

**EVALUACIÓN DE LA REDUCCIÓN DE NITRÓGENO, FÓSFORO Y DQO DEL AGUA
RESIDUAL DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ALMIDÓN DE YUCA POR MEDIO
DE UN SISTEMA ALGAL**

**Proyecto de grado para optar por el título de
Ingeniero Sanitario y Ambiental**

**Autor
YARIK XAIRY CAMPO CHICANGANA**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERIA DE RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE
PROGRAMA ACADÉMICO DE INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL
SANTIAGO DE CALI
2021**

**EVALUACIÓN DE LA REDUCCIÓN DE NITRÓGENO, FÓSFORO Y DQO DEL AGUA
RESIDUAL DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ALMIDÓN DE YUCA POR MEDIO
DE UN SISTEMA ALGAL**

**Proyecto de grado para optar por el título de
Ingeniero Sanitario y Ambiental**

**Autor
YARIK XAIRY CAMPO CHICANGANA**

**Directora:
Jenny Alexandra Rodríguez Victoria
Ing. Sanitaria, MSc., PhD.**

**Codirector:
Jonathan Arturo Bautista Carrillo
Ing. Biotecnológico, MSc**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA DE RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE
INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL
SANTIAGO DE CALI
2021**

ÍNDICE

RESUMEN	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivo General.....	13
2.2. Objetivos específicos.....	13
3. MARCO REFERENCIAL	14
3.1. Almidón de yuca.....	14
3.1.1. Agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca	15
3.1.2. Tratamiento del agua residual del proceso de almidón de yuca	17
3.2. Microalgas	19
3.2.1. Metabolismo.....	19
3.2.2. Parámetros operacionales.....	22
3.2.3. Fases de crecimiento	24
3.2.4. Chlorella.....	25
3.3. Uso de microalgas para el tratamiento de agua residual	26
4. METODOLOGÍA.....	31
4.1. Agua residual	31
4.2. Microalga y condiciones de cultivo.....	32
4.3. Aclimatación de la Microalga	32
4.4. Montaje experimental y evaluación.....	34
4.5. Métodos analíticos.....	37
4.6. Manejo de datos	38
4.6.1. Porcentaje de reducción de DQO, Nitrógeno amoniacal total, Ortofosfatos.....	38
4.6.2. Tasa de consumo de DQO, Nitrógeno amoniacal total, Ortofosfatos.....	39
4.6.3. Consumo de DQO, Nitrógeno amoniacal total, Ortofosfatos.....	39
4.6.4. Productividad de Biomasa.....	40
4.7. Análisis estadístico	40
5. ANÁLISIS Y RESULTADOS	43
5.1. Características del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca....	43
5.2. Efecto del pH y la relación S/X en la reducción de DQO.....	43
5.3. Efecto del pH y la relación S/X en la reducción de Nitrógeno amoniacal total (NAT)	51
5.4. Efecto del pH y la relación S/X en la reducción de Ortofosfatos	58
5.5. Evaluación del crecimiento de biomasa.....	63
5.6. Análisis estadístico	69

5.6.1. Análisis exploratorio	69
5.6.2. Análisis de Varianza y determinación de efectos más Significativos.....	75
5.6.3. Prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de medias	77
5.6.4. Prueba de rangos de Wilcoxon.....	77
5.6.5. Validación de Supuestos	78
5.7. Selección de mejor tratamiento	80
6. CONCLUSIONES	83
7. RECOMENDACIONES.....	85
8. REFERENCIAS	87
ANEXOS	95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Características del Agua residual del proceso de extracción de almidón de Yuca	18
Tabla 3.2. Fuente de energía, carbono y vía metabólica de acuerdo con el tipo de cultivo de las microalgas.....	22
Tabla 4.1. Características fisicoquímicas del agua residual agroindustrial	32
Tabla 4.2. Composición del Medio Basal Bold	33
Tabla 4.3. Definición de periodo de aclimatación y mezcla	33
Tabla 4.4. Diseño experimental	34
Tabla 4.5. Características del agua residual utilizada en el montaje experimental	36
Tabla 4.6. Parámetros y días en que fueron evaluados durante el tiempo de montaje.....	36
Tabla 4.7. Métodos empleados para caracterización de agua residual, medición de parámetros durante aclimatación, montaje experimental y ensayo experimental	37
Tabla 4.8. Notación de los factores en el diseño experimental.....	40
Tabla 4.9. Estructura del diseño experimental	41
Tabla 4.10. Estructura del diseño experimental para caso de la Biomasa.....	42
Tabla 5.1. Características del sustrato	43
Tabla 5.2. Valores de la DQO durante el proceso experimental.....	44
Tabla 5.3. Porcentaje de reducción de DQO durante el proceso experimental	45
Tabla 5.4. Consumo de DQO.....	46
Tabla 5.5. Tasa de consumo de DQO.....	47
Tabla 5.6. Parámetros consultados en la literatura	48
Tabla 5.7. Valores del pH durante el periodo de cultivo	50
Tabla 5.8. Valores del NAT durante el proceso experimental.....	52
Tabla 5.9. Porcentaje de reducción de NAT durante el proceso experimental	53
Tabla 5.10. Consumo de NAT	54
Tabla 5.11. Tasa de Consumo de NAT	54
Tabla 5.12. Parámetros consultados en la literatura	56
Tabla 5.13. Valores de Ortofosfatos durante el proceso experimental	58
Tabla 5.14. Porcentaje de reducción de Ortofosfatos durante el proceso experimental ...	59
Tabla 5.15. Consumo de Ortofosfatos	59
Tabla 5.16. Tasa de Consumo de Ortofosfatos.....	60
Tabla 5.17. Parámetros consultados en la literatura	61
Tabla 5.18. Productividad de biomasa durante el proceso experimental.....	65
Tabla 5.19. Biomasa máxima obtenida durante el proceso experimental.....	66
Tabla 5.20. Parámetros consultados en la literatura	67
Tabla 5.21. Análisis exploratorio para la reducción de DQO	70
Tabla 5.22. Análisis exploratorio para el consumo de DQO	70
Tabla 5.23. Análisis exploratorio para la tasa de consumo de DQO.....	71
Tabla 5.24. Análisis exploratorio para la reducción de nitrógeno	71
Tabla 5.25. Análisis exploratorio para consumo de nitrógeno	72
Tabla 5.26. Análisis exploratorio para la tasa de consumo de nitrógeno	72
Tabla 5.27. Análisis exploratorio para la reducción de fosforo	73
Tabla 5.28. Análisis exploratorio para consumo de fosforo	73
Tabla 5.29. Análisis exploratorio para la tasa de consumo de fosforo.....	73
Tabla 5.30. Análisis exploratorio para la productividad de biomasa	74

Tabla 5.31. Análisis exploratorio para la biomasa máxima.....	74
Tabla 5.32. Análisis de varianza para el nitrógeno.....	75
Tabla 5.33. Análisis de varianza para el fosforo.....	75
Tabla 5.34. Análisis de varianza para la DQO	76
Tabla 5.35. Análisis de varianza para la Biomasa.....	76
Tabla 5.36. Resultados Prueba de Kruskal-Wallis	77
Tabla 5.37. Resultados prueba de rangos de Wilcoxon	78
Tabla 5.38. Validación de Supuestos (Valores – p).....	79
Tabla 5.39. Tratamiento óptimo para DQO	80
Tabla 5.40. Tratamiento optimo NAT	80
Tabla 5.41. Tratamiento óptimo para Ortofosfatos	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1. Diagrama del proceso de extracción de almidón de Yuca.....	15
Figura 3.2. Esquema de la utilización de energía lumínica por parte de las microalgas ..	19
Figura 3.3. Curva de crecimiento de microalgas en cultivo Batch.	25
Figura 4.1. Reactores utilizados en el montaje experimental	34
Figura 4.2. Procedimiento del montaje experimental.....	36
Figura 5.1. Comportamiento de la DQO durante el proceso experimental	44
Figura 5.2. Porcentaje de reducción de DQO durante el proceso experimental.	45
Figura 5.3. Consumo de DQO durante el proceso experimental	46
Figura 5.4. Tasa de consumo de DQO durante el proceso experimental.	47
Figura 5.5. Comportamiento del pH durante el proceso experimental	50
Figura 5.6. Comportamiento del NAT durante el proceso experimental	52
Figura 5.7. Porcentaje de reducción de NAT durante el proceso experimental	53
Figura 5.8. Consumo de NAT durante el proceso experimental	54
Figura 5.9. Tasa de consumo de NAT durante el proceso experimental	55
Figura 5.10. Comportamiento de la concentración de Ortofosfatos durante el proceso experimental.	58
Figura 5.11. Porcentaje de reducción de Ortofosfatos durante el proceso experimental .	59
Figura 5.12. Consumo de Ortofosfatos durante el proceso experimental	60
Figura 5.13. Tasa de consumo de Ortofosfatos durante el proceso experimental	60
Figura 5.14. Comportamiento de la concentración de biomasa durante el proceso experimental	64
Figura 5.15. Variación de color en los reactores del montaje experimental	65
Figura 5.16. Productividad de Biomasa durante el proceso experimental	66
Figura 5.17. Biomasa máxima obtenida durante el proceso experimental.....	66

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Cálculos del montaje experimental	95
Anexo 2. Prueba de Levene para la homogeneidad de Varianzas	97
Anexo 3. Graficas intervalos de confianza para Nitrógeno	98
Anexo 4. Graficas intervalos de confianza para Fosforo	99
Anexo 5. Graficas intervalos de confianza para DQO	100
Anexo 6. Graficas intervalos de confianza crecimiento de Biomasa.....	101
Anexo 7. Graficas validación de supuestos para Nitrógeno	101
Anexo 8. Graficas validación de supuestos para Fosforo.....	102
Anexo 9. Graficas validación de supuestos para DQO.....	103
Anexo 10. Graficas validación de supuestos para crecimiento de Biomasa.....	104

AGRADECIMIENTOS

Como descendiente Quechua – Aymara quiero agradecer a todos los seres creadores del Uku Pacha, Kai Pacha, Hanan Pacha y Hawa Pacha por permitir mi existencia y ser la guía en cada uno de los momentos de mi vida. Jallalla, Jallalla, Jallalla.

A mi familia por su cariño. A mis abuelos Ninfa y Cesar por siempre estar pendientes de mi bienestar. Gracias a mis padres Suyani y Ary por todo su amor y apoyo incondicional, les debo mucho en mi vida. La culminación de este proyecto de grado, así como de mi formación académica va dedicado a ustedes.

A la profesora Jenny Rodríguez, por las enseñanzas y orientación durante mi formación académica y en el desarrollo de este proyecto. La culminación de este trabajo es gracias a su paciencia, colaboración y oportunidades brindadas. Muchas gracias por toda su calidad humana. Le deseo lo mejor en su vida.

A Jonathan Bautista por su colaboración, orientación y disposición durante cada una de las etapas de este proyecto de grado.

A David y Julián por su amistad y solidaridad incondicional. A Bismarck y Ricardo por los años de amistad, y colaboración en la preparación del sustrato utilizado en este trabajo. Para ustedes mis mejores deseos.

A Ambar, por ser la motivación para elegir este camino. Siempre te recuerdo con mucho cariño y deseo lo mejor en cada uno de los proyectos que decidas emprender.

A todo el personal del laboratorio de procesos de tratamiento, especialmente a Víctor Castaño, por las enseñanzas y apoyo durante la fase experimental.

Al profesor Carlos Madera por sus consejos y disposición como director del programa académico de Ingeniería Sanitaria y Ambiental.

A Carlos Taimal por el apoyo en el análisis estadístico de los datos.

A la Universidad del Valle y al cuerpo docente por permitir la formación profesional de miles de estudiantes que ingresan con muchos sueños y esperanzas en un país que siempre se ha caracterizado por presentar una amplia desigualdad social. Asimismo, a todo el personal que hace parte de las diferentes dependencias de la universidad, porque con su trabajo sostienen el campus y garantizan el bienestar universitario.

Finalmente se dedica este trabajo a las personas que durante muchos años han luchado por lograr una educación pública y gratuita, a los y las jóvenes que dieron su vida por el ideal de un país más justo; la dignidad de su lucha nunca se olvidará y seguirá materializándose en los y las jóvenes que seguirán con orgullo, dignidad y amor enfrentando la violencia asesina de los gobiernos opresores que siempre han querido mancillar y robar este país ... ¡Jallalla la justa lucha del pueblo colombiano!

RESUMEN

El agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca se caracteriza por presentar un alto potencial de aprovechamiento biológico, ya que dispone de fuentes de carbono fácilmente asimilables (carbohidratos solubles, lípidos) y nutrientes, moléculas que son necesarias en el desarrollo de cultivos de microalgas. Sin embargo, deben presentarse condiciones favorables en el cultivo para que las microalgas puedan adaptarse al sustrato y maximizar el crecimiento con la respectiva depuración del efluente. Factores como la limitación de nutrientes, concentración inicial del inóculo, pH, carga orgánica del efluente, temperatura, luz, entre otros, pueden promover o inhibir el crecimiento de las microalgas dependiendo de los rangos óptimos para cada especie.

En el presente trabajo se evaluó la influencia de los factores relación sustrato/biomasa (S/X) y el pH, en la reducción de nitrógeno, fósforo y DQO del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca, utilizando la microalga *Chlorella sp.* Así mismo, se evaluó el efecto de los factores en el crecimiento de biomasa microalgal. La relación S/X se evaluó mediante 3 niveles (100, 50, 30 g DQO por g inóculo) y el pH mediante 2 niveles (7,5 y 6,5). La relación S/X se obtuvo al mantener la concentración inicial de inóculo constante ($0,5 \text{ gL}^{-1}$), mientras que la concentración de sustrato se varió por medio de diluciones. La concentración del inóculo se obtuvo después de un periodo de aclimatación que duró 20 días. El ensayo experimental se realizó después del periodo de aclimatación, con una duración de 13 días, durante ese tiempo se monitoreó el pH, concentración de Ortofosfatos, concentración de Nitrógeno amoniacal total (NAT) y crecimiento de biomasa. Con los datos obtenidos se determinó el porcentaje de reducción, consumo y tasa de consumo de nutrientes y DQO, así como la productividad y Biomasa máxima (B_{max}).

Los resultados permitieron concluir que al incrementar la relación S/X, se optimizaba la reducción de DQO y nutrientes, lo cual se corroboró en el análisis estadístico ($p < 0,05$). El tratamiento que presentó el mejor comportamiento durante la fase experimental fue T₁B (S/X=100; pH=7,5), con porcentajes de reducción, consumo y tasa de consumo de DQO iguales a: $94,27 \pm 1,27 \%$, $3.697,56 \pm 71,24 \text{ mg}$, $284,43 \pm 5,48 \text{ mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$ respectivamente. Para la reducción de nitrógeno se obtuvieron los siguientes resultados: $98,24 \pm 0,66 \%$, $6,11 \pm 2,12 \text{ mg}$, $0,47 \pm 0,16 \text{ mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$ respectivamente. Para la reducción de Ortofosfatos se obtuvieron los siguientes resultados: $85,46 \pm 2,55 \%$, $17,70 \pm 1,44 \text{ mg}$, $1,36 \pm 0,11 \text{ mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$ respectivamente. Se pudo observar que el pH no presentó un efecto significativo en las variables respuesta, lo cual se corroboró en el análisis estadístico ($p > 0,05$).

Los factores evaluados (S/X y pH) no presentaron un efecto significativo en el crecimiento de biomasa ($p > 0,05$), sin embargo, el mejor tratamiento se seleccionó de acuerdo con el comportamiento que presentó en el resto de las variables evaluadas durante el periodo de cultivo. El tratamiento que presentó los valores más altos de producción de biomasa y Biomasa máxima (B_{max}) fue T₁B, con valores de $0,076 \pm 0,048 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ y $1,29 \pm 0,69 \text{ gL}^{-1}$ respectivamente.

Palabras clave: Agua residual agroindustrial, Tratamiento de agua residual, Crecimiento microalgal, Relación S/X, pH

1. INTRODUCCIÓN

El incremento mundial de la población ha inducido al aumento en la producción de alimentos con la consecuente generación de residuos. Entre las industrias de alimentos, la producción de yuca presenta un aumento continuo especialmente en Asia y América donde se consume extensamente. Según la organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la producción mundial de yuca mantiene un crecimiento acelerado, con una tasa promedio de 281 millones de toneladas al año y es una fuente de carbohidratos para más de 400 millones de personas en todo el mundo, especialmente en países en vía de desarrollo (El Mekawy et al., 2015, Leifeld et al., 2018). El proceso industrial genera dos tipos de residuos: sólidos, compuesto de partes leñosas de las raíces, porciones de fibras retenidas en los tamices, bagazo (Bhatnagar et al., 2015) y líquidos provenientes del lavado de raíces y agua originada en las prensas de yuca (Leifeld et al., 2018).

