orgánicas. Wallace, (2002); Ruppert, y col., (2004); Segers, (2007); Zhang, (2011) proponen que cuando están presentes en la cadena alimenticia, los depredadores secundarios, actúan para reducir la abundancia de sus presas herbívoras. De esta manera liberan la producción de plantas desde el control por el pastoreo. Esta idea condujo a los conceptos de control de arriba hacia abajo y cascadas tróficas (MacArthur, (1967); Carpenter y col., (1985)). Esta manipulación de los depredadores en la parte superior de las redes alimentarias puede dar lugar a cambios profundos en la abundancia de los productores primarios, ya sean algas o plantas terrestres.

Si bien los tratamientos que mejor situación presentan son 4 (tratamiento: 1, 2, 5 y 6, al día 12 (con inyección de CO<sub>2</sub>)) se diferencian entre sí en cuanto a la producción biomásica (157 mg/L, 240 mg/L, 212 mg/L y 192 mg/L respectivamente). De la misma manera se distinguen en cuanto a la presencia de otros microorganismos en el consorcio (algas filamentosas, huevo de helmintos) y en cuanto al estado del consorcio en términos de las especies de microalgas de interés (*Chlorella sp* y *Scenedesmus sp.*), como se puede ver en la Tabla 16 de descripción.

## CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

Tabla 16: Descripción de lo microalgas y microorganismos presentes en los tratamientos, en el efluente y en el inóculo.

Muestra	Observación						
	Rotíferos	Huevo helmin-tos	Bacterias y protozoos	Algas			
				Densidad (cel/mL)	<i>Chlorella sp.</i>	<i>Scenedesmus sp.</i>	Otras
Efluente	N	N	X	$6 \times 10^5$	X <sup>1</sup>	X	Filamentosas
Inóculo microalgas	N	N	X	$1,6 \times 10^7$	X (95%)	X	-
Tratamiento 1 Ver Tabla 17	O	N	X	$1,5 \times 10^7$	X (90%)	X	-
Tratamiento 2 Ver Tabla 18	O	O	X	$5,6 \times 10^6$	X <sup>1</sup> (90%)	X	-
Tratamiento 3 Ver Tabla 20	N	O	X	-	X <sup>1 y 2</sup>	X	Filamentosas
Tratamiento 4 Ver tabla 21	N	O	X	-	X <sup>2 y 3</sup>	-	Diatomeas
Tratamiento 5 Ver Tabla 19	O	N	X	$1,5 \times 10^6$	X (40%)	X	Filamentosas
Tratamiento 6	O	N	X	-	X (20%)	-	-
Tratamiento 7	N	O	X	-	X <sup>1, 2 y 3</sup>	-	Filamentosas
Tratamiento 8 Ver tabla 22	N	O	X	-	X <sup>1 y 3</sup>	-	Filamentosas

X Presencia - Ausencia

<sup>1</sup> presencia de microalgas de menor dimensión celular

<sup>2</sup> presencia de microalgas aglomeradas

<sup>3</sup> presencia de microalgas rotas

O: Se observó

N: No se observó

El tratamiento 1 denotó una situación favorable en relación al resto de los tratamientos; ya que presentó dominancia de las especies de microalgas buscadas ( $1,5 \times 10^7$  cél/mL) y controló la contaminación de otras especies no deseadas (microcrustáceos, u otras algas filamentosas) y presentó rotíferos en bajo número, lo que nos indicó mayor representatividad del valor de biomasa obtenido. No se observó huevo de helmintos.

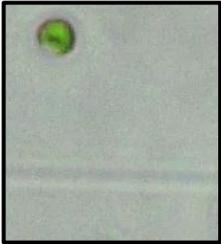
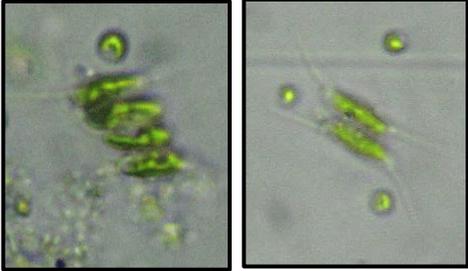
El tratamiento 2 logró un estado deseado del consorcio con dominancia de las especies de microalgas buscadas ( $5,6 \times 10^6$  cel/mL), otras algas filamentosas, no presentó microcrustáceos y presentó rotíferos en bajo número, pero se observaron huevos de helmintos.

## CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

Los tratamientos 5 y 6 presentaron especies no deseadas como microalgas filamentosas y distintos tipos de protozoos y gran cantidad y variedad de rotíferos con una menor tasa de consumo de productores primarios, presentaron buenas producciones biomásicas (este valor no es representativo por la gran cantidad de rotíferos) y se observan microalgas de menor tamaño.

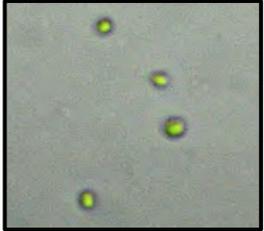
A continuación se observa la clasificación de los microorganismos detectados en los tratamientos 1, 2, 5 y 6.

**Tabla 17: Observación microscópica del tratamiento 1, en el día 12 de ensayo.**

Clasificación	Imagen
Dominio: Eukaryota Reino: Plantae División Charophyta Clase Conjugatophyceae Orden Desmidiaceae Familia Closteriaceae Género: <i>Closterium</i>	
Dominio: Eukaryota Reino: Plantae División: Chlorophyta Clase: Trebouxiophyceae Orden: Chlorellales Familia: Chlorellaceae Género: <i>Chlorella</i>	
Dominio: Eukaryota Reino: Plantae División: Chlorophyta Clase Chlorophyceae Orden Sphaeropleales Familia Scenedesmaceae Subfamilia Scenedesmoidea Género: <i>Scenedesmus</i>	

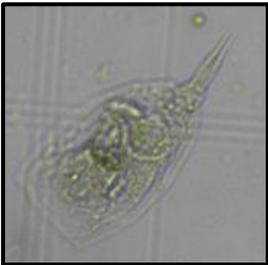
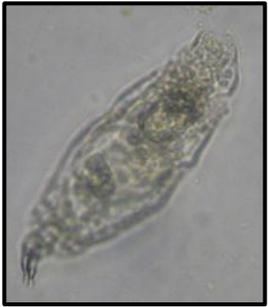
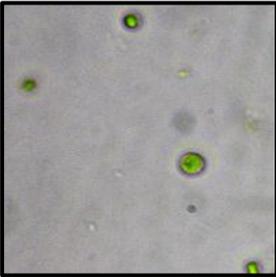
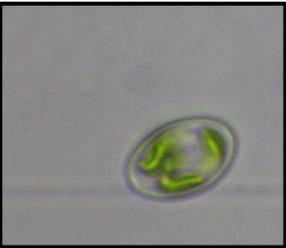
## CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

Tabla 18: Observación microscópica del tratamiento 2, en el día 12 de ensayo.

Clasificación	Imagen	Clasificación	Imagen
División: Rotífera  Clase: Bdelliodeos		Huevo de helmintos	
División: Rotífera  Clase: Bdelliodeos		Huevo de helmintos	
Dominio: Eukaryota Reino: Plantae División: Chlorophyta Clase: Trebouxiophyceae Orden: Chlorellales Familia: <i>Chlorellaceae</i> Género: <i>Chlorella</i>			

## CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

Tabla 19: Observación microscópica del tratamiento 5, en el día 12 del ensayo.

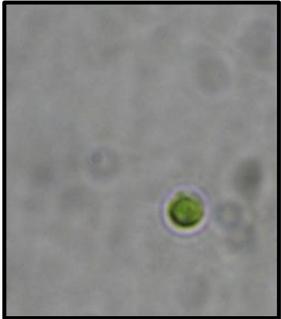
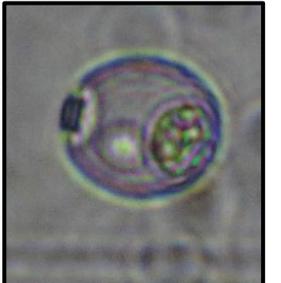
Clasificación	Imagen	Clasificación	Imagen
División Rotifera Clase: Bdelliodeos		División: Rotifera Clase: Bdelliodeos	
Dominio: Eukaryota Reino: Plantae División: Chlorophyta Clase: Trebouxiophyceae Orden: Chlorellales Familia: Chlorellaceae Género: <i>Chlorella</i>		Dominio: Eukaryota Reino: Plantae División Charophyta Clase Conjugatophyceae Orden Desmidiales Familia Closteriaceae Género: <i>Closterium</i>	
Dominio: Eukaryota Reino: Plantae División: Chlorophyta Clase: Chlorophyceae		Dominio: Eukaryota Reino: Plantae División: Chlorophyta Clase Chlorophyceae Orden Sphaeropleales Familia Scenedesmaceae Subfamilia Scenedesmoidea Género: <i>Scenedesmus</i>	

## CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

En concordancia con lo afirmado por Smith y Crews, (2014), los tratamientos 3, 4, 7 y 8 presentaron una reducción de biomasa algal debido a la herbivoría descontrolada de los consumidores primarios (Cladoceros: micro-crustáceos de agua dulce). Este fenómeno se debió a una reducción o ausencia de depredadores carnívoros (Rotíferos), que permite que los consumidores primarios puedan multiplicarse sin freno; y a las condiciones del medio (pH > 7). Otra condición no deseada en estos tratamientos es la presencia de especies indeseables como huevo de helmintos, de gran riesgo para la salud; y otras microalgas como diatomeas y algas filamentosas que desequilibran el consorcio.

A continuación se observa la clasificación de los microorganismos detectados en los tratamientos 3, 4 y 8.

**Tabla 20: Observación microscópica del tratamiento 3, en el día 12 del ensayo.**

Clasificación	Imagen	Clasificación	Imagen
Dominio: Eukaryota Reino: Plantae División: Chlorophyta Clase Chlorophyceae Orden Sphaeropleales Familia Scenedesmaceae Subfamilia Scenedesmoidea Género: <i>Scenedesmus</i>		Dominio: Eukaryota Reino: Plantae División: Chlorophyta Clase: Trebouxiophyceae Orden: Chlorellales Familia: Chlorellaceae Género: <i>Chlorella</i>	
División Bacillariophyta Clase: Bacillariophyceae		Huevos de helmintos	

## CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

Tabla 21: Observación microscópica del tratamiento 4, en el día 12 del ensayo.

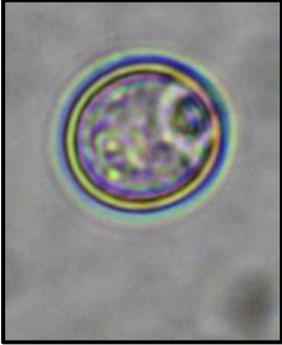
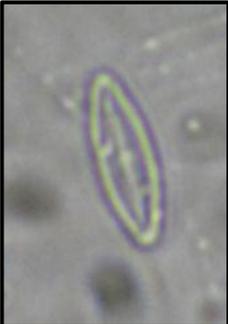
Clasificación	Imagen	Clasificación	Imagen
Huevo de helminto		Filo: Rotíferos Clase: Bdelliodeos	
División Bacillariophyta Clase: Bacillariophyceae			

Tabla 22: Observación microscópica del tratamiento 8, en el día 12 del ensayo.

Clasificación	Imagen	Clasificación	Imagen
Huevo de helminto		División Bacillariophyta Clase: Bacillariophyceae	

# CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

## 5. CONCLUSIONES

Es importante destacar que el ensayo, por realizarse sobre una muestra tomada en verano, no puede ser utilizado para generalizar los resultados, sino realizar conclusiones acotadas al momento de toma de muestra. Para realizar una evaluación del efluente es necesario repetir el ensayo durante las cuatro estaciones del año, por un periodo de 2 años, por lo cual se pretende seguir realizando ensayos que contemplen estas variables. Este ensayo representó un avance en cuanto a determinar las condiciones óptimas necesarias para realizar la biorremediación de efluentes urbanos con microalgas y direcciona los lineamientos para futuros ensayos en la temática, teniendo en cuenta la posibilidad de reducción de los tiempos de cultivo para la aplicación de la propuesta presentada en esta tesina y determinar la presencia de organismos patógenos como huevos de helmintos.

En cuanto a lo observado en este ensayo se puede concluir que el cultivo de algas, en la muestra de aguas residuales empleada, ofrece las ventajas que asocian la biorremediación de aguas residuales de origen urbano y, simultáneamente, la producción de biomasa de algas. Esta biomasa tiene varios usos potenciales, entre los cuales se propone en este trabajo la obtención de lípidos. Se requiere una evaluación físico-química y biológica en los días 3 y 5 para llegar a una conclusión en cuanto al tratamiento eficiente.

En cuanto a la producción de biomasa, el empleo de 20 % de inóculo, inyección de CO<sub>2</sub> y el empleo del efluente como medio nutricional (tratamiento 5) obtuvo los resultados más altos del ensayo (97 mg/L) en un corto plazo (3 días). La productividad diaria fue de 32,3 mg/L/día y la producción de lípidos 2,8 mg/L, lo que representa un valor bajo. En cuanto al proceso biorremediador se observó que el tratamiento 5 disminuyó en un 49,09 % la DBO<sub>5</sub>, 40,79 % la DQO, 50 % del Nitrógeno orgánico, 94 % del nitrato, 48% del fosfato. En cuanto a las condiciones organolépticas el sobrenadante es incoloro e inodoro. El riesgo de sodificación en el tratamiento 5 fue moderado, por lo que no se aconseja utilizar para riego. En la observación macroscópica se mostró un cambio de coloración de verde claro a verde oscuro, pero en la observación microscópica se detectaron tipos de microalgas no deseadas (filamentosas) y 40 % de *Chlorella sp.*, un valor bajo en relación a lo esperado (90%). Si se propone un ciclo semicontinuo de remediación, este tratamiento no sería un tratamiento adecuado ya que las condiciones del consorcio se vieron desmejoradas a lo

## CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

largo de 12 días, por lo que no se conforma un equilibrio en el consorcio que permita la producción de biomasa y lípidos.

En las condiciones de 20 % de inóculo, inyección de CO<sub>2</sub> y empleo de efluente con refuerzo de 5 % de medio nutricional Bold Basal modificado (tratamiento 1) se obtuvo en el corto plazo 58 mg/L de biomasa, la producción más alta del ensayo de lípidos (16,8 mg/L de lípidos al día 3 de desarrollo del consorcio). En cuanto al proceso biorremediador se observó que disminuyó en un 63,63 % DBO<sub>5</sub>, un 51,8 % la DQO, un 38% el nitratos y aumentó la cantidad de fosfatos, para evitar este aumento, se puede modificar el implemento de sales en el medio utilizado (BBM). En cuanto al riesgo de sodicidad se encontró que no presenta riesgo por lo que podría ser utilizada el agua obtenida para riego. En la observación macroscópica se observó un cambio de color de verde claro a verde oscuro y se confirmó con la observación microscópica la predominancia de *Chlorella sp.* en un 90%, la presencia de rotíferos y la ausencia de otras microalgas no deseadas como filamentosas y diatomeas. No se detectó la presencia de huevo de helmintos, pero no es concluyente este valor ya que se realizó solo observación, sin emplear una metodología de determinación de helmintos. Por todo lo expresado el tratamiento 1 contiene las condiciones (20% de inóculo, inyección de CO<sub>2</sub> y 5% de BBM) que mejores resultados obtuvo en términos del estado del consorcio, producción de biomasa y lípidos.

En cuanto a las variables analizadas se puede distinguir al empleo de CO<sub>2</sub> como una condición favorable en cuanto a la producción de biomasa (valor medio de 118,1±5,6 mg/L) y lípidos (valor medio de 10,76±0,59 mg/L). En el caso del porcentaje de inóculo empleado se observó que un 20 % de inóculo (valor medio de 101,2±5,6 mg/L) indicó diferencia estadísticamente significativa en relación a un 10 % de inóculo (valor medio de 82,7±5,6 mg/L), no es el caso de la producción de lípidos donde no se encontró diferencia estadísticamente significativa. En cuanto al empleo de medio nutricional Bold Basal modificado se encontró que no hay diferencia estadísticamente significativa tanto en la producción de biomasa como de lípidos.

En términos de biorremediación, los parámetros evaluados indican resultados favorables y parciales de calidad del agua, por lo que es necesario complementar los análisis presentados con índices de calidad y uso de agua.

El empleo de condiciones semejantes a las condiciones de la planta de tratamiento de efluentes propuesta en Catamarca como el uso de cultivos axénicos y ciclos de luz

## **CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS**

coincidentes con fotoperiodos naturales según la época del año, permite agilizar la transferencia de resultados y con ello la articulación con los emprendimientos en la temática.