Colombia produce el 1,2% del total mundial de yuca (2 millones de toneladas⁻¹), donde el 10% de la producción nacional se destina a la elaboración de almidón nativo (fresco) o fermentado (agrio). La producción de almidón agrio de yuca es una de las actividades económicas más importantes en el norte del departamento del Cauca, es llevada a cabo en pequeñas y medianas industrias denominadas rallanderías. Aproximadamente, el 80% del procesamiento de yuca del país para la obtención de almidón es realizado por la comunidad rallandera asentada en el Departamento del Cauca, las cuales procesan entre 5 y 12,5 toneladas por semana (Torres et al., 2007). El producto obtenido es implementado en otros procesos industriales, especialmente en el sector alimenticio (Alarcón y Dufour, 2002).

El proceso productivo genera agua residual básicamente en las etapas de lavado-pelado, colado y sedimentación, y es en esta última donde se produce el mayor volumen correspondiente (79,8%) (Torres et al., 2006). El agua residual se caracteriza por la presencia de una alta carga contaminante medida como DQO y DBO₅, presencia de sólidos disueltos, nutrientes, bajos valores de pH y compuestos cianurados que pueden representar un riesgo para la salud pública (Rodríguez et al., 2003, Torres et al., 2006, Leifeld et al., 2018). La cantidad de agua utilizada en el proceso de extracción es del orden de 20.000 L por tonelada de yuca procesada, lo que a su vez genera agua residual con una DQO entre 2.500 y 5.500 mgL⁻¹, representando una carga contaminante de 15,5 y 3,5 toneladas⁻¹ de DQO y DBO₅ respectivamente (Rodríguez et al., 2003). Por lo tanto, es necesario realizar un tratamiento para reducir la carga contaminante y evitar impactos negativos en los cuerpos hídricos receptores.

Una de las alternativas para el tratamiento de este tipo de agua es la fitorremediación, es decir, el uso de microalgas. Esta tecnología podría considerarse como una opción viable ya que las microalgas poseen la capacidad de eliminar o biotransformar contaminantes de un medio líquido o gaseoso incorporándolos a su metabolismo para la generación de biomasa. Esta capacidad resulta en un sistema de cultivo con 2 propósitos: eliminación de contaminantes y producción de biomasa con fines comerciales (Hernández y Labbé, 2014).

La biomasa de microalgas se ha utilizado en la elaboración de una amplia gama de productos biotecnológicos con usos en la industria alimenticia y farmacéutica, así como para la producción de cosméticos, compuestos orgánicos, alimentos de bajo costo para animales, lípidos, polímeros, pigmentos, biocombustibles etc. (Pérez-García et al., 2011, Hernández y Labbé, 2014, Xiong et al., 2018). Así mismo, se ha utilizado de manera satisfactoria en el tratamiento de agua residual de diferentes procedencias, caracterizada por la presencia de cargas orgánicas elevadas, metales pesados, xenobióticos y nutrientes

(como en el caso del agua residual agroindustrial) (Hernández y Labbé, 2014). Adicionalmente, tienen la ventaja de adaptabilidad a condiciones extremas y alta tasa de crecimiento (Forero, 2015).

Sin embargo, las condiciones de crecimiento óptimas para un sistema microalgal depende de diferentes factores, como el tipo y características del sustrato, la relación S/X (entre la concentración de sustrato y la concentración inicial de biomasa), luz, pH, temperatura, aireación, nutrientes y condiciones de cultivo. Comprender su influencia individual, así como las interacciones entre estos factores, es crucial para promover aún más el crecimiento de las microalgas y optimizar el proceso de fitorremediación (Hernández y Labbé, 2014, Turon et al., 2016).

En este estudio se pretende evaluar el uso de un cultivo mixotrófico de la microalga *Chlorella sp.* como una alternativa para el tratamiento del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca, estudiando el efecto la relación S/X en la reducción de DQO, Nitrógeno y Fósforo, bajo dos niveles de pH. Asimismo, se evaluará el crecimiento de biomasa microalgal.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Evaluar la reducción de nitrógeno, fósforo y DQO del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca por medio de un sistema algal

2.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto del pH y la relación S/X en la eficiencia de reducción de materia orgánica carbonácea y nitrogenada en un sistema algal
- Determinar el efecto del pH y la relación S/X en el crecimiento de biomasa

3. MARCO REFERENCIAL

3.1. Almidón de yuca

El almidón es quizás el polímero natural más importante que existe y es la mayor fuente de energía obtenida de varias plantas. Se encuentra en las semillas de cereales (maíz, trigo, arroz, sorgo), en tubérculos (papa), en raíces (yuca, batata, arrurruz), en semillas de leguminosas (frijoles, lentejas, guisantes), frutas (bananas y manzanas y tomates verdes), troncos (palma sago) y hojas (tabaco) (Aristizábal et al., 2007).

La yuca (*Manihot Esculenta spp.*), es un cultivo arbustivo perenne perteneciente a la familia Euphorbiaceae, se conoce como tapioca en los países asiáticos. Este cultivo de raíz tiene un alto contenido de almidón de hasta 90% (peso seco). Puede crecer en tierras infértiles con un aporte mínimo de productos químicos, como fertilizantes, herbicidas e insecticidas; por lo que es una de las materias primas agrícolas más baratas y sustentables (Zhang et al., 2016).

La yuca es el tubérculo más importante en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, es la tercera fuente más grande de carbohidratos, por lo que se considera una importante fuente de energía. (Xia et al., 2014, Leifeld et al., 2018). El alto contenido de almidón en la yuca y su mayor proporción de amilosa en comparación con otras fuentes de almidón hace de este un importante cultivo industrial y alimenticio rico en calorías. El almidón extraído de la yuca se usa principalmente sin modificar, es decir como almidón nativo, pero también se usa modificado con diferentes tratamientos para mejorar sus propiedades de consistencia, viscosidad, estabilidad a cambios del pH y temperatura, con la finalidad de utilizarlo en diferentes procesos industriales, como elaboración de alimento para animales, producción de etanol, industria textil, farmacéutica etc. (Aristizábal et al., 2007, Borghetti, 2009, Pingmuanglek et al., 2017).

El proceso para obtener el almidón de yuca puede definirse en 6 etapas para almidón dulce, y 8 etapas para almidón agrio. A continuación, se describe cada etapa. En la Figura 3.1 se muestra el esquema del proceso (Alarcón y Dufour, 2002; Aristizábal et al., 2007).

- **Recepción de las raíces:** las raíces una vez cosechadas deben ser transportadas a la planta de procesamiento en un periodo de 24 a 48 horas para evitar su deterioro fisiológico y/o microbiano. Un factor importante en la producción de almidón de yuca de alta calidad es que todo el proceso desde la cosecha de las raíces hasta el secado del almidón debe ser ejecutado en el menor tiempo posible.
- **Lavado y pelado de las raíces:** este procedimiento puede ser manual o mecánico, en el primer caso se utilizan herramientas convencionales (cuchillos) para realizar el pelado, la cascarilla se desprende por fricción de unas raíces con otras. En el segundo caso, el pelado se realiza por medio de un tambor cilíndrico, en el cual las raíces de la yuca reciben chorros de agua mientras se friccionan unas con otras y con las paredes del tambor. Generalmente, las pérdidas en el lavado son del 2% al 3% del peso de las raíces frescas. Se debe evitar pérdida de la cáscara ya que esta también contiene almidón.
- **Rallado o desintegración:** Se desagregan las raíces para romper las paredes celulares y dejar libre los gránulos de almidón, convirtiendo las raíces en una masa conocida como pulpa o masa rallada. Si el rallado no es eficiente, no se logran separar totalmente

los gránulos de almidón de las fibras, por lo tanto, se perderá almidón en el afrecho desechado. Por otra parte, si el rallado es demasiado fino, los gránulos pequeños de almidón sufrirán daño físico y deterioro enzimático; la sedimentación sería más lenta ya que el gránulo fino pierde densidad y se formaría mayor cantidad de mancha.

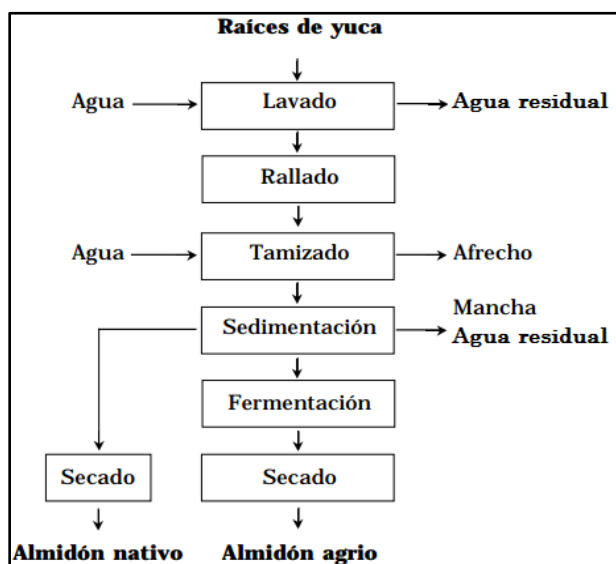


Figura 3.1. Diagrama del proceso de extracción de almidón de Yuca
Fuente: Alarcón y Dufour (2002)

- **Colado o extracción:** el almidón es separado de la pulpa en un tambor giratorio con agua; el producto obtenido es una suspensión denominada lechada. Se debe evitar que pequeñas partículas de fibra pasen a la lechada; por eso, en muchos casos se recomienda realizar un recolado de la lechada con el objetivo de retener las fibras finas.
- **Sedimentación:** separación del almidón de la lechada mediante canales o tanques obteniendo almidón dulce o fresco. Queda como residuo de este proceso agua residual y mancha (almidón agrio de baja calidad)
- **Fermentación:** el almidón dulce o fresco puede ser fermentado en condiciones ambientales y cubierto con una pequeña lámina de agua durante un periodo de dos a tres semanas para obtener almidón agrio
- **Secado:** puede ser realizado dependiendo del nivel tecnológico, por secado solar o artificial. En ambos casos, se busca remover la humedad del almidón hasta un 13 %
- **Acondicionamiento:** comprende las etapas de molienda, tamizado y empaque del producto final.

3.1.1. Agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca

En el proceso de extracción de almidón de yuca, se generan residuos sólidos compuestos de partes leñosas y deterioradas de las raíces, porciones fibrosas retenidas en los procesos de cribado, y residuos líquidos (Campos et al., 2006). El agua residual proveniente de la extracción de almidón de yuca es el resultado de la mezcla del agua utilizada en el lavado de las raíces y almidón, con el agua liberada en la desintegración de la yuca. Varias

sustancias son transportadas en el residuo, como carbohidratos, nitratos, proteínas, fosfatos, azúcares, almidón, sales, potasio y cianuro (de Carvalho et al., 2018, Leifeld et al., 2018).

A pesar de la relevante importancia para el sector industrial alimenticio, los procesos necesarios para producir almidón generan diversos residuos, lo cual es considerado un problema para el ambiente si se presenta una inadecuada disposición. El agua residual, es de especial interés porque se produce en gran cantidad dado que el proceso requiere de grandes volúmenes de agua. El agua residual al ser liberada en el ambiente puede causar serios problemas de contaminación, porque además de su alta carga orgánica, contiene cianuro, un compuesto tóxico para la mayoría de procesos respiratorios (Dos Santos, 2018).

Las comunidades ubicadas alrededor de estas industrias se ven afectadas por los cambios ambientales, como la presencia de olores, así como un fuerte deterioro de la calidad de los cuerpos de agua a los cuales se destinan las descargas de agua residual sin tratamiento previo (Ferreira et al., 2017).

Este tipo de agua residual contiene una alta concentración de linamarina (un glucósido cianogénico), el cual se libera después de la disrupción celular de la estructura de la raíz y, al ser soluble en agua, se elimina casi por completo con el agua de lavado utilizada en procesamiento de la yuca. Además, si se tiene en cuenta sus altas cargas orgánicas y presencia de nutrientes, la descarga de estos residuos puede conducir a la reducción de oxígeno disuelto, eutrofización y reducción de la capacidad de autodepuración de los cuerpos de agua, así como la muerte de la fauna acuática y animales que consumen agua con un exceso de cianuro (Rajbhandari y Annachhatre, 2004, Campos et al., 2006, Leifeld et al., 2018). En los humanos, el cianuro causa agitación en la respiración, temblores y otros efectos neurológicos con una exposición a corto plazo, y a largo plazo causa pérdida de peso, efectos en la tiroides, daño neuronal e incluso la muerte (Vedula et al., 2013, Leifeld et al., 2018).

El agua residual del procesamiento de yuca tiene una composición variable dependiendo del tipo de cultivo (cuyo contenido de almidón y cianuro varía) y tipo de proceso industrial empleado. Descartando el almidón y las fibras, la raíz contiene un 60% de agua y otros compuestos que se mezclan con cantidades variables de agua utilizada en el proceso y que constituyen el agua residual. Por lo tanto, la DQO varía de 6 a 56 gL⁻¹, sin embargo la relación C:N:P es más predecible, de aproximadamente 330:30:1 en base molar (de Carvalho et al., 2018).

Souza et al. (2014) citado por Leifeld et al. (2018) reporta que el agua residual presenta valores de DBO que oscilan entre 14.000 y 34.000 mgL⁻¹, además de producir un volumen de 300 a 3.000 L por tonelada de raíces procesadas. Anrain (1983), Pawlosky et al. (1991) y Parizotto (1999) citados por Feiden (2001) reportan que en plantas de procesamiento de almidón de yuca en Brasil se producen volúmenes de agua residual que varían entre 2.500 y 5.000 m³ por tonelada de yuca procesada, con valores de DQO entre 7,66 y 11,63 gL⁻¹.

Hien et al. (1999) reporta que en Vietnam se producen 12 L de agua residual por kg de almidón procesado, con fábricas que tienen la capacidad de procesar de 3 a 10 toneladas de yuca por día, además se reportan valores de DQO entre 11.077 y 13.449 mgL⁻¹.

En el caso de Colombia, en el norte del departamento del Cauca, la cantidad de agua utilizada en el proceso de extracción es del orden de 20 m³ por tonelada de yuca procesada. Las principales etapas en las que se genera agua residual son: lavado-pelado y sedimentación. El agua residual procedente del lavado y pelado se caracteriza por contener

gran cantidad de material inerte, cascarilla y valores de DQO bajos, la proveniente de la sedimentación presenta valores de DQO entre 2.500 y 5.500 mgL⁻¹ (Rodríguez et al., 2003, Torres et al., 2007). En la Tabla 3.1 se expone la caracterización fisicoquímica del agua realizada por varios autores.

3.1.2. Tratamiento del agua residual del proceso de almidón de yuca

En algunos casos, el tratamiento que se le da a este tipo de agua residual consiste en un tamizado como tratamiento preliminar, sedimentación primaria para la separación de arena y otras partículas, luego una laguna anaerobia y una laguna facultativa. El efluente resultante es rico en nitrógeno y fosfatos, lo cual puede favorecer el crecimiento de microalgas (de Carvalho et al., 2018).

Feiden (2001) reporta que los estudios efectuados para el tratamiento del agua residual son, predominantemente, de procesos biológicos anaerobios, aunque se han realizado investigaciones utilizando otros procesos. Faria (1978) citado por Feiden (2001) obtuvo reducciones de DQO del 44% utilizando coagulación y floculación química, con hidróxido de calcio y sulfato de aluminio. El mismo autor, aplicó un proceso de lodos activados, obteniendo reducciones de DQO del orden del 90%.

Dos santos et al. (2018) reportan que las lagunas aerobias y anaerobias son la forma más común de tratamiento de este tipo de efluentes en países como Tailandia, Brasil y Vietnam. Sin embargo, estos sistemas presentan desventajas, como la no optimización de la descomposición anaerobia, los riesgos de sobrecarga de la laguna y la falta de monitoreo del proceso.

En el estudio Colin et al. (2007) se evaluó un filtro anaerobio de flujo horizontal, obteniendo un porcentaje de remoción de DQO del 87%. Según Torres et al. (2007) debido a las características ácidas del agua residual de la etapa de sedimentación del proceso de extracción de almidón yuca, se hace indispensable su acondicionamiento químico para permitir el tratamiento biológico anaerobio. Asimismo, Pérez y Torres. (2008) enfatizan en que puede presentar inestabilidad en el proceso debido a sobrecargas orgánicas, presencia de tóxicos o variación de temperatura. Con lo cual se produce un aumento en la producción de ácidos orgánicos, afectando las condiciones necesarias, por lo que se requiere monitorear variables operacionales por medio de índices de alcalinidad y evitar que se produzca la acidificación.

Tabla 3.1. Características del Agua residual del proceso de extracción de almidón de Yuca

Parámetro	Referencia									
	(Hien et al., 1999)	(Nitschke y Pastore 2006) ^a	(Colín et al., 2007) ^b	(Borghetti, 2009)	(Pérez et al., 2009) ^b	(De Oliveira et al., 2013) ^a	(Khongsu mran et al., 2014) ^a	(Zhang et al., 2016)	(Dos santos et al., 2017) ^a	(Leifeld et al., 2018)
Carbohidratos (mg/L)		35.300	330 - 400					9.600 - 37.500		
Nitrógeno total (mg/L)		2.500	80 - 150	154	136 - 196,6	160	2.670	100 - 1.300	98	
Fosforo (mg/L)		225,9	20 - 35	19,26	22,2 - 47,8		80	70 - 780		3.397 - 3.571
DQO (mg/L)	12.077-19.083	55.820	4.200 - 7.000	6.180	3.400 - 5.400	16.090	10.560	8.000 - 62.200	6.800	3.082 - 3.919
DBO ₅ (mg/L)			1.100 - 3.900		1.876 - 2.459					
SST (mg/L)			700 - 200	40.500	330 - 1.180	3.540			6.500	
SDT (mg/L)	805 - 1.089				1.745 - 2.320					
NH ₄ (mg/L)	161-187	174				14,4	2			
pH (UND)	5,12 - 5,60	5,9	3,6 - 6,5	4,4	4,1 - 4,4	5,1	4,34	3,6 - 6,2	6,8	3,72 - 3,76
Alcalinidad Total (mg/L)					0 - 10					692 - 730
Cianuro (mg/L)	4,5 - 6,7		3 - 5	62	0,1 - 0,4				1,9	
Potasio (mg/L)		2.665,1		1.463	243 - 249					
Calcio (mg/L)		272,5			21,8 - 25,8					
Magnesio (mg/L)		519			12,4 - 24,4					
Azufre (mg/L)		104			37,3 - 54,8					
Hierro (mg/L)		7,8			0,4 - 0,7					
Zinc (mg/L)		7,3		3,6	0,7					
Manganeso (mg/L)		1,8								
Cobre (mg/L)		0,6			16,5 - 18,2					

^a Adaptado de de Carvalho et al., (2018); ^b Industrias de producción de almidón de Yuca en Colombia.

3.2. Microalgas

Las microfitas o microalgas son organismos fotosintéticos que pueden ser procariotas (cianobacterias) o eucariotas (chlorophytas), son talofitas, es decir, que presentan deficiencias en raíces, tallos y hojas, además poseen clorofila para llevar a cabo la fotosíntesis. Toleran condiciones adversas debido a su estructura multicelular o unicelular simple, requiriendo prácticamente solo luz solar y nutrientes inorgánicos simples. Se encuentran entre los organismos vivos más antiguos. Pueden crecer rápidamente en un gran número de ambientes como agua dulce, agua residual y ambientes marinos, así como en condiciones ambientales extremas como la presencia de elevadas temperaturas, además se caracterizan por una alta eficiencia fotosintética en comparación con plantas terrestres de mayor tamaño. El tamaño de las microalgas varía desde los micrómetros a milímetros y depende de la especie, existen alrededor de 200.000 a 800.000 especies de algas, de las cuales alrededor de 50.000 especies han sido estudiadas (Chisti, 2007, Beltrán, 2014, Maity et al., 2014, Sakarika y Kornaros, 2017, Tan et al., 2018).

La mayoría de las especies de microalgas producen lípidos, carotenoides, antioxidantes, ácidos grasos, polímeros enzimáticos, péptidos, toxinas y esteroides. Un rango diverso de especies de microalgas usa energía lumínica para producir energía química por medio de la fotosíntesis, con lo cual presentan un ciclo de crecimiento natural en pocos días (Figura 3.2). Pueden crecer en diversos ambientes en presencia de radiación solar y nutrientes mínimos, sin embargo, la tasa de crecimiento se incrementa con la ayuda de nutrientes y condiciones ambientales específicas para cada especie (pH, temperatura, etc.). Entre las ventajas con respecto al cultivo de plantas de mayor tamaño para realizar el proceso de depuración, se encuentran la poca demanda de terreno, facilidad de cultivo y el aprovechamiento del agua residual como fuente de nutrientes (Maity et al., 2014). Adicionalmente, son capaces de fijar mayor cantidad de CO₂ (Serrano, 2012).

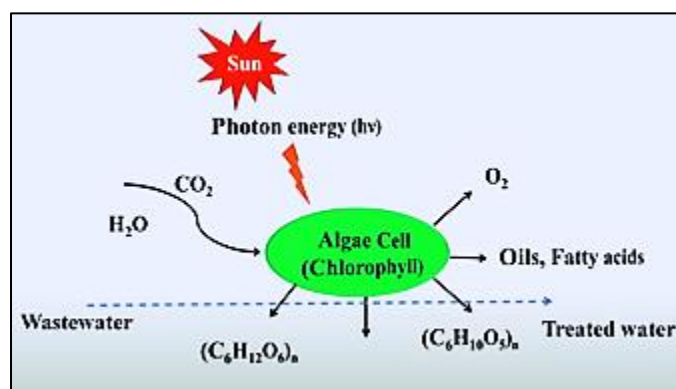


Figura 3.2. Esquema de la utilización de energía lumínica por parte de las microalgas
Photon energy: energía fotónica. Algae cell: célula algal. Oils: aceites. Fatty acids: ácidos grasos
Wastewater: agua residual. Treated water: agua tratada
Fuente: Maity et al. (2014)

3.2.1. Metabolismo

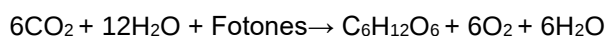
Las microalgas son organismos fotosintéticos que pueden presentar varias rutas metabólicas para la adquisición de carbono y energía, las cuales se pueden resumir como fotoautotrofia, heterotrofia y mixotrofia, dependiendo de las características específicas de la especie (Kim et al., 2013, Candido y Lombardi, 2018).

Metabolismo autótrofo

Las microalgas autotróficas usan carbono inorgánico y luz en sus procesos metabólicos y producen hidroxilo como metabolito resultando en un aumento del pH (Kim et al., 2013). Utilizan la luz solar o artificial como fuente de energía y la fuente de carbono es obtenida a partir de compuestos inorgánicos (sales).

Es el tipo de metabolismo comúnmente utilizado, en el cual se lleva a cabo el mayor ahorro de energía. Generalmente se realiza en lagunas abiertas o en fotobiorreactores. En este proceso metabólico, la energía química es formada a través de la fotosíntesis. De esta manera, un ambiente rico en CO₂ podría mejorar la productividad de biomasa hasta cierto punto; sin embargo, a medida que se lleva a cabo el crecimiento de las células se dificulta el ingreso de la luz debido al aumento de la turbiedad en el medio, por lo tanto, no es factible su aplicación en el tratamiento de agua residual, debido a que se pueden presentar altos niveles de turbiedad dependiendo del tipo de agua y cantidad, limitando el ingreso de luz (Wang et al., 2014, Cheah et al., 2018).

Los estudios de cultivos autótrofos se han centrado en el diseño de fotobiorreactores, en los cuales se puede aprovechar la irradiación incidente, mejorar la dinámica de fluidos y maximizar la producción de biomasa. La fotosíntesis es un proceso esencial para sobrevivir y obtener nutrientes orgánicos exógenos. La energía solar y el dióxido de carbono del medio ambiente son absorbidos por los cloroplastos y transformados en adenosín trifosfato (ATP) y oxígeno. Esta energía se utiliza en la respiración para proporcionar energía y ayudar en el desarrollo celular. La Ecuación 1 se muestra el proceso general de reacción fotosintética (Wang et al., 2014, Tan et al., 2018):



Ecuación 1

Metabolismo Heterótrofo

El cultivo heterótrofo utiliza carbono orgánico (por ejemplo, glucosa, acetato, agua residual etc.) como sustrato para el crecimiento de microalgas, el cual es independiente de la energía solar o lumínica. El metabolismo heterótrofo es un proceso aerobio donde la asimilación de sustratos orgánicos produce energía a través de la fosforilación oxidativa, acompañado del consumo de oxígeno como aceptor final de electrones (Tan et al., 2018).

Los compuestos orgánicos proporcionan tanto la energía como la fuente de carbono. Por lo tanto, existen microalgas que pueden desarrollarse bajo ausencia de luz, como por ejemplo la especie *Chlorella protothecoides*. El cultivo heterótrofo puede evitar los defectos asociados con la fotolimitación presente en los cultivos fotoautótrofos, con lo cual se puede alcanzar una elevada producción de biomasa. Cuando se lleva a cabo un cultivo heterotrófico, se suministra a las microalgas fuentes de carbono orgánico y el crecimiento se lleva a cabo en fermentadores. Gran variedad de compuestos orgánicos puede ser utilizados en un proceso heterotrófico, los más comunes son los azúcares y ácidos orgánicos, sin embargo, algunos estudios han revelado que el uso de polvo de maíz hidrolizado y glicerol permiten alcanzar rendimientos satisfactorios, además son sustratos económicos. No obstante, debido a los grandes requerimientos de compuestos orgánicos y biorreactores, implementar cultivos heterotróficos es más costoso que los autótrofos (Liang et al., 2009; Wang et al., 2014), razón por la cual se hace referencia a que existen estudios dedicados a evaluar sustratos asequibles económicamente (Wang et al., 2014).

Las principales desventajas del cultivo heterotrófico son: la cantidad de cepas de microalgas que pueden crecer heterotróficamente es limitada, costos asociados con la adición de sustratos orgánicos, susceptibilidad a la contaminación por otro tipo de microorganismos, es incapaz de generar metabolitos inducidos por la luz (Pérez-García et al., 2011, Cheah et al., 2018, Tan et al., 2018).

Metabolismo Mixotrófico

Existen algas que son capaces de crecer bajo procesos tanto autótrofos como heterótrofos, de manera que la fuente de energía la pueden obtener tanto de la luz como de la materia orgánica. La fuente de carbono la pueden obtener de compuestos orgánicos o inorgánicos como el CO₂. El carbono inorgánico se fija a través de la fotosíntesis, que es influenciada por las condiciones de iluminación, mientras que los compuestos orgánicos se asimilan a través de la respiración aerobia que se ve afectada por la disponibilidad de carbono orgánico. La diferencia principal entre la mixotrofia y la fotoheterotrofia, que también involucra fuentes de carbono orgánico, es que la fotoheterotrofia requiere luz como fuente de energía, mientras que la mixotrofia puede utilizar compuestos orgánicos para lograr este objetivo (Wang et al., 2014, Tan et al., 2018).

Algunos científicos sugieren que la tasa de crecimiento específico de las microalgas bajo el cultivo mixotrófico, es aproximadamente la suma de aquellas cuando se presentan condiciones fotoautotróficas y heterotróficas, mientras otros creen que la tasa de crecimiento específico en la mixotrofia no es la combinación simple de las dos formas de cultivo, en este caso, definen que los dos procesos metabólicos (es decir, la fotosíntesis para la fotoautotrofia y la respiración aerobia para la heterotrofia) se afectan mutuamente bajo cultivo en condiciones mixotróficas, lo que puede contribuir a efectos sinérgicos y mejorar la productividad de biomasa (Ebrahimian et al., 2014, Wang et al., 2014, Lin et al., 2015).

Dado que los compuestos orgánicos pueden utilizarse bajo cultivo mixotrófico, el crecimiento de las microalgas no depende estrictamente de la fotosíntesis; la luz no es un factor limitante para el crecimiento de la biomasa. Por lo tanto, la fotolimitación o la fotoinhibición pueden reducirse cuando se presentan niveles de iluminación demasiado bajos o demasiado altos (Wang et al., 2014).

Complementando la fotoautotrofia con sustratos orgánicos, el cultivo mixotrófico puede mejorar la tasa de crecimiento, acortar el ciclo de crecimiento, reducir la pérdida de biomasa en horas de oscuridad debido a la respiración, y aumentar la productividad de biomasa (Andrade y Costa, 2007, Park et al., 2012). Además, el CO₂ liberado vía respiración aerobia puede ser atrapado y reutilizado para la fotosíntesis, lo que incrementa la producción de biomasa (Wang et al., 2014). El sistema de cultivo mixotrófico ha sido probado con resultados positivos en microalgas de la especie *Chlorella* y *Botryococcus*, las cuales asimilaron carbono orgánico, nutrientes y CO₂ de manera simultánea, realizando respiración y fotosíntesis al mismo tiempo (Cheah et al., 2018).

En la Tabla 3.2 se expone el resumen de la fuente de energía, carbono y comportamiento para cada tipo de metabolismo.

Tabla 3.2. Fuente de energía, carbono y vía metabólica de acuerdo con el tipo de cultivo de las microalgas

Tipo de cultivo	Fuente de energía	Fuente de carbono	Metabolismo
Autótrofo	Luz	Compuestos inorgánicos	$H_2O + HCO_3^- \rightarrow C(\text{biomasa}) + 1/2 O_2 + OH^-$: pH incrementa
Heterótrofo	Compuestos orgánicos	Compuestos orgánicos	$(1+a) CH_2O + O_2 \rightarrow C(\text{biomasa}) + aCO_2 + (1+a) H_2O$: pH decrece
Mixotrófico	Luz y compuestos orgánicos	Compuestos orgánicos e inorgánicos	$bHCO_3 + cCH_2O \rightarrow (b+(c-a)) C(\text{biomasa}) + 3OH^- + aCO_2$: Cambio de pH inconsistentes

Adaptado de Kim et al. (2013)

3.2.2. Parámetros operacionales

Luz: la luz es un parámetro condicionante, al proporcionar toda la energía necesaria para que la comunidad microalgal pueda realizar la fotosíntesis. Un aumento de la radiación solar directa afecta a las microalgas en diversas formas, por un lado, permite alcanzar el punto de compensación de luz y en otros casos, genera fotoinhibición, que puede afectar negativamente los receptores de luz y producir una disminución en la tasa de fotosíntesis y productividad (Cerón et al., 2015).

Se divide en dos componentes: la irradiancia, la cual se refiere al flujo de luz por unidad de área a la cual están expuestas las microalgas, y el fotoperiodo, el cual es la cantidad de horas durante el día en la que las microalgas son sometidas a dicha irradiación. Cuando algunos cultivos de microalgas se exponen a un cierto nivel elevado de irradiación, los componentes celulares internos encargados de la absorción de energía lumínica, denominados antenas, sufren daño debido al exceso de energía; este nivel de irradiancia se conoce como el punto de saturación lumínica, y por encima de él la velocidad de fotosíntesis se puede ver reducida; este fenómeno se conoce como fotoinhibición. El punto de saturación lumínica para microalgas generalmente es característico de cada cepa, como es el caso de la microalga *Chlorella*, el cual puede variar entre 85 y 400 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$. En el caso del fotoperiodo, normalmente se utilizan ciclos de iluminación constantes que se expresan en horas de Luz/Oscuridad (LO) que van desde 12:12 (LO) hasta 18:6 (LO) pasando por valores intermedios como cuando se emplea irradiación artificial (14:10) (Serrano, 2012).

Temperatura: la producción algal aumenta proporcionalmente con la temperatura hasta alcanzar el valor óptimo para cada especie. Por encima de dicho valor, aumenta la respiración y la fotorrespiración reduce la productividad global. La temperatura óptima varía entre especies, pero en general está entre 28°C y 35°C (Hernández y Labbé, 2014).

Diversos autores señalan un intervalo de temperaturas óptimas de crecimiento de 15 a 26 °C para algunas especies con densidades de células máximas obtenidas a 23 °C, para la mayoría de las especies, aunque puede variar con la composición del medio de cultivo, la especie y la cepa cultivada. Un valor intermedio de 18 a 20 °C es el más empleado, las temperaturas menores que 16 °C disminuirán el crecimiento, mientras superiores que 35 °C son letales para un número de especies (Barsanti y Gualtieri, 2006; Rodríguez et al., 2014)

Serrano (2012) expone en el cultivo de microalgas, y en general el de cualquier microorganismo, 3 valores claves de temperatura: una temperatura mínima,

aproximadamente 16°C, por debajo de la cual no es posible el crecimiento; una temperatura óptima, entre 16 y 27°C dependiendo de la microalga, a la que se produce el crecimiento más rápido, y una temperatura máxima, alrededor de 35°C, por encima de la cual no es posible el crecimiento, dado que algunas proteínas pueden sufrir daños irreversibles. Asimismo, enfatiza en que los cultivos de microalgas que crecen por debajo de la temperatura óptima generalmente son más sensibles a la fotoinhibición, que aquellos que se mantienen en el valor ideal.

pH: el pH del medio afecta muchos procesos asociados con el crecimiento algal y el metabolismo, incluyendo la disponibilidad y asimilación de nutrientes en forma de iones, determina la solubilidad del dióxido de carbono y de los minerales en los cultivos. Asimismo, puede afectar la productividad de las microalgas, la respiración, alcalinidad y actividad de autótrofos y heterótrofos (Díaz y Ordoñez, 2006; Villa et al., 2014; Cerón et al., 2015;).