## **6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

### **Referencia de artículos científicos**

- Abdel-Raouf; Homaidan and Ibraheem, (2012). Microalgae and wastewater treatment. Saudi Journal of Biological Sciences 19, 257–275.
- Arbib Z. Ruiz J, Alvarez P. DÍAZ, Garrido-Pérez a C y Perales, J., (2014). Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: Wastewater tertiary treatment, CO<sub>2</sub> bio-fixation and low cost biofuels production. Journal homepage: [www.elsevier.com/locate/watres](http://www.elsevier.com/locate/watres)
- Brennan L., Owende P., (2010). Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. Renewable and Sustainable Energy Reviews 14. 557–577.
- Campbell, P. K, T. Beer, D. Batten, and CSIRO (Australia), (2009). Greenhouse Gas Sequestration by Algae: Energy and Greenhouse Gas Life Cycle Studies. CSIRO Energy Transformed Flagship.
- Carpenter S.R., J.F. Kitchell, J.R. Hodgson, (1985). Cascading trophic interactions and lake productivity, Bioscience 35. 634–639.
- Charpy, L.; M. Langlade and N. Vicente (2004): International symposium "Cyanobacteria for health, science and development". Embiez Island, pp. 1-5.
- Chen C., Yeh Kuei-Ling, Aisyah Rifka, Lee Duu-Jong, Chang Jo-Shu. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. Bioresource Technology 102. 71–81.
- Chindah .A., Braide Solomon A., Amakiri J., Izundu E. (2007). Succession of phytoplankton in a municipal waste water treatment system under sunlight. Revista Científica UDO Agrícola, ISSN-e 1317-9152, Vol. 7, Nº. 1, págs. 258-273
- Chisti, Y. (2007): Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances, 25: 294-306.
- Christenson L, Sims R, (2011). Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. Biotechnology Advance, 29(6): 686–702.

## CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

- Cho, S., Luong, T.T., Lee, D., Oh, Y.-K., Lee, T., (2011). Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production. *Bioresour. Technol.* 102, 8639–8645.
- Choonawala, B. B. and F. M. Swalaha, (2002): Characterisation of the effects of pre-treatments on the marine alga, *Anthophycus longifolius* to enhance lead and cadmium biosorption. Book of Abstracts of the 1st Congress of the International Society for applied Phycology/9th International Conference on Applied Algology. Rosquetas de Mar, Almería, España, p. 183.
- De Philippis, R.; R.Paperi, C. Sili and M. Vincenzini (2002): Bioremoval of copper by two exopolisaccharide producing cyanobacteria, *Cyanospira capsulate* and *Nostoc PCC 7936*. Book of Abstracts of the 1<sup>st</sup> Congress of the International Society for applied Phycology/9th International Conference on Applied Algology Rosquetas de Mar, Almería, España, p. 182.
- Feng, Y., Li, Chao., Zhang, D., (2011). Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. *Bioresour. Technol.* 101, 101–105.
- García, C., Codina M. F., da Silva S. M., Barón J. H., Sacre P., Fonollá A. y Bosch J. P., (2012). Propuesta de cultivo de microalgas para mejoramiento del tratamiento efluentes urbanos en Catamarca, Argentina. Resultados preliminares de cultivo indoor. Congreso de agua. CABA.
- Girão, E.G. y col., (2007). Seleção dos indicadores da qualidade de água Rio Jaibaras pelo emprego da análise da componente principal; *Revista Ciência Agronômica*, v.38, n.1; p.17-24.
- Gouveia L, Oliveira AC., (2009). Microalgae as a raw material for biofuels production. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36(2):269–274. doi:10.1007/s10295-008-0495-6.
- Hanuk, K. and L. Choul-Gyun, (2002): Eutrophic compounds by microalgae from wastewater. Book of Abstracts of the 1st Congress of the International Society for applied Phycology/9th International Conference on Applied Algology. Rosquetas de Mar, Almería, España, p. 209.

## CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

- Ho, H.H., Chen, C.Y., Yeh, K.L., Chen, W.M., Lin, C.Y., Chang, J.S., (2010). Characterization of photosynthetic carbon dioxide fixation ability of indigenous *Scenedesmus obliquus* isolates. *Biochem. Eng. J.* 53, 57e62.
- Ho, H.H., Chen, C.Y., Lee, D.J., Chang, J.S., (2011). Perspective on microalgal CO<sub>2</sub> emissions systems e a review. *Biotechnol. Adv.* 29, 189e198.
- Illman A.M., Scragg A.H., Shales S.W., (2000). Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen médium. *Enzyme and Microbial Technology* 27 (2000) 631–635.
- Ji, M.K., Reda A.I. Abou-Shanaba, Seong-Heon Kima, El-Sayed Salama, Sang-Hun Lee, Akhil N. Kabra, Youn-Suk Lee, Sungwoo Hongf, Byong-Hun Jeona, (2013). Cultivation of microalgae species in tertiary municipal wastewater supplemented with CO<sub>2</sub> for nutrient removal and biomass production. *Ecological Engineering.* 58. 142-148.
- Kamilya, D. y col., (2006): Growth and nutriente removal rates of *Spirulina platensis* and *Nostoc muscorum* in fish culture effluent: a laboratory-scale study. *Aquaculture Research*, 37: 1594-1597.
- Kazamia E., Aldridge D.C, Smith A.G., (2012). Synthetic ecology—a way forward for sustainable algal biofuel production *J. Biotechnol.* 162 .163–169.
- Khowaja, M., (2000): Waste stabilization ponds-design guidelines for Southern Pakistan. En: 26 th WEDC Conference: water, sanitation and hygiene: challenges of the millennium. Dhaka, Bangladesh, pp. 282-286.
- Klausmeier CA, Litchman E, Daufresne T, Levin SA., (2004). Optimal nitrogen-to-phosphorus stoichiometry of phytoplankton. *Nature*; 429:171–4.
- Kumar A, Ergas S, Yuan X, Sahu A, Zhang Q, Dewulf J., (2010). Enhanced CO<sub>2</sub> fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. *Trends Biotechnol*; 28:371–80.
- Lam M K, and Lee K T., (2012). Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnology Advance*, 30(3): 673–690.

## CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

- Larsdotter, K y col., (2002): Phosphorus removal from wastewater by microalgae in greenhouse under Swedish winter conditions. Book of Abstracts of the 1st Congress of the International Society for Applied Phycology/9th International Conference on Applied Algology. Rosquetas de Mar, Almería, España, p. 208.
- Li, Z., Yuan, H., Yang, J., Li, B., (2011). Optimization of the biomass production of oil algae *Chlorella minutissima* UTEX 2341. *Bioresour. Technol.* 102, 9128–9134.
- Lizzul A.M. P. Hellier S. Purton F. Baganz N. Ladommatos y Campos., (2014). Combined remediation and lipid production using *Chlorella sorokiniana* grown on wastewater and exhaust gases. *Bioresource Technology.* 151, 12–18.
- MacArthur R.H., Wilson E.O., (1967). *The Theory of Island Biogeography*, Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- Mahapatra D., Chanakya H.N., T.V. Ramachandra, (2014). Bioremediation and lipid synthesis through mixotrophic algal consortia in municipal wastewater. *Bioresource Technology.* 168. 142-150.
- Mata, T., Martins, A., & Caetano, N., (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 217-232.
- Mujeriego, R., (1990). *Manual Práctico de Riego con Agua Residual Municipal Regenerada*. Ediciones de la Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona.
- Metcalf & Eddy, (1991). *Ingeniería Sanitaria*. Mc Graw Hill, Barcelona.
- Mutanda T, Karthikeyan S, Bux F., (2011). The utilization of post-chlorinated municipal domestic wastewater for biomass and lipid production by *Chlorella* spp. under batch conditions. *Appl Biochem Biotechnol*; 164:1126–38.
- Olguín, Eugenia J., (2012). *Dual purpose microalgae–bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a Biorefinery*. *Biotechnology*.
- Pfromm PH, Amanor-Boadu V, Nelson R., (2011). Sustainability of algae derived biodiesel: a mass balance approach. *Bioresour Technol*;102:1185–93.
- Pittman JKDean AP, Osundeko O., (2011). The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresour Technol*; 102: 17-25.