Según Barsanti y Gualtieri (2006) el rango de pH para la mayor parte de las especies de algas cultivadas está entre 7 y 9, con el rango óptimo entre 8,2 y 8,7. Además, expone que, en el caso de cultivos de alta densidad algal, la adición de CO₂ permite corregir el incremento del pH, el cual puede alcanzar valores límites de pH de 9 durante el crecimiento algal.

CO₂: es la fuente de carbono para los organismos autotróficos, como es el caso de las algas y las plantas; sin embargo, se estima que anualmente estas últimas tan sólo fijan el 10% de lo que fijan las microalgas. Un exceso de CO₂ en el medio de cultivo de las microalgas afecta negativamente su desempeño, pues ocasiona una disminución dramática del pH del medio de cultivo cuando éste no cuenta con capacidad tampón (Serrano, 2012).

Las necesidades de CO₂ pueden ser considerables, por lo que los costos asociados pueden ser también elevados para un cultivo comercial, de ahí la importancia de buscar una forma económica de mitigar dichos costos. Así, se han realizado variados estudios sobre las capacidades de diferentes microalgas para la fijación de CO₂, desde diversas fuentes gaseosas, considerándose altamente eficientes en este proceso (Ho et al., 2012). De esta manera, se ha sugerido la creación de cultivos comerciales para trabajar en conjunto con fuentes generadoras de CO₂, como cogeneradores (Hernández y Labbé, 2014).

Nutrientes: el nitrógeno es un nutriente importante para las microalgas y se incorpora como nitrato (NO₃⁻) o como amonio (NH₄⁺). Es también un factor crítico para regular el contenido de lípidos. Típicamente, las microalgas tienen un contenido lipídico aproximadamente del 20%, pero cuando el nitrógeno se convierte en el factor limitante del crecimiento, la acumulación de los niveles de lípidos aumenta en más de 40%. Sin embargo, usando la limitación de nitrógeno para estimular la acumulación de lípidos en las células, a menudo reduce la producción de microalgas, lo que sugiere que las dos condiciones, alto contenido en lípidos y alta productividad, pueden ser mutuamente excluyentes. El fósforo es fundamental en muchos procesos celulares, tales como la formación de ácidos nucleicos y transferencia de energía, aunque el contenido en fósforo de las microalgas es menor al 1%, su deficiencia en el medio de cultivo es una de las mayores limitantes para el crecimiento (Hernández y Labbé, 2014).

Oxígeno disuelto: la intensa fotosíntesis realizada durante el día en sistemas de cultivo puede aumentar los niveles de saturación de oxígeno disuelto por encima del 200%. Se cree que una elevada saturación podría afectar la productividad de algas. En una saturación del 200% existe una reducción del 17% en la productividad, mientras que a 300% se reduce

en un 25%. Todavía se requiere más investigación para demostrar el efecto de altos niveles de oxígeno (Hernández y Labbé, 2014).

Agitación: el objetivo principal de la aireación y la agitación es mantener las células en suspensión, lo cual permite que la incidencia de luz sea homogénea, ya sea en la superficie del recipiente, o en las paredes transparentes, disminuyendo el tiempo de ausencia de luz en el seno del cultivo cada vez más denso, y a la vez, evitar una excesiva exposición que pueda conducir a la fotoinhibición. Otros efectos de la agitación son el facilitar la difusión y homogeneización de nutrientes y eliminar gradientes térmicos, salinos o de densidad según el volumen del cultivo, sin embargo, una agitación excesiva ya sea por burbujeo o empleando agitadores, puede causar un estrés hidrodinámico llevando a una disminución en la tasa de crecimiento (Serrano, 2012).

3.2.3. Fases de crecimiento

La comprensión de las características cinéticas del crecimiento de microalgas y síntesis de lípidos son prerequisites para optimizar las condiciones de operación del cultivo de microalgas (Liao et al., 2018).

Las microalgas presentan una cinética de crecimiento en la que es posible distinguir al menos cinco fases (Córdova et al., 2018).

- **Fase de adaptación:** en la que el crecimiento se retrasa debido a la presencia de células no viables o se presentan ajustes fisiológicos para adaptarse a las nuevas condiciones del medio.
- **Fase exponencial:** donde las células crecen y se dividen siguiendo una función exponencial en el tiempo, sin limitaciones en términos de intensidad de luz y nutrientes.
- **Fase lineal:** en la cual la incidencia de la luz se vuelve limitada debido al aumento en la cantidad de microalgas, generando una disminución en la tasa de crecimiento.
- **Fase estacionaria:** donde se presenta limitación en la cantidad de nutrientes, por lo tanto, se detiene el crecimiento.
- **Fase de muerte o declinación:** donde la concentración de las células de microalgas decrece rápidamente debido al agotamiento de los nutrientes y variación en los valores de pH.

En cada una de las fases la composición fisicoquímica de las microalgas cambia, por ejemplo, en la fase estacionaria donde los nutrientes se encuentran agotados, productos como almidones y lípidos comienzan a acumularse en la estructura celular (Córdova et al., 2018). Según Tandon y Jin (2017) en cada una de las fases, las células microalgales sufren cambios en la estructura de la pared celular, composición, contenidos celulares y morfología. En la mayoría de los casos, el contenido celular de los cultivos de microalgas consiste principalmente de proteínas en la fase de crecimiento exponencial, mientras que, en la fase estacionaria, consisten principalmente en carbohidratos y glucógeno. En la Figura 3.3 se expone la curva de crecimiento típica en un cultivo de microalgas en un sistema tipo Batch.

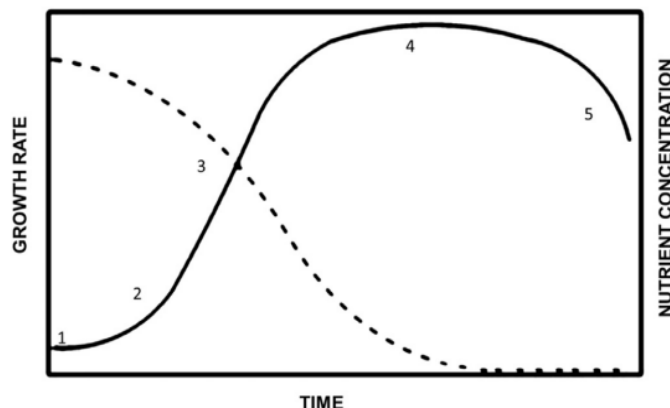


Figura 3.3. Curva de crecimiento de microalgas en cultivo Batch (Línea Solida) y concentración de nutrientes (Línea punteada). 1) Fase de adaptación. 2) Fase exponencial. 3) Fase lineal. 4) Fase estacionaria. 5) Fase de declinación.

Fuente: Tandon y Jin (2017)

3.2.4. *Chlorella*

Chlorella es un grupo de microalgas verdes eucariotas con alta capacidad de fotosíntesis. A través de una eficiente fotosíntesis, es capaz de reproducirse en poco tiempo, requiriendo luz solar, dióxido de carbono, agua y una pequeña cantidad de nutrientes. De fácil crecimiento, tiene un ciclo de vida simple y vías metabólicas similares a las que poseen plantas superiores, por lo que ha sido empleada como un organismo modelo para investigar los mecanismos de la fotosíntesis y la asimilación de dióxido de carbono (Ciclo de Calvin-Benson). Debido a su alto contenido en proteínas y riqueza en carotenoides, vitaminas y minerales, se ha propuesto como un suplemento alimenticio para los seres humanos. Con ese fin, actualmente se produce extensamente en Alemania, China, Japón y otros países asiáticos. Recientemente, debido a la crisis energética y al interés en los combustibles verdes renovables, *Chlorella* ha sido citada de manera prometedora para la producción de biocombustibles. El género comprende un gran número de especies que pueden crecer en agua dulce o de mar, y bajo diferentes regímenes nutricionales, en modo heterótrofo, fotoautótrofo y mixotrófico. Asimismo, especies que pertenecen al género *Chlorella* han demostrado potencial para crecer y remover altas concentraciones de nutrientes y compuestos orgánicos de diferentes tipos de agua residual (Liu y Chen, 2014, Ikarán et al., 2015, Ge et al., 2016, Moreno-García et al., 2017).

Las especies del género *Chlorella* tienen marcadas diferencias en cuanto al comportamiento ante factores como la salinidad, acidez y elevadas temperaturas, aunque de forma general, toleran amplios intervalos de salinidad y valores de pH. La mayoría de las especies del género crecen con gran facilidad, lo que favorece el desarrollo de sus cultivos; debido a esto frecuentemente se utilizan como modelo biológico en investigaciones fisiológicas y bioquímicas. Crece rápidamente a elevadas temperaturas y tolera hasta 37°C, en condiciones de cultivo a cielo abierto. *Chlorella Vulgaris* es una de las especies más abundantes y frecuentes en el tratamiento del agua residual y lagunas de oxidación (Gómez, 1997).

La clasificación científica de la *Chlorella Vulgaris* (*C. Vulgaris*) es Dominio: eucariota, Reino: Protista, División: Chlorophyta, Clase: Trebouxiophyceae, Orden: Chlorellales, Familia: Chlorellaceae, Género: Chlorella, especie: *Chlorella vulgaris*. Contiene clorofilas tipo a y b en los cloroplastos donde se reproduce de forma asexual, cuando la célula alcanza el

tamaño máximo el núcleo se divide en 4 u 8 células más pequeñas, liberadas por la ruptura de la pared celular de la madre. Al ser unicelulares, la energía se dirige a través de la fotosíntesis al crecimiento y la reproducción, ya que no es necesario formar y mantener tejidos u órganos muy complejos (Hernández y Rosas, 2011; Safi et al., 2014).

Las células se presentan aisladas, aunque eventualmente pueden formar agregados; tienen forma esférica y un tamaño que oscila entre 3,75 y 5 μm . Cada célula posee un pirenoide y un cloroplasto parietal único en forma de copa con abertura irregular, que ocupa gran parte del volumen celular. Se reproduce solamente por autósporas (Gómez, 1997).

Ge et al. (2018) enfatizan que *C. vulgaris* se caracteriza por un rápido crecimiento, consumo eficiente de compuestos orgánicos y nutrientes característicos del agua residual y predominancia en la mayoría de tipos de agua residual del mundo. Rodas-Gaitán et al. (2012), exponen que el cultivo de *C. vulgaris* presenta uso potencial en producción de biodiesel, descontaminación de agua residual y gases de chimenea y en nutrición humana y animal, por lo cual se encuentra en el punto central de diversas investigaciones. Wang et al. (2017), expone que además de su rápida tasa de crecimiento *C. vulgaris* es altamente tolerante a sustancias orgánicas solubles y puede sobrevivir en ambientes extremadamente hostiles.

3.3. Uso de microalgas para el tratamiento de agua residual

La utilización de cultivos de microalgas en el tratamiento del agua residual data alrededor de 75 años. El tratamiento biológico del agua residual por fitorremediación es particularmente atractivo debido a las capacidades fotosintéticas de las microalgas, así como la capacidad de conversión de la energía solar en biomasa e incorporar nutrientes como el nitrógeno y el fósforo (Abdel-Raouf et al., 2012).

Un requisito importante en el tratamiento del agua residual es la remoción de nutrientes y metales tóxicos hasta límites aceptables, antes de un vertimiento o reutilización. Sin embargo, la mayoría de tecnologías convencionales de tratamiento del agua residual están basados en métodos físicos y químicos que no son económicos, especialmente en el tratamiento de agua residual agroindustrial. Las microalgas han demostrado eficiencia en la eliminación de nitrógeno, fósforo y metales tóxicos de una amplia variedad de agua residual. Existen estudios sobre el crecimiento de algas en agua residual municipal, agroindustrial e industrial, obteniendo reducción sustancial de nutrientes y producción de biomasa (Cai et al., 2013).

Bhatnagar et al. (2011) estudiaron el crecimiento de *Chlamydomonas globosa*, *Chlorella minutissima* y *Scenedesmus bijuga* en agua residual proveniente de una industria de alfombras, agua residual tratada de la misma industria y agua residual proveniente de gallinaza. El agua residual de gallinaza tenía la peculiaridad de que reducía en un 92% la luz incidente, sin embargo, las microalgas se adaptaron a dichas condiciones al presentar comportamiento mixotrófico. *C. globosa* presentó mayor crecimiento de biomasa en el agua residual de gallinaza (217 mgL^{-1}) seguido del agua residual tratada (165 mgL^{-1}) y en menor medida para el agua residual de la industria de alfombras sin tratar ($12,8 \text{ mgL}^{-1}$), mientras que *S. bijuga* y *C. minutissima* presentaron mayor crecimiento en el agua residual de la industria de alfombras sin tratar (445 y 320 mgL^{-1} respectivamente), lo que podría indicar la existencia de un elemento tóxico en el agua residual que inhibe el crecimiento de la especie o ausencia de compuestos orgánicos esenciales para el crecimiento de la especie, pues al suplementar dicha agua con fuentes externas de nitrógeno y glucosa se presentó crecimiento. De esta manera, se puede concluir que la adaptabilidad de las microalgas

depende del tipo de agua residual, especie de la microalga, disponibilidad de compuestos esenciales y tipo de crecimiento. Asimismo, es importante destacar la adaptabilidad de las microalgas del género *Chlorella* al agua residual industrial y agroindustrial.

Wang et al. (2009) evaluaron la capacidad de *Chlorella sp.* para reducir DQO, nitrógeno y fósforo del agua residual proveniente de cuatro puntos diferentes de un proceso de tratamiento convencional de agua residual municipal. Los puntos fueron: antes del tanque de sedimentación primaria, después del tanque sedimentación primaria, sedimentador secundario y agua residual concentrada de lodo centrifugado. Las microalgas presentaron mayor crecimiento y acción depurativa en el agua residual proveniente de lodo centrifugado. Los porcentajes de reducción de ($\text{PO}_4\text{-P}$), nitrógeno (total) y DQO fueron de 82,8, 85,6 y 83 % respectivamente. Según los autores, el comportamiento de las microalgas en este tipo de agua residual se asocia con la mayor concentración de nutrientes y DQO.

Lim et al. (2010) usaron cultivos de microalgas para el tratamiento de agua residual de la industria textil, específicamente en la remoción de color, fósforo y nitrógeno. Los resultados indicaron que, de las 10 especies de microalgas estudiadas, solo tres pudieron crecer en el agua residual, una de ellas fue *C. vulgaris*. Se realizaron cuatro cultivos (I,II,III,IV), en dos lagunas de alta tasa, de los cuales el número IV consistía en dos condiciones experimentales: agua residual de industria textil e inóculo(Iva) y agua residual de industria textil suplementado con Medio Basal Bold (BBM) e inóculo (Ivb). El pH fue ajustado a 7. Los porcentajes de reducción de DQO, nitrógeno (N-NH_4) y fósforo (P-PO_4) para Iva fueron de 62,27, 45,13 y 33,25 % respectivamente. Mientras que para el caso de Ivb se obtuvieron porcentajes de reducción de 38,4, 44,36 y 33,14%. La diferencia en la reducción de DQO según los autores, puede atribuirse a que en el caso Ivb existe una mayor presencia de biomasa, por consiguiente, se produce una liberación de ácidos orgánicos en la fase estacionaria que inhiben el proceso de depuración. Por su parte, la reducción de nitrógeno y fósforo fue similar para ambos casos, concluyendo que la presencia del medio de cultivo BBM no es influyente en el tratamiento. Por otro lado, los autores concluyeron que el cultivo de *Chlorella vulgaris* en lagunas de alta tasa es un sistema de bioremediación adecuado pues puede remover color por encima del 50% a la vez que, reduce DQO y nutrientes.