## **CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS**

- Ramaraj, R., (2013). Freshwater microalgae growth and Carbon dioxide Sequestration, Taichung, Taiwan, National Chung Hsing Univ, PhD thesis.
- Riquelme, C. y R. Avendaño, (2003). Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura. *Revista Chilena de Historia Natural.*, 76: 725-736.
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R., (2009). Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 100–112.
- Romero, T. (2005): Uso de la microalga *Chlorella* spp. en la depuración de los residuales líquidos de la industria pesquera y su aprovechamiento. Habana. Cuba, Tesis doctoral. Universidad y facultad.CIH. Cujae.
- Ruppert, E., R. Fox, R. Barnes., (2004). *Invertebrate zoology: A functional evolutionary approach* (7th Edition). Belmont, CA: Thomson-Brooks/Cole.
- Salazar, M., (2006). Aplicación e importancia de la microalgas en el tratamiento de aguas residuales. *Contactos*, 59: 64-70.
- Scragg A.H., Illman A.M., Carden A., Shales S.W., (2002). Growth of microalgae with increased caloric values in a tubular bioreactor. *Biomass and Bioenergy* 23 (2002) 67 – 73.
- Singh, S., & Singh, D., (2010). Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 200-216.
- Segers, H., (2007). Annotated checklist of the rotifers (Phylum Rotifera), with notes on nomenclature, taxonomy and distribution. *Zootaxa*, 1564: 1-104.
- Smith V.H., Sturm B.S.M., de Noyelles F., S.A. Billings, (2010). The ecology of algal biodiesel production, *Trends Ecol. Evol.* 25 .301–309.
- Smith V. y Crews, T., (2014). Applying ecological principles of crop cultivation in large-scale algal biomass production. *Algal Research* 4. 23-34.

## CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS

- Stefouli, M. y col., (2005).E. Monitoring and assessing internalwaters (lakes) using operational space born and field measures. European Water Publications 9/10, p. 25-33.
- Stepan, D.J., R.E. Shockey, T.A. Moe, and R. Dorn., (2002). Carbon Dioxide Sequestering Using Microalgal Systems. US Department of Energy Report. -EERC-02-03.
- Tang, D., Han, W., Li, P., Miao, X., Zhong, J., (2011). CO<sub>2</sub> biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO<sub>2</sub> levels. *Bioresour. Technol.* 102, 3071e3076.
- Thajuddin, N. and G. Subramanian, (2005). Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. In: *Current Science*, 89: 47-57.
- Toti M., Dumitru M., Motelică D.M., Constantin Carolina., Mihalache Gabriela., Matei S., Matei Mirela., Bălăceanu Claudia., Dincă B., Trască N., (2001) – Experiențe privind remedierea solurilor poluate cu țitei cu ajutorul microorganismelor specifice selecționate din microflora autohtonă, *Lucrările simpozionului Ameliorarea solurilor slab productive din Oltenia*, 14-15 iunie, Craiova.
- Travieso L., Benitez F., Sanchez E., Borja R., Martin A., Colmenarejo MF., (2006). Batch mixed culture of *Chlorella vulgaris* using settled and diluted piggery waste. *Ecological Engineering*. 28(2):158-65.
- Patil V., Tran K-Q., Giselrd H.R., (2008). Towards Sustainable Production of Biofuels from Microalgae, *Int. J. Mol. Sci.* 9 1188–1195.
- Valderrama, L.T., Del Campo, C.M., Rodriguez, C.M., de-Bashan, L.E., Bashan, Y., (2002). Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscule*. *Water Res.* 36, 4185–4192.
- Wallace, R., (2002). Rotifers: exquisite metazoans. *Integrative and Comparative Biology*, 42/3: 660-667.
- Wilkie AC. Mulbry W., (2002). Recovery of dairy manure nutrients by benthic freshwater algae. *Bioresourse Technology*; 84:81-91.

## **CULTIVO DE CONSORCIO MICROALGAL AUTÓCTONO Y BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES URBANOS**

Yongmanitchai, W., Ward, O.P., (1991). Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions. *Appl. Environ. Microb.* 57, 419–425.

Zhang, Z., (2011). Animal biodiversity: an introduction to higher-level classification and taxonomic richness. *Zootaxa*, 3148: 7-12.

Zhen Guo, Yuan Liu, Haiyan Guo, Song Yan, Jun Mu, (2013). Microalgae cultivation using an aquaculture wastewater as growth medium for biomass and biofuel production. *Journal of Environmental Sciences* 2013, 25 (Suppl.) S85–S88.

Zouhayr Arbib, Jesus Ruiz Pablo A lvarez-Díaz, Carmen Garrido-Perez, Jose A. Perales, (2014). Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: Wastewater tertiary treatment, CO<sub>2</sub> bio-fixation and low cost biofuels production.

### **Referencia de libro**

Barrenetxea, Carmen O.; Serrano, Antonio P.; Gonzáles Delgado María N.; Rodríguez Vidal Francisco J. y Alfayate Blanco José M., (2003). Contaminación ambiental. Una visión desde la química. p 84; 99; 193-298.

### **Referencias de páginas web**

[www.algaebase.org](http://www.algaebase.org)

[www.elsevier.com/locate/watres](http://www.elsevier.com/locate/watres).