Otros estudios se han realizado aplicando lagunas de alta tasa para el tratamiento de agua residual agroindustrial, por ejemplo, en el estudio de Phang et al. (2001) se realiza el tratamiento de agua residual proveniente de una industria de caucho, por medio de la microalga *C. Vulgaris* obteniendo productividades de 25 a 61 $\text{gm}^{-2}\text{d}^{-1}$. Los porcentajes de reducción de DQO, N-NH_4 y PO_4 obtenidos presentaron los siguientes rangos: 78 a 96%, 41 a 95% y 41 a 94% respectivamente. De godos et al. (2009) estudiaron el tratamiento de agua residual de origen porcino, por medio de un consorcio de microalgas en lagunas de alta tasa, obteniendo productividades en un rango entre 21 y 28 $\text{gm}^{-2}\text{d}^{-1}$. Con porcentajes de reducción de DQO y nitrógeno total Kjeldahl igual a 76% y 88% respectivamente.

Castro y Parra (2011) estudiaron el crecimiento de *Chlorella Vulgaris* en vinazas con diferente grado de concentración (100%, 50% y 10%) y con un volumen constante de inóculo. El estudio presentó el mayor crecimiento de biomasa para el caso donde la concentración de vinaza fue mayor, es decir que al aumentar la carga orgánica con una concentración de inóculo fija, aumenta el crecimiento. En términos de la relación S/X la relación óptima para obtener mayor productividad es la que presentó mayor valor. Esto puede estar asociado a que al incrementar la carga orgánica se presenta mayor disponibilidad de nutrientes y fuentes de carbono. Asimismo, los autores enfatizan en que al ser un alga mixotrófica, desarrolló un comportamiento heterótrofo en la oscuridad que

presentó la vinaza con una concentración del 100%, lo que le permitió asimilar los nutrientes necesarios para desarrollar sus procesos metabólicos.

Liu et al. (2013a) estudiaron el crecimiento de la microalga *C. Vulgaris* de manera fotoheterótrofa y mixotrófica en un efluente de fermentación oscura. Para el primer caso se estudió el efecto de la luz y la relación S/X en la producción de biomasa y consumo de metabolitos solubles (butirato y acetato). Los resultados demostraron que al aumentar la relación S/X se producía una reducción en la producción de biomasa y consumo de butirato. Los valores máximos de producción de biomasa y consumo de butirato ocurrieron con una relación S/X igual a 1,5, con valores de 0,22 gLd⁻¹ y 0,2 gLd⁻¹ respectivamente. Lo que sugiere que el incremento en la concentración inicial del inóculo favorece el crecimiento de biomasa y la reducción de DQO asociada a dichos metabolitos. Asimismo, se estudió el efecto de la intensidad de luz, obteniendo una intensidad de luz optima igual a 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, por encima de dicho valor se presentó fotoinhibición, ocasionando una reducción en el crecimiento y consumo de metabolitos. En el metabolismo mixotrófico, se obtuvo mayor productividad, aproximadamente 0,27 gLd⁻¹ y 0,22 gLd⁻¹ para diferentes tasas de alimentación de sustrato. Sin embargo, se presentó reducción en la tasa de consumo de butirato, lo que indica que la adición de CO₂ incrementa la competencia por la asimilación de compuestos orgánicos e inorgánicos. En los dos casos, el pH se ajustó a 7,5.

Liu et al. (2013b), para el mismo tipo de efluente y microalga, el crecimiento en modo fotoheterótrofo presentó el mismo comportamiento, es decir, la producción de biomasa decreció cuando se produjo un aumento en la relación S/X, lo que indica que dicho parámetro influye en el crecimiento y el consumo de DQO en condiciones fotoheterótrofas. Asimismo, se evaluó el efecto del pH en el crecimiento de biomasa y consumo de metabolitos, se realizó control de pH durante el montaje y ajuste al comienzo del montaje experimental. En el primer caso se determinó que el valor óptimo de pH en términos de crecimiento de biomasa y consumo de metabolitos fue de 7,5. En el segundo caso se evaluó el crecimiento ajustando el pH inicial a 7,5, dando como resultado el incremento del pH a lo largo del periodo de cultivo, en donde se pudo observar que a valores altos de pH se produce una disminución de crecimiento de biomasa y consumo de metabolitos.

Sacristan et al. (2014) estudiaron el cultivo de dos especies de microalgas (*Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*) y una cianobacteria (*Arthrospira máxima*) para la reducción de nutrientes, crecimiento de biomasa y reducción de DQO en tres medios de cultivo: agua residual cruda después de un tratamiento de cribado y sedimentación (ARC), agua residual tratada en un sistema de lodos activados convencional (ART), y agua enriquecida (AE) con nutrientes (fertilizante, NPK 20-20-20). El cultivo de *C. vulgaris* obtuvo los mejores resultados respecto a los otros microorganismos estudiados. La mayor productividad de biomasa (69,8 mg L⁻¹d⁻¹) la obtuvo en ARC, la tasa de crecimiento fue de 0,20 a 0,27. La mayor reducción de fósforo se alcanzó en ARC (aproximadamente del 78 %). Lo mismo ocurrió con la degradación de los nitratos, nitrógeno orgánico y amoniacal. Es importante destacar del estudio que en AE se produjo la menor reducción de nutrientes, debido a que el cultivo de microalgas se interrumpió en la fase logarítmica, lo que sugiere que se debería garantizar la fase estacionaria para alcanzar porcentajes de reducción más elevados. En cuanto a la DQO se presentaron los siguientes porcentajes reducción: del 65% en ARC, 52 % en ART y 55% en AE, lo que indica la adaptabilidad de *Chlorella vulgaris* a diferentes sustratos.

Gong et al. (2014) estudiaron el efecto del pH y la luz en el crecimiento de biomasa, evaluando el caso en el cual se controlaban los valores de pH y cuando no se realizaba

control y se ajustaba al inicio del proceso. Los resultados permitieron concluir que, a una intensidad de 7.920 lux con control de pH a un valor de 10, se produjo el mayor crecimiento de biomasa, con valores aproximados de $16,5 \times 10^6$ cell mL⁻¹. Los valores de pH recomendados para el cultivo de *Chorella Vulgaris* se encuentran en un rango de 10 a 10,5 y la intensidad de luz no afecta el valor óptimo de pH. El control de pH ajustado al valor óptimo permitió un mayor crecimiento de biomasa.

Sakarika y Kornaros (2016) evaluaron el crecimiento de *Chorella vulgaris* para diferentes valores de pH controlados durante el tiempo de cultivo. El crecimiento se llevó a cabo en medio BG-11 suplementado con glucosa. Los resultados permitieron concluir que bajo condiciones heterótrofas las microalgas no pudieron crecer a un valor de pH de 9,5 para un tiempo de cultivo de 15 días, observando la floculación de las células. Por otro lado, los valores de pH iguales a 3, 4 y 11 fueron extremos para este tipo de microalga, observando lisis celular al segundo día de cultivo. Los valores óptimos de pH fueron de 7,5 y 8, ya que se produjeron las mayores tasas específicas de crecimiento de 0,423 y 0,63 d⁻¹ respectivamente y productividad de 0,271 y 0,298 gL⁻¹d⁻¹ siendo mayor para un valor de pH igual a 7,5.

En el estudio de Tan et al. (2016), se evaluó el efecto del pH en el crecimiento de *C. pyrenoidosa* en un efluente de lodos activados digerido anaeróbiamente. Se evaluaron diferentes rangos de pH los cuales se controlaron en el periodo de cultivo, en el estudio se concluye que el rango óptimo para el crecimiento de biomasa se encuentra entre 5,7 y 7,3. En términos de reducción de nitrógeno amoniacal los porcentajes más altos se obtuvieron en un rango de pH entre 5,7 y 7,3 y para fósforo en un rango entre 7,6 y 8,1 unidades.

Rodríguez et al. (2015) expone que *C. Vulgaris* puede crecer a valores de pH iguales a 6,7 y 8, obteniendo la mayor densidad celular a un valor de 6. En el estudio de Sakarika y Kornaros (2016) *C. vulgaris* creció en la mayoría de valores de pH evaluados, los cuales fueron, 5, 6, 6,5, 7, 7,5 y 8. Se presentó mayor productividad de biomasa a un valor de 7,5. En un estudio similar realizado por Wang et al. (2010) se expone que en términos de crecimiento de biomasa el mejor comportamiento para este tipo de microalga se presentó en valores de pH iguales a 6,5 y 7.

Liu et al. (2013b) y Turon et al. (2016) exponen que a un valor fijo de inóculo, el incremento de la relación S/X (es decir al incrementar concentración de sustrato) la tasa específica de crecimiento y la asimilación de metabolitos disminuye, lo que implica menores porcentajes de reducción de DQO. Sin embargo, Turon et al. (2016) exponen que se pueden seleccionar relaciones S/X mayores dependiendo del tipo de sustrato.

En el estudio de Ren et al. (2014), se evaluó el crecimiento de *Scenedesmus sp.* en un efluente de fermentación oscura, utilizando una relación S/X aproximada de 88,32, obteniendo una concentración final de biomasa igual a 1,98 gL⁻¹. Del día 4 al 6 se alcanzó la fase estacionaria. Lo que sugiere que se pueden seleccionar relaciones altas sin presentar inhibición en el crecimiento.

Hongyang et al. (2011), estudiaron el crecimiento de *C. pyrenoidosa* en agua residual del procesamiento de soya. Se emplearon dos relaciones S/X en cultivos Batch. El inóculo se mantuvo fijo en un valor aproximado de 0,25 gL⁻¹, la DQO del efluente vario obteniendo relaciones aproximadas de 15 y 12. El estudio permitió concluir que a menor relación S/X se producen mayores porcentajes de reducción de DQO (80 y 84% respectivamente) y

productividad de biomasa ($0,64 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ y $0,76 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ respectivamente), resultado que es acorde con el comportamiento reportado por Liu et al. (2013b) y Turon et al. (2016).

En la literatura se encuentran diferentes rangos de inóculo utilizado en las relaciones S/X, Turon et al. (2015) trabajaron con una concentración inóculo de aproximadamente $0,05 \text{ gL}^{-1}$ para evaluar el crecimiento de *C. sorokiniana* en un efluente de fermentación oscura. Sacristan et al. (2014) trabajaron con un valor de inóculo igual $0,05 \text{ gL}^{-1}$. Con lo cual se obtuvo mejor productividad en comparación con el cultivo realizado en agua residual tratada en un sistema de lodos activados convencional (ART), indicando que un valor menor de biomasa al inicio del proceso no limita el crecimiento de biomasa.

4. METODOLOGÍA

El trabajo experimental se realizó en la ciudad de Santiago de Cali, en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental, el cual se encuentra adscrito al área de Ingeniería Sanitaria y Ambiental de la Universidad del Valle. En este trabajo se realizaron ensayos experimentales que consistieron en evaluar el efecto de la relación S/X y el pH en la reducción de DQO, nitrógeno amoniacal total, ortofosfatos y crecimiento de biomasa.

4.1. Agua residual

El sustrato que se utilizó en este estudio es agua residual generada en el proceso de extracción de almidón de yuca, sintetizada en el laboratorio con características semejantes al agua residual proveniente de las rallanderías ubicadas en el norte del departamento del Cauca. La preparación del agua se llevó a cabo siguiendo la metodología aplicada en los trabajos de Yela y Peña (2015) y Barrios (2015). Los procedimientos se exponen a continuación:

- **Lavado y pelado:** las raíces de yuca se dejan en remojo en agua entre 10 y 30 minutos para favorecer el lavado y pelado. Transcurrido este periodo, se lavan manualmente las raíces de yuca con el fin de retirar los residuos (barro y cascarilla) adheridos a su corteza. Después con ayuda de un cuchillo se retira la capa exterior secundaria (cascarilla café o marrón), nuevamente, se lava con agua para eliminar los residuos de tierra adheridos durante el pelado.
- **Rallado:** la yuca se rayó mediante un rallador de cocina. El material resultante se mezcló con agua potable en un recipiente (Tanque 1), al cual se le garantizó una mezcla completa para permitir la liberación de los gránulos de almidón de yuca.
- **Tamizado:** una vez que se homogenizó la mezcla, se pasó a través de un tamiz o colador con la finalidad de separar el afrecho (impurezas finas que no constituyen almidón) de la lechada. En este punto, se mantuvo agitada la mezcla del Tanque 1, ya que las partículas de sólidos tendían a sedimentar rápidamente.
- **Sedimentación del almidón:** cuando se tuvo la mezcla del paso anterior completamente colada, se vertió en un recipiente para llevar a cabo la sedimentación del almidón y la mancha (almidón mezclado con material proteico en suspensión) durante 17 horas. Según Aristizábal y Sánchez (2007) después del periodo de sedimentación generalmente, se presentan tres capas: la capa inferior es el almidón, la intermedia se denomina mancha y la capa superior es agua con trazas de fibra y mancha en suspensión. La capa superior se recolectó con ayuda de mangueras y efectuando un sifón.

En la Tabla 4.1 se muestra la caracterización fisicoquímica del agua residual preparada en el laboratorio.

Tabla 4.1. Características fisicoquímicas del agua residual agroindustrial

Parámetros	Valor	Unidades	Método
DQO	16.538,89 ± 2.268,95	mgL ⁻¹	APHA (2005)
SST	533,33 ± 15,28	mgL ⁻¹	APHA (2005)
pH	4,29 ± 0,014	Unidades	APHA (2005)
Temperatura	26,20 ± 0,28	°C	
Ortofosfatos	50,12 ± 0,29	mg PO ₄ ⁻³ L ⁻¹	APHA (2005)
Nitrógeno Amoniacal Total (NAT)	8,08 ± 0,19	mg N-NH ₃ L ⁻¹	APHA (2005)
Carbohidratos	1166,32 ± 183,60	mgL ⁻¹	Dubois et al. (1956)

4.2. Microalga y condiciones de cultivo

La cepa de microalgas utilizada fue *Chlorella sp.* obtenida del laboratorio de Biocombustibles de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad del Valle. La identificación taxonómica de la especie fue realizada en el trabajo de maestría: “Crecimiento de microalgas a partir del efluente del tratamiento anaerobio del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca (Bautista, 2020).

La cepa se mantuvo en Medio Basal Bold (BBM), con las siguientes condiciones: temperatura ambiente, como fuente de iluminación artificial se utilizaron lámparas Led – Blanca Fría de la marca Dairu GAB (13 W – 910 lm) con un valor de iluminancia de 25,96 ± 1,24 Lux, fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad (12:12 LO) controlado por medio de un temporizador, aireación promedio de 1,64 ± 0,27 Lmin⁻¹ por medio de una bomba de pecera de la marca AC-1500 Resun.

El cultivo se mantuvo en un reactor (frasco de vidrio) de 5.000 mL, ocupando un volumen útil de 1.500 mL. El 10% del volumen estuvo compuesto por inóculo y el 90% por el medio de cultivo. El cultivo se mantuvo por una semana y se alimentó cada tres días con medio Basal Bold. La composición del medio de cultivo se expone en la Tabla 4.2.

4.3. Aclimatación de la Microalga

Se realizó un proceso de aclimatación de la microalga con la finalidad de garantizar su crecimiento una vez se realizará el montaje experimental, dado que la concentración del agua residual agroindustrial en términos de DQO se considera alta (Tabla 4.1) y se podía presentar inhibición en los procesos metabólicos, como lo sugieren los estudios de Khalid et al. (2016) y Khalid et al. (2018) los cuales exponen que la aclimatación de las microalgas mejora el crecimiento de biomasa, reduce la fase de adaptación, incrementa el consumo de nutrientes y DQO y reduce el tiempo requerido para efectuar el tratamiento. En el estudio de Ruiz-Marín et al. (2010) la aclimatación tuvo una duración de un mes, al cabo de dicho periodo se procedió a realizar los montajes experimentales planificados con el inóculo obtenido.

Tabla 4.2. Composición del Medio Basal Bold

Stock	Por 400 mL
1) NaNO ₃	10,0 g
2) MgSO ₄ ·7H ₂ O	3,0 g
3) NaCl	1,0 g
4) K ₂ HPO ₄	3,0 g
5) KH ₂ PO ₄	7,0 g
6) CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,0 g
Por Litro	
7) Elementos Traza	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,82 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,44 g
MoO ₃	0,71 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,57 g
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,49 g
8) H ₃ BO ₃	11,42 g
9) EDTA	50,0 g
KOH	31,0 g
10) FeSO ₄ ·7H ₂ O	4,98 g
H ₂ SO ₄ (Concentrado)	1,0 mL

Fuente: Andersen et al. (2005)

En el presente estudio el tiempo de aclimatación fue de 20 días, el proceso consistió en el incremento gradual de la concentración de DQO hasta alcanzar un 30% de la DQO total del agua residual agroindustrial preparada en el laboratorio.

El agua residual preparada en el laboratorio presentaba valores de DQO superiores a los rangos consultados en la literatura para agua residual de almidón de yuca de agroindustrias colombianas (Tabla 3.1), por ese motivo se ajustó al 30% de su DQO total utilizando agua destilada.

El proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente, fuente de iluminación artificial por medio de lámparas Led – Blanca Fría con un valor de iluminancia de $25,96 \pm 1,24$ Lux, fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad (12:12 LO) controlado por medio de un temporizador, aireación promedio de $1,64 \pm 0,27$ Lmin⁻¹ por medio de la bomba AC-1500 Resun.

Se utilizó un recipiente de 5 L con un volumen útil de 3 L, en donde se llevó a cabo el cultivo de las microalgas a diferentes concentraciones de agua residual agroindustrial. Utilizando el mismo procedimiento reportado por Barrios (2015) el 60% (1,8 L) del recipiente se llenó con el inóculo y el 40% (1,2 L) restante por el sustrato que consistió en la mezcla de agua residual y agua destilada. De esta manera, los porcentajes de agua residual y agua destilada se estipularon según lo establecido en la Tabla 4.3

Tabla 4.3. Definición de periodo de aclimatación y mezcla

Periodo (Días)	Sustrato(40%)	
	Agua residual agroindustrial (%)	Agua destilada (%)
1-6	10	90
7-13	20	80
14-20	30	70

4.4. Montaje experimental y evaluación

Para el montaje experimental se emplearon reactores en flujo discontinuo (Tipo Batch). Con un volumen máximo de 1 L y volumen de trabajo de 800 mL, el cual estuvo compuesto de 720 mL de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca y 80 mL de inóculo. El inóculo ocupó el 10% del volumen de trabajo, esto de acuerdo con lo recomendado en la literatura (Lim et al., 2010; Ardila, 2012, Sacristan et al., 2014).

La duración del proceso experimental fue de 13 días, durante dicho periodo las condiciones de cultivo fueron las siguientes: temperatura ambiente, fuente de iluminación artificial por medio de lámparas Led – Blanca Fría con un valor de iluminancia de $25,96 \pm 1,24$ Lux, fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad (12:12 LO) controlado por medio de un temporizador, aireación promedio de $1,0 \text{ Lmin}^{-1}$ por medio de bombas de pecera AC-9906 Resun. En la Figura 4.1 se muestran los reactores utilizados en el proceso experimental.

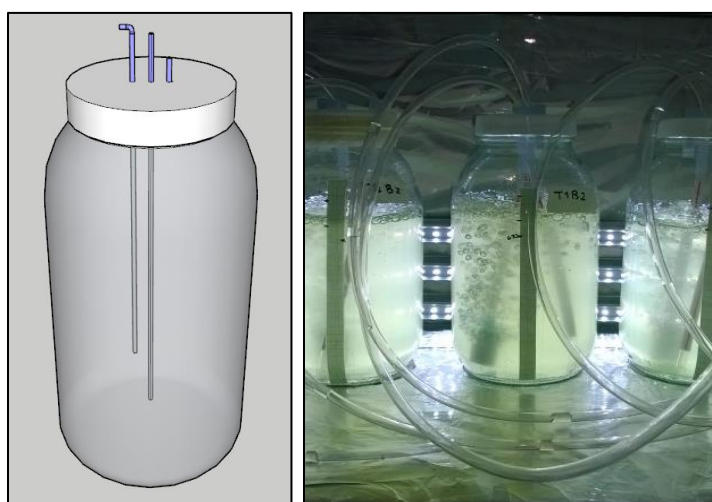


Figura 4.1. Reactores utilizados en el montaje experimental

Se evaluaron 3 relaciones S/X (100, 50 y 30) adimensionales y dos valores de pH (6,5 y 7,5), en la Tabla 4.4 se muestra el diseño experimental seleccionado. Cada tratamiento se realizó por triplicado dando como resultado el montaje de 18 reactores.

Tabla 4.4. Diseño experimental

Relación S/X	pH	
	A(6,5)	B (7,5)
T ₁ (100)	T ₁ A ₁ , T ₁ A ₂ , T ₁ A ₃	T ₁ B ₁ , T ₁ B ₂ , T ₁ B ₃
T ₂ (50)	T ₂ A ₁ , T ₂ A ₂ , T ₂ A ₃	T ₂ B ₁ , T ₂ B ₂ , T ₂ B ₃
T ₃ (30)	T ₃ A ₁ , T ₃ A ₂ , T ₃ A ₃	T ₃ B ₁ , T ₃ B ₂ , T ₃ B ₃

Para realizar el montaje experimental se procedió en primera instancia a calcular las diluciones respectivas por medio de la Ecuación 2, de esta manera se determinó el volumen requerido de agua residual agroindustrial y la cantidad de inóculo para la obtención de las relaciones S/X a evaluar. Los cálculos respectivos se encuentran descritos en el Anexo 1.

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Ecuación 2

Donde:

C_1 = Concentración inicial (mgL^{-1})

C_2 = Concentración final (mgL^{-1})

V_1 = Volumen inicial (mL)

V_2 = Volumen final (mL)

A continuación, se explica el procedimiento realizado y en la Figura 4.2 se resume la preparación del montaje experimental.

- 1) Se realizó la dilución respectiva por medio de la Ecuación 2 con la finalidad de obtener sustrato con una DQO aproximadamente igual a 30% de la DQO total del agua residual preparada en el laboratorio, ya que dicho valor se encuentra en el rango de DQO que presenta el agua residual generada en las industrias colombianas. Al sustrato obtenido se le midieron variables como pH, nitrógeno amoniacal total, Ortofosfatos y DQO. En la Tabla 4.5 se exponen las características del sustrato utilizado para realizar la preparación de las relaciones S/X evaluadas en el montaje experimental.
- 2) En diferentes recipientes se realizaron las diluciones respectivas para obtener los valores de DQO para cada relación a evaluar. El volumen para preparar se tuvo en cuenta de acuerdo con el número de rectores correspondientes a cada relación S/X, considerando 100 mL adicionales como margen de seguridad.
- 3) En diferentes recipientes se llevó a cabo la mezcla de sustrato e inóculo de acuerdo con cada relación S/X, en este paso se ajustó el pH de la mezcla en cada recipiente a un valor de 6 unidades, esto con la finalidad de evitar el uso excesivo de soluciones al momento de ajustar los valores de pH en los 18 reactores. Las soluciones utilizadas fueron Hidróxido de sodio (NaOH) 1M y ácido clorhídrico (HCl) 1M.
- 4) Finalmente, se repartió la mezcla en cada uno de los 18 reactores (800mL) y se procedió a realizar el ajuste inicial de pH de acuerdo con los valores a evaluar en el procedimiento experimental.

Durante el montaje, la toma de muestra se realizó cada dos días hasta el día 10, después solo se volvió a tomar muestra al final del periodo de cultivo, es decir en el día 13 de montaje. Los análisis realizados de DQO, Ortofosfatos, Nitrógeno amoniacal total (NAT), Biomasa y pH, se evaluaron en diferentes días, tal como se muestra en la Tabla 4.6. Esto se determinó con base en ensayos preliminares y según lo consultado en la literatura.

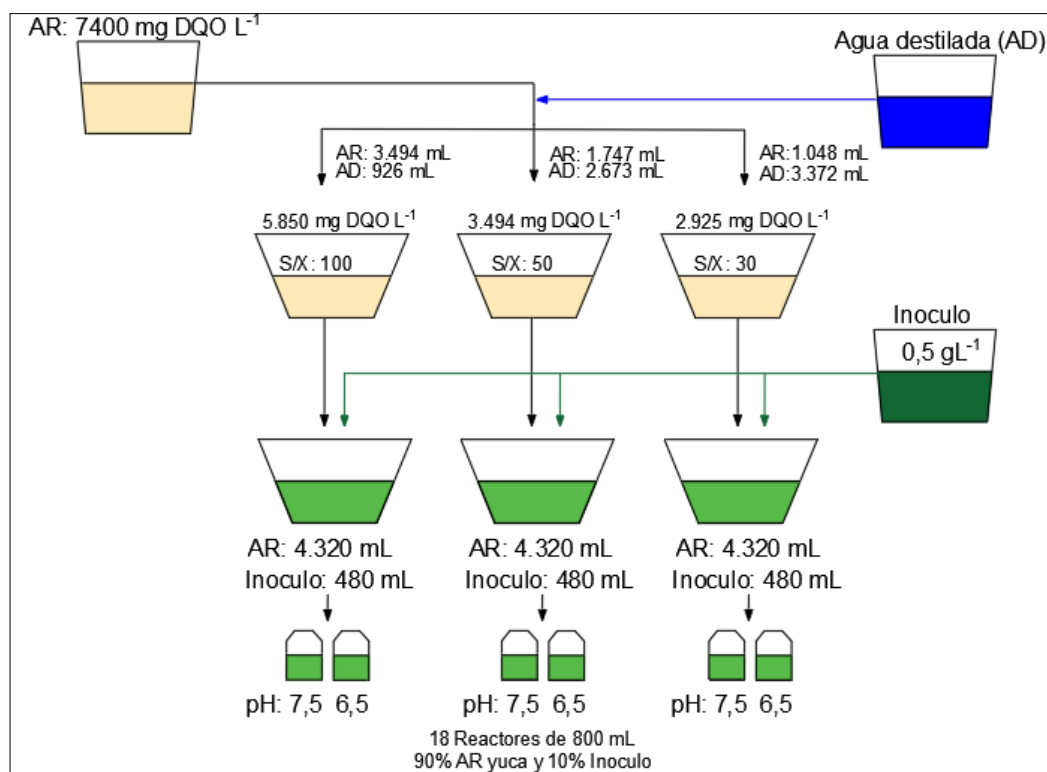


Figura 4.2. Procedimiento del montaje experimental

Tabla 4.5. Características del agua residual utilizada en el montaje experimental

Parámetros	Valor	Unidades	Método
DQO	7.400 ± 1.649,92	mgL ⁻¹	APHA (2005)
pH	4,24	Unidades	APHA (2005)
Ortofosfatos	25,82 ± 1,19	mg PO ₄ ⁻³ L ⁻¹	APHA (2005)
Nitrógeno Amoniacal Total (NAT)	6,46 ± 0,15	mg N-NH ₃ L ⁻¹	APHA (2005)

Tabla 4.6. Parámetros y días en que fueron evaluados durante el tiempo de montaje

Prueba	Días evaluados (d)*
DQO	0,2,4,6,13
Nitrógeno Amoniacal total (NAT)	0,2,4,6,8,10,13
Ortofosfatos	0,4,6,8,10,13
Biomasa	0,2,4,6,8,10,13
pH	0,2,4,6,8,10,13

* Indica el día del montaje, se tiene en cuenta que el montaje duro 13 días, son los días en los que se realizó medición del parámetro.

4.5. Métodos analíticos

Para la caracterización fisicoquímica del agua residual preparada en el laboratorio, se realizó la medición de parámetros como DQO, Ortofosfatos, Nitrógeno amoniacal total y pH durante el ensayo experimental, proceso de aclimatación y preparación del montaje experimental, se utilizaron los métodos expuestos en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7. Métodos empleados para caracterización de agua residual, medición de parámetros durante aclimatación, montaje y ensayo experimental

Parámetros	Técnica de medición	Referencia
DQO	5220-C. Colorimétrico de reflujo cerrado - Alto Rango	APHA (2005)
SST	2540-D. SST secados a 102-105 °C	APHA (2005)
pH	4500 H+ B. Potenciómetro	APHA (2005)
Temperatura	2250-B. Termómetro	APHA (2005)
Ortofosfatos	4500-P. Colorimétrico Cloruro estañoso	APHA (2005)
Nitrógeno Amoniacal Total- NAT	4500-NH ₃ F Método del Fenato	APHA (2005)
Carbohidratos	Fenol-Sulfúrico	Dubois et al. (1956)

Para la determinación de la biomasa se utilizó el método del peso seco, el procedimiento es gravimétrico y se llevó a cabo según lo recomendado en la literatura (Ren et al., 2014, Turon et al., 2015, Khalid et al., 2018). Se utilizaron filtros en fibra de vidrio Whatman GC-50, de 47 mm.

En la Ecuación 3 se muestra el procedimiento de cálculo para determinar la concentración de Biomasa por medio del método de peso seco.

$$B = \left(\frac{P_2 - P_1}{V} \right) \times 1000 \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

B = Concentración de biomasa (gL⁻¹)

P_2 = Peso del filtro + biomasa después de secado en horno a 105°C (g)

P_1 = Peso inicial de filtro sin biomasa secado en horno a 105°C (g)

V = Volumen de muestra filtrada (mL)

4.6. Manejo de datos

Para determinar el mejor tratamiento en términos de reducción de DQO, Nitrógeno amoniacal total, Ortofosfatos, y crecimiento de Biomasa, se utilizaron las siguientes variables:

- 1) Porcentaje de reducción de DQO, Nitrógeno amoniacal total, Ortofosfatos (%DQO, % $N - NH_3$, % PO_4^{-3}). Este parámetro se determinó por medio de las Ecuaciones 4, 5 y 6.
- 2) Tasa de consumo de DQO, Nitrógeno amoniacal total, Ortofosfatos ($rDQO$, $rN - NH_3$, rPO_4^{-3}). Este parámetro se determinará a partir de las Ecuaciones 7,8 y 9.
- 3) Consumo de DQO, Nitrógeno amoniacal total, Ortofosfatos (ΔDQO , $\Delta N - NH_3$, ΔPO_4^{-3}). Este parámetro se determinó a partir de las Ecuaciones 10,11 y 12.
- 4) Productividad máxima de biomasa (P_{max}) la cual se determinó a partir de la diferencia entre la concentración de biomasa inicial y al comienzo de la fase estacionaria, teniendo en cuenta el tiempo requerido para alcanzar dicha fase. Este parámetro se determinó a partir de la Ecuación 13.
- 5) Biomasa máxima (B_{Max}), cuyo valor corresponde al valor de concentración máxima durante el periodo de cultivo, el cual en todos los casos se alcanzó al final del tiempo de cultivo, es decir en el día 13 de montaje.

4.6.1. Porcentaje de reducción de DQO, Nitrógeno amoniacal total, Ortofosfatos

$$\%DQO = \left(\frac{DQO_i - DQO_f}{DQO_i} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

%DQO = Porcentaje de reducción de DQO (%)

DQO_i = Concentración de DQO inicial (mgL^{-1})

DQO_f = Concentración de DQO final (mgL^{-1})

$$\% N - NH_3 = \left(\frac{[N - NH_3]_i - [N - NH_3]_f}{[N - NH_3]_i} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde:

% $N - NH_3$ = Porcentaje de reducción de $N - NH_3$ (%)

$[N - NH_3]_i$ = Concentración de $N - NH_3$ inicial (mgL^{-1})

$[N - NH_3]_f$ = Concentración de $N - NH_3$ final (mgL^{-1})

$$\% PO_4^{-3} = \left(\frac{[PO_4^{-3}]_i - [PO_4^{-3}]_f}{[PO_4^{-3}]_i} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde:

% PO_4^{-3} = Porcentaje de reducción de PO_4^{-3} (%)

$[PO_4^{-3}]_i$ = Concentración de PO_4^{-3} inicial (mgL^{-1})

$[PO_4^{-3}]_f$ = Concentración de PO_4^{-3} final (mgL^{-1})

4.6.2. Tasa de consumo de DQO, Nitrógeno amoniacal total, Ortofosfatos

$$rDQO = \frac{DQO_i - DQO_f}{t_f - t_i} \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde:

$rDQO$ = Tasa de consumo de DQO ($mgL^{-1}d^{-1}$)

DQO_i = Concentración de DQO inicial (mgL^{-1})

DQO_f = Concentración de DQO final (mgL^{-1})

t_f = Tiempo en el cual finalizo el montaje (d)

t_i = Tiempo de inicio del montaje experimental (d)

$$rN - NH_3 = \frac{[N - NH_3]_i - [N - NH_3]_f}{t_f - t_i} \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde:

$rN - NH_3$ = Tasa de consumo de $N - NH_3$ ($mgL^{-1}d^{-1}$)

$[N - NH_3]_i$ = Concentración de $N - NH_3$ inicial (mgL^{-1})

$[N - NH_3]_f$ = Concentración de $N - NH_3$ final (mgL^{-1})

t_f = Tiempo en el cual finalizo el montaje (d)

t_i = Tiempo de inicio del montaje experimental (d)

$$rPO_4^{-3} = \frac{[PO_4^{-3}]_i - [PO_4^{-3}]_f}{t_f - t_i} \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde:

rPO_4^{-3} = Tasa de consumo de PO_4^{-3} ($mgL^{-1}d^{-1}$)

$[PO_4^{-3}]_i$ = Concentración de PO_4^{-3} inicial (mgL^{-1})

$[PO_4^{-3}]_f$ = Concentración de PO_4^{-3} final (mgL^{-1})

t_f = Tiempo en el cual finalizo el montaje (d)

t_i = Tiempo de inicio del montaje experimental (d)

4.6.3. Consumo de DQO, Nitrógeno amoniacal total, Ortofosfatos

$$\Delta DQO = DQO_i - DQO_f \quad \text{Ecuación 10}$$

Donde:

ΔDQO = Consumo de DQO (mgL^{-1})

DQO_i = Concentración de DQO inicial (mgL^{-1})

DQO_f = Concentración de DQO final (mgL^{-1})

$$\Delta N - NH_3 = [N - NH_3]_i - [N - NH_3]_f \quad \text{Ecuación 11}$$

Donde:

$\Delta N - NH_3$ = Consumo de $N - NH_3$ (mgL^{-1})

$[N - NH_3]_i$ = Concentración de $N - NH_3$ inicial (mgL^{-1})

$[N - NH_3]_f$ = Concentración de $N - NH_3$ final (mgL^{-1})

$$\Delta PO_4^{-3} = [PO_4^{-3}]_i - [PO_4^{-3}]_f$$

Ecuación 12

Donde:

ΔPO_4^{-3} = Consumo de PO_4^{-3} (mgL⁻¹)

$[PO_4^{-3}]_i$ = Concentración de PO_4^{-3} inicial (mgL⁻¹)

$[PO_4^{-3}]_f$ = Concentración de PO_4^{-3} final (mgL⁻¹)

4.6.4. Productividad de Biomasa

$$P_{Max} = \frac{B_f - B_i}{t_f - t_i}$$

Ecuación 13

Donde:

P_{Max} = Es la productividad máxima de biomasa (gL⁻¹d⁻¹)

B_i = Concentración de biomasa inicial (gL⁻¹)

B_f = Concentración de biomasa cuando se alcanzó la fase estacionaria (gL⁻¹)

t_f = Tiempo cuando se alcanzó la fase estacionaria(d)

t_i = Tiempo de inicio del montaje experimental (d)

4.7. Análisis estadístico

El diseño experimental es un factorial 2x3. Los factores para analizar son el pH y la relación S/X, donde el primero presenta dos niveles y el segundo tres. En la Tabla 4.8 se resumen las notaciones de los factores en el diseño experimental.

Tabla 4.8. Notación de los factores en el diseño experimental

Nombre del Factor	Notación	Niveles
pH	τ	A (6,5), B (7,5)
Relación	β	30, 50, 100
Sustrato/Biomasa (S/X)		

Por lo tanto, se tienen seis tratamientos en total, con tres réplicas por cada uno. Para el caso del nitrógeno, DQO y Ortofosfatos se calculó el porcentaje de reducción, el consumo y la tasa de consumo. Se tienen así tres variables respuesta a medir para cada parámetro, de esta manera, el modelo asociado al diseño para cada variable respuesta viene dado de acuerdo con la Ecuación 14 (Montgomery, 2004).

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

$i = 1, 2; j = 1, 2, 3; k = 1, 2, 3$

Ecuación 14

Donde:

y_{ijk} = Es el valor de porcentaje de reducción, el consumo y la tasa de consumo para cada parámetro dado el i -ésimo nivel del pH, el j -ésimo nivel de relación S/X, su interacción ($\tau\beta$) y la k -ésima réplica

τ_i = Es el efecto sobre la variable respuesta del i -ésimo nivel del pH

β_j = Es el efecto sobre la variable respuesta del j -ésimo nivel de S/X

$(\tau\beta)_{ij}$ = es el efecto sobre la variable respuesta de la interacción entre i -ésimo nivel de pH y el j -ésimo nivel del S/X

ε_{ijk} = Es el error aleatorio asociado a la k -ésima réplica dado el i -ésimo nivel de la relación S/X, el j -ésimo nivel del pH y la interacción entre ambos factores el cual es inherente al proceso experimental.

Para el diseño factorial, es de especial interés probar la hipótesis acerca de la igualdad de los efectos de los tratamientos en las filas, es decir: (Montgomery, 2004):

$$H_0: \tau_1 = \tau_2 = \dots = \tau_{s_1} = 0$$

$$H_a: \text{Al menos una } \tau_i \neq 0, i = 1, 2, \dots, s_1$$

Asimismo, de la igualdad de los efectos de los tratamientos de las columnas, es decir (Montgomery, 2004):

$$H_0: \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_{s_2} = 0$$

$$H_a: \text{Al menos una } \beta_j \neq 0, j = 1, 2, \dots, s_2$$

Igualmente, existe interés en determinar si los tratamientos de las filas y las columnas interactúan. Por lo tanto, también es de interés probar (Montgomery, 2004):

$$H_0: (\tau\beta)_{ij} = 0 \forall i, j; i = 1, 2, \dots, s_1, \quad j = 1, 2, \dots, s_2$$

$$H_a: \text{Al menos una } (\tau\beta)_{ij} \neq 0; i = 1, 2, \dots, s_1, \quad j = 1, 2, \dots, s_2$$

Al enumerar cada nivel de los factores como 1,2 (pH) y 1, 2, 3 (S/X) el diseño presento la estructura que se expone en la Tabla 4.9.

Tabla 4.9. Estructura del diseño experimental

		Factor β		
		1	2	3
Factor τ	1	$y_{111}, y_{112}, y_{113}$	$y_{121}, y_{122}, y_{123}$	$y_{131}, y_{132}, y_{133}$
	2	$y_{211}, y_{212}, y_{213}$	$y_{221}, y_{222}, y_{223}$	$y_{231}, y_{232}, y_{233}$

Donde y_{ijk} es el porcentaje de reducción, consumo y tasa de consumo para el fósforo, el nitrógeno o la DQO según corresponda.

Para el caso de la biomasa, se consideraron los mismos factores, pero sólo dos réplicas; las variables medidas fueron la productividad de biomasa y biomasa máxima. El diseño experimental respectivo viene dado por medio de la Ecuación 15.

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

$$i = 1, 2; j = 1, 2, 3; k = 1, 2$$

Ecuación 15

Donde:

y_{ijk} = Es el valor de productividad de biomasa y biomasa máxima dado el i -ésimo nivel del pH, el j -ésimo nivel de relación S/X, su interacción $(\tau\beta)$ y la k -ésima réplica

τ_i = Es el efecto sobre la variable respuesta del i -ésimo nivel del pH

β_j = Es el efecto sobre la variable respuesta del j -ésimo nivel de S/X

$(\tau\beta)_{ij}$ = es el efecto sobre la variable respuesta de la interacción entre i -ésimo nivel de pH y el j -ésimo nivel del S/X

ε_{ijk} = Es el error aleatorio asociado a la k -ésima réplica dado el i -ésimo nivel de la relación S/X, el j -ésimo nivel del pH y la interacción entre ambos factores el cual es inherente al proceso experimental.

La disposición del experimento se expone en la Tabla 4.10.

Tabla 4.10. Estructura del diseño experimental para caso de la Biomasa

		Factor β		
		1	2	3
Factor τ	1	y_{111}, y_{112}	y_{121}, y_{122}	y_{131}, y_{132}
	2	y_{211}, y_{212}	y_{221}, y_{222}	y_{231}, y_{232}

Donde y_{ijk} es la productividad de la biomasa o la biomasa máxima según corresponda.

Definido el diseño, el siguiente paso consiste en análisis de datos mediante el software estadístico Minitab. El procedimiento para encontrar el mejor tratamiento en términos estadísticos se llevará a cabo de la siguiente manera:

- 1) Se procederá a realizar un análisis exploratorio para monitorear la calidad de los datos, detectar variabilidades anormales, comportamientos destacables o que puedan influir en las inferencias eventualmente; adicional a esto, los resultados del análisis exploratorio se usarán para plantear hipótesis en lo que se refiere definir cuáles serían los mejores tratamientos.
- 2) Posteriormente, se llevará a cabo el Análisis de Varianza (ANOVA). Este método se utiliza para detectar entre los factores, cuales tienen un efecto que permita explicar la variabilidad asociada con la variable respuesta.
- 3) Adicionalmente, se probará si existen diferencias significativas entre los tratamientos mediante la prueba de Kruskal-Wallis. De detectarse alguna diferencia se procederá a comparar las medias agrupadas en pares, por medio de la prueba post-Hoc de Wilcoxon, lo que permitiría definir los mejores tratamientos en base a lo obtenido previamente en el análisis exploratorio.

5. ANÁLISIS Y RESULTADOS

5.1. Características del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca

Las características promedio del sustrato utilizado en el presente estudio se presentan en la Tabla 5.1. En cuanto a DQO y pH los valores fueron semejantes a los que presenta el agua residual derivada de las rallanderías ubicadas al norte del Departamento del Cauca (Colombia) (Colin et al., 2007). Las principales diferencias se presentan con los valores de $P-PO_4^{3-}$ y de NAT, los cuales pueden ser el resultado de factores que involucran desde la variedad de yuca usada hasta el tipo de proceso industrial.

Tabla 5.1. Características del sustrato

Parámetro fisicoquímico	Unidades	En este estudio	Colin et al. (2007)	Barrios et al. (2015)
pH	UN	4,24	3,6 - 6,5.	3,72
Nitrógeno Amoniacal Total (NAT)	mg N-NH ₃ L ⁻¹	6,46 ± 0,15	-	19
OrtoFosfatos	mg PO ₄ ⁻³ L ⁻¹	25,82 ± 1,19	-	7,79
DQO (total)	mgL ⁻¹	7.400 ± 1.649,92	4.200-7.000	2.671

Se puede observar que se presenta una baja concentración de nitrógeno, sin embargo, se han llevado a cabo estudios de cultivos de microalgas bajo condiciones similares de limitación de nitrógeno (Breuer et al., 2012, Gojkovic et al., 2020), por lo cual, en términos generales, se observa que el sustrato preparado en el laboratorio es representativo del agua residual real y cuenta con fuente de carbono orgánico, así como nutrientes asimilables por las microalgas que pueden sostener su crecimiento y la subsecuente depuración del agua residual utilizada como sustrato

5.2. Efecto del pH y la relación S/X en la reducción de DQO

En la Figura 5.1 y Tabla 5.2 se exponen los resultados del comportamiento de la DQO durante el montaje experimental. En todos los tratamientos el valor de la DQO disminuyó en el día dos del montaje alcanzando valores inferiores a 500 mgL⁻¹ DQO. A partir del día cuatro la reducción empezó a estabilizarse, comportamiento que no varió hasta el final del montaje (día trece).

Con respecto a la rápida reducción de la DQO obtenida en el estudio, se observa que es similar a lo reportado en diferentes investigaciones. Mujtaba et al. (2017) reportaron un comportamiento similar al utilizar *C. Vulgaris* para depurar un efluente municipal en consorcio con microorganismos de lodos activados suspendidos, dando como resultado una rápida disminución de la concentración de DQO en un tiempo de 24 horas, relacionando dicho comportamiento al crecimiento mixotrófico de la microalga. Por su parte Wang et al. (2016) reportaron la mayor disminución de la concentración de DQO en un tiempo de 48 horas, utilizando *Chlorella sp.* en agua residual artificial bajo cultivo mixotrófico, indicando que se presenta una mayor tasa de consumo en comparación con el crecimiento heterótrofo. Cho et al. (2015) reportaron que la concentración de DQO, disminuyó a partir de las 24 horas, para un cultivo de *C. Vulgaris* en un efluente de fermentación de AGV's.

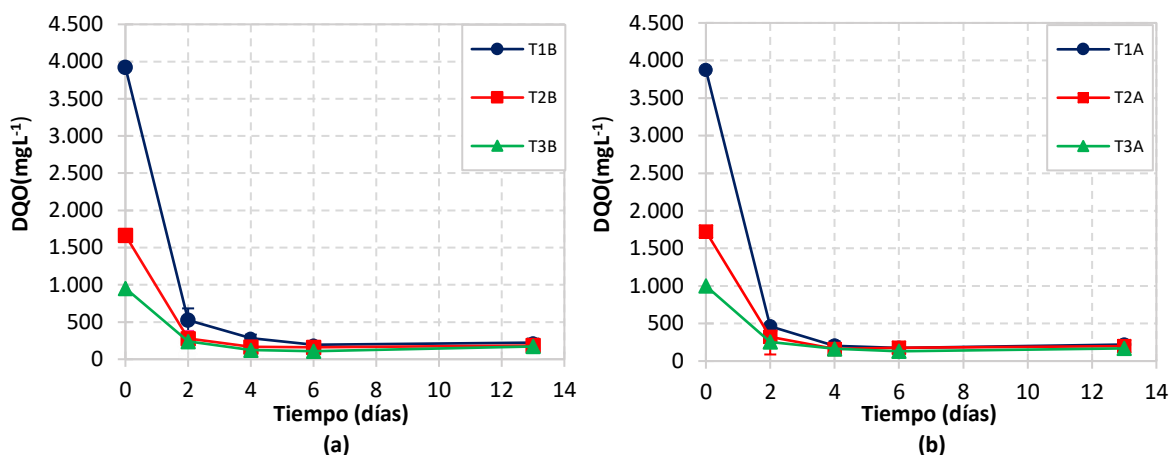


Figura 5.1. Comportamiento de la DQO durante el proceso experimental:
(a) nivel de pH 2 (7,5); (b) nivel de pH 1 (6,5)

Tabla 5.2. Valores de la DQO durante el proceso experimental

Valores de la DQO (mgL ⁻¹)						
Tratamientos						
Día	T ₁ A	T ₁ B	T ₂ A	T ₂ B	T ₃ A	T ₃ B
0	3.873,61±9 5,47	3.922,22±7 8,26	1.723,78±2 5,89	1.666± 44,85	999,48± 29,58	953,47±1 7,34
2	461,73±23, 76	525±158,2 2	323,89±55, 49	278,06±10 2,09	253,56±16 6,04	239,11±6 3,80
4	204,44±61, 00	283,61±47, 38	161,87±48, 11	165,66±9,5 3	163,56±28, 35	123,56±1 3,47
6	174,67±23, 09	194,67±30, 55	179,11±36, 72	160,22±5,0 9	130,22±12, 62	108±37,5 6
13	220,22±21, 43	224,67±51, 96	198±44,10	184,67±47, 02	170,22±32, 72	172,44±5 3,16

En cuanto al efecto que puedan tener los tratamientos sobre la reducción de DQO se observa que, la mayoría de los tratamientos presenta los valores más bajos de concentración de DQO en el día seis, siendo el tratamiento T₁B (S/X=100 y pH=7,5) el que presento la mayor concentración con un valor de $194,67 \pm 30,55 \text{ mgL}^{-1}$, los tratamientos T₁A (S/X=100 y pH=6,5), T₂A (S/X=50 y pH=6,5) y T₂B (S/X=50 y pH=7,5) presentaron valores similares, mientras que las concentraciones más bajas se obtuvieron en los tratamientos T₃A (S/X=30 y pH=6,5) y T₃B (S/X=30 y pH=7,5) con valores de $130,22 \pm 12,62$ y $108 \pm 37,56 \text{ mgL}^{-1}$ respectivamente. Se observa en este último día de montaje que la concentración más baja se alcanzó en T₃A y T₃B con valores de $170,22 \pm 32,72$ y $172,44 \pm 53,16 \text{ mgL}^{-1}$ respectivamente. Las concentraciones más altas se presentaron en los tratamientos T₁A y T₁B con valores de $220,22 \pm 21,43$ y $224,67 \pm 51,96 \text{ mgL}^{-1}$ respectivamente.

En el último día del montaje se pudo observar un incremento de la DQO para todos los tratamientos, lo cual según Godos et al. (2010) puede estar relacionado con la excreción de materia orgánica extracelular (MOE) o una hidrólisis intensiva de biomasa en la etapa final del periodo de cultivo; según los autores, dicha hipótesis se encuentra soportada por investigaciones previas en las cuales se observaron excreciones de MOE con concentraciones de hasta 80 mgL^{-1} en algunos cultivos de microalgas, la cantidad de

materia orgánica liberada (compuesta principalmente por polisacáridos) aumenta con la edad de la microalga, es decir, con el tiempo en que dura el cultivo.

Los resultados obtenidos indican que los tratamientos con mayor relación S/X, presentaron concentraciones de DQO más altas en cada uno de los días evaluados, en comparación con los tratamientos a menor relación S/X, lo cual puede estar relacionado con las diferentes concentraciones suministradas al inicio del proceso. Los tratamientos con la misma relación S/X y diferentes niveles de pH presentaron concentraciones de DQO similares en cada uno de los días evaluados, lo cual puede indicar que el pH no fue un factor influyente en la disminución de la DQO.

Para analizar la influencia de los factores evaluados (pH y relación S/X) en el comportamiento de la DQO, se determinó el porcentaje de reducción (Ecuación 4), tasa de consumo (Ecuación 7) y consumo de DQO (Ecuación 10) variables que permiten evaluar y comparar el rendimiento de cada tratamiento.

En la Tabla 5.3 y la Figura 5.2 se presentan los valores y el comportamiento del porcentaje de reducción de la DQO para cada tratamiento durante los trece días de montaje, los cuales fueron superiores al 80%. Los porcentajes más altos se alcanzaron en los tratamientos con la máxima relación S/X (T₁A y T₁B) con valores de $94,32 \pm 0,61$ y $94,27 \pm 1,27$ % respectivamente, mientras que los valores más bajos se alcanzaron en los tratamientos (T₃A y T₃B) con valores de $82,97 \pm 3,08$ y $81,91 \pm 5,75$ % respectivamente.

Tabla 5.3. Porcentaje de reducción de DQO durante el proceso experimental

Tratamiento	Porcentaje de reducción (%)	Desviación estándar
T ₁ A	94,32	0,61
T ₁ B	94,27	1,27
T ₂ A	88,51	2,68
T ₂ B	88,92	3,11
T ₃ A	82,97	3,08
T ₃ B	81,91	5,75

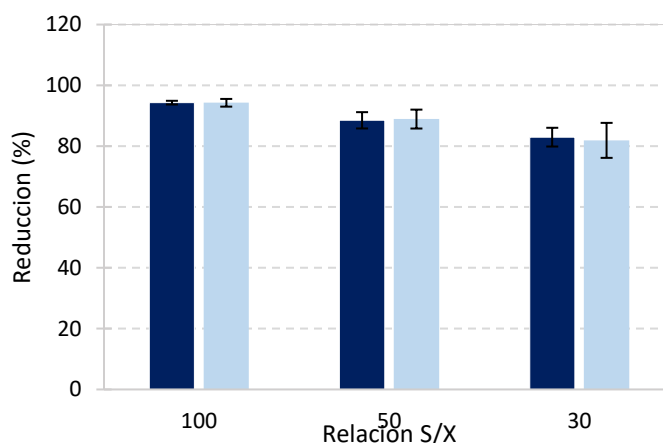


Figura 5.2. Porcentaje de reducción de DQO durante el proceso experimental
pH (■) nivel 1 y (□) nivel 2

En la Tabla 5.4 y Figura 5.3 se presentan los valores y el comportamiento del consumo de DQO durante los trece días de montaje. El mayor consumo se alcanzó en los tratamientos con la máxima relación S/X (T₁A y T₁B) con valores de $3.653,39 \pm 104,70$ y $3.697,56 \pm 71,24$ mgL⁻¹ respectivamente, mientras que las cantidades más bajas se obtuvieron en los tratamientos (T₃A y T₃B) con valores de $829,26 \pm 34,75$ y $781,03 \pm 66,05$ mgL⁻¹ respectivamente. Llama la atención al comparar el consumo y los porcentajes de reducción que el sistema utilizado tiene la capacidad de remover altas cargas de materia orgánica sin reducir la eficiencia, este mismo comportamiento de los sistemas algales se observa en el trabajo de Gupta et al. (2016).

Tabla 5.4. Consumo de DQO

Tratamiento	Consumo (mgL ⁻¹)	Desviación estándar
T ₁ A	3.653,39	104,70
T ₁ B	3.697,56	71,24
T ₂ A	1.525,78	62,39
T ₂ B	1.481,33	86,86
T ₃ A	829,26	34,75
T ₃ B	781,03	66,05

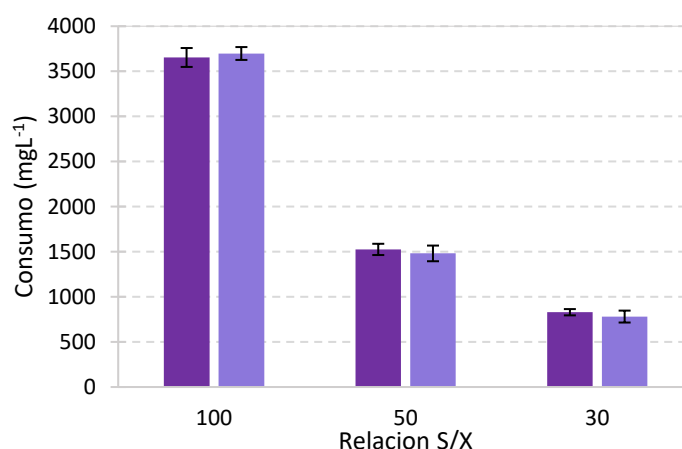


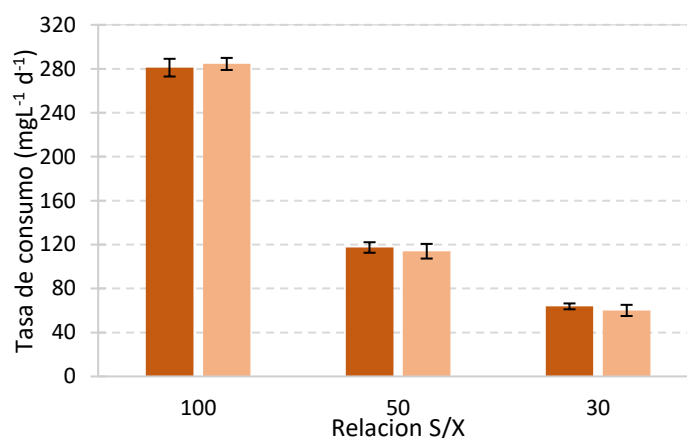
Figura 5.3. Consumo de DQO durante el proceso experimental
pH (■) nivel 1 y (■) nivel 2

En la Figura 5.4 y Tabla 5.5 se presentan los valores y el comportamiento de la tasa de consumo de DQO durante los trece días de montaje. La mayor tasa de consumo se alcanzó en los tratamientos con la máxima relación S/X (T₁A y T₁B) con valores de $281,029 \pm 8,054$ y $284,43 \pm 5,48$ mgL⁻¹d⁻¹ respectivamente, mientras que las tasas más bajas se obtuvieron en los tratamientos (T₃A y T₃B) con valores de $63,79 \pm 2,67$ y $60,079 \pm 5,08$ mgL⁻¹d⁻¹ respectivamente.

El rápido agotamiento de la concentración de DQO en el día dos del montaje puede estar relacionado con las características del sustrato, es decir, la disponibilidad de compuestos orgánicos fácilmente asimilables y ausencia de compuestos precursores de condiciones inhibitorias (Gupta et al., 2016).

Tabla 5.5. Tasa de consumo de DQO

Tratamiento	Tasa de consumo ($\text{mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$)	Desviación estándar
T ₁ A	281,029	8,054
T ₁ B	284,43	5,48
T ₂ A	117,37	4,79
T ₂ B	113,95	6,68
T ₃ A	63,79	2,67
T ₃ B	60,079	5,08

**Figura 5.4.** Tasa de consumo de DQO durante el proceso experimental. pH (■) nivel 1 y (□) nivel 2

El consumo en el día dos representó aproximadamente el 92% del consumo total de DQO (Tabla 5.4) para todos los tratamientos durante el periodo de cultivo, lo que puede indicar que en los dos primeros días el sistema para el crecimiento de la microalga favoreció el metabolismo posiblemente heterótrofo para asimilar las fuentes de carbono orgánico. Lo anterior es posible si se tiene en cuenta que en condiciones mixotróficas, el comportamiento heterótrofo y autótrofo pueden ocurrir simultáneamente o de manera independiente (Lin et al., 2015). Se presume que se asimilaron fácilmente azúcares simples como sacarosa, glucosa y fructosa que pueden estar presentes y favorecer el consumo de sustrato (Abreu et al., 2012, de Carvalho et al., 2018, Li et al., 2019a)

La tendencia a la estabilización de la concentración de la DQO después del día dos de montaje podría indicar que la microalga desarrolló un metabolismo autótrofo para asimilar el carbono inorgánico del medio. Liu et al. (2013a) exponen que un cultivo de *C. vulgaris* alimentado con un efluente con mezcla de compuestos orgánicos, tras agotarse estas fuentes aumentó el consumo de CO_2 , es decir, que las microalgas optaron por el metabolismo autótrofo para garantizar el crecimiento de biomasa. Ren et al. (2014) describen que *Scenedesmus* sp. consumió rápidamente el acetato (fuente carbono orgánico fácilmente asimilable), mientras que el etanol no se consumió totalmente contribuyendo a la DQO residual, es decir, que las microalgas pueden presentar un comportamiento preferencial para distintas fuentes de carbono, lo cual podría suponer que la presencia de DQO residual en todos los tratamientos evaluados al finalizar el periodo de cultivo se deba a la presencia de compuestos orgánicos que no son preferenciales en el metabolismo de las microalgas.

En la Tabla 5.6 se muestran los valores de porcentajes de reducción, consumo y tasas de consumo consultados en la literatura, para cultivos de microalgas en diferentes tipos de agua residual.

Tabla 5.6. Parámetros consultados en la literatura

Reducción (%)	Tasa de consumo (mgL ⁻¹ d ⁻¹ O ₂)	Consumo (mgL ⁻¹ O ₂)	Microalga	Agua residual*	Referencia
56,1	57,73 ^b	866 ^b	<i>Chlorella Minutissima</i>	Procesamiento de yuca ^c	Borghetti, (2009)
84	510	2.250	<i>Chlorella Pyrenoidosa</i>	Procesamiento de soya	Hongyang et al. (2011)
67,35	-	-	<i>C. Incerta</i>	Aceite de palma	Kamyab et al. (2015)
75,78	629,01	-	<i>Chlorella Pyrenoidosa</i>	Almidón ^a y alcohol	Yang et al. (2015)
63	630	3.150	<i>Chlorella sp.</i>	Procesamiento industrial de alimentos ^c	Gupta et al. (2016)
93	465 ^b	2,790			
83	138,30 ^b	830			
-	4,25	-	<i>Phormidium Autumnale</i>	Procesamiento de yuca	Neves et al. (2016)
87,3	523,8 ^b	1.047,60 ^b	<i>Chlorella sp.</i>	Agua residual artificial	Wang et al. (2016)
70,50	128,61	1.543,31	<i>Chlorella Vulgaris</i>	Porcina	Cao et al. (2018)
92	138,12	1.105	<i>Chlorella Sorokiniana</i>	Procesamiento industrial de alimentos	Gupta y Pawar (2018)
94,45	227,82 ^b	7.518 ^b	<i>Scenedesmus sp.</i>	Curtiembre	Rosales et al. (2018)
92,24	103,44	1.448,17	<i>Desmodesmus Armatus</i>	Procesamiento de yuca hidrolizada + MBB	Okpozu et al. (2019)

^a Agua residual después de digestión anaerobia

^b Calculado con los datos suministrados

^c Agua residual diluida

Las variables evaluadas para cada tratamiento en el presente caso estudio, se encontraron entre los rangos reportados en la Tabla 5.6, excepto para el caso del consumo DQO en los tratamientos T₃A y T₃B, los cuales presentaron los valores más bajos al final del periodo de cultivo. Para el caso del porcentaje de reducción, los valores alcanzados fueron superiores al 80% siendo los más altos (Tabla 5.3) cercanos al valor reportado por Rosales et al. (2018). Los datos obtenidos por Cao et al. (2018) utilizando la microalga *C. vulgaris* y un agua residual agroindustrial, fueron menores a los valores alcanzados por los tratamientos T₁A y T₁B.

A partir de estos resultados se podría indicar que el sistema logra reducir la DQO del agua residual diluida con concentraciones iniciales incluso superiores a algunos reportes en la literatura como en el estudio de Borghetti, (2009) donde se utilizó agua residual diluida del procesamiento de yuca, con una DQO inicial de 1.545 mgL⁻¹, el porcentaje de reducción reportado fue menor al valor alcanzado en cada uno de los tratamientos evaluados en el presente estudio, mientras que el consumo y tasa de consumo presentaron valores

similares a los alcanzados por T₃A y T₃B. Por otra parte, en el estudio de Okpozu et al. (2019) que utilizó agua residual del procesamiento de yuca suplementada con medio basal bold, con una DQO inicial de 1.570 mgL⁻¹, el porcentaje de reducción fue similar a los valores obtenidos en los tratamientos T₁A y T₁B; el consumo y la tasa de consumo también fueron similares a los valores alcanzados en T₂A y T₂B, lo que puede estar relacionado con la semejanza en la concentración de DQO inicial. Lo anterior permite concluir que los tratamientos evaluados presentaron un buen comportamiento en cada una de las variables evaluadas, especialmente T₁A y T₁B, en los cuales se logró el mejor desempeño en términos de reducción de la DQO.

A mayor nivel de relación S/X, las concentraciones residuales de DQO fueron superiores en comparación con los tratamientos que ostentaron una menor concentración de sustrato inicial, sin embargo, el comportamiento del consumo para el caso de las relaciones más altas permite concluir que para el mismo intervalo de tiempo se alcanzó una mayor disminución de la DQO. Asimismo, la tasa de consumo indicaría que se presenta una mayor velocidad en el agotamiento de la materia orgánica durante el periodo de evaluación, es decir, que en términos de reducción de materia orgánica T₁A y T₁B lograron el mejor rendimiento.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se pudo observar que a mayor relación S/X se presentaron mayores porcentajes de reducción, consumo y tasa de consumo de DQO, es decir que la variable genera un efecto significativo en el comportamiento la DQO, lo cual se corrobora con el análisis estadístico ($p < 0,05$) presentado más adelante. Es decir, que no se logra evidenciar que la relación S/X en este valor represente una limitación por sustrato, a partir del cual se produce la disminución de la biomasa microalgal, aumentando el tiempo necesario para el consumo del sustrato o limitando la totalidad del consumo al final del periodo de cultivo.

En concordancia con lo obtenido en el presente estudio, Lin et al. (2015) describen que el aumento de la concentración de sustrato inicial estimula el crecimiento de biomasa, favoreciendo el consumo del sustrato en un menor tiempo. Por su parte Liu et al. (2013a) indican que los compuestos orgánicos fácilmente asimilables se consumen rápidamente al utilizar relaciones S/X altas, sin embargo, para el caso de compuestos que tienen un efecto inhibitorio se requiere de una menor concentración de sustrato inicial o en su defecto un incremento en el inóculo inicial. Por eso la importancia de los resultados obtenidos para conocer e identificar un posible efecto de inhibición del agua residual del procesamiento de la yuca. En ese sentido varios estudios reportan que a mayor relación S/X se presenta una menor reducción de DQO, Gupta et al. (2016) sustentan que la presencia de altas concentraciones de DQO pueden afectar el crecimiento de las microalgas e inhibir su habilidad para consumir carbono orgánico, puntualizando en que a altas concentraciones de DQO la biodegradabilidad del agua residual y la inhibición del sustrato son dos factores importantes que influyen en la reducción de la DQO.

Como el mejor desempeño se alcanzó al incrementar la relación S/X, esto puede indicar que, para el tipo de sustrato utilizado, las concentraciones iniciales evaluadas no alcanzaron un valor de concentración inhibitoria, lo cual también se puede sustentar teniendo en cuenta que para el día dos de montaje, donde se pudo observar una rápida disminución de la DQO, se incrementó la concentración de biomasa (sección 5.4) favoreciendo el consumo de compuestos orgánicos fácilmente asimilables disponibles en el sustrato (Borghetti, 2009; Ge et al. 2018). Asimismo, Turon et al. (2016) exponen que se pueden seleccionar relaciones S/X mayores, pero esto depende del tipo y composición de sustrato.

Para el caso del pH se podría concluir que no fue un factor influyente en el comportamiento de la reducción de la DQO, se pudo observar que en los tratamientos con la misma relación S/X, pero a diferente nivel de pH inicial, las variables evaluadas presentaron valores similares, lo cual se corrobora en el análisis estadístico ($p>0,05$) presentado más adelante.

La Tabla 5.7 y la Figura 5.5 muestran los datos medidos del comportamiento del pH durante el periodo de cultivo.

Tabla 5.7. Valores del pH durante el periodo de cultivo

Valores del pH (Unidades)						
Tratamientos						
Día	T₁A	T₁B	T₂A	T₂B	T₃A	T₃B
0	6,50±0,00	7,50±0,00	6,50±0,00	7,50±0,00	6,50±0,00	7,50±0,00
2	8,82±0,042	8,92±0,17	8,70±0,20	8,92±0,28	8,92±0,22	9,01±0,67
4	8,91±0,066	8,97±0,13	8,74±0,25	8,59±0,12	8,59±0,021	8,48±0,44
6	8,79±0,18	8,80±0,19	8,51±0,28	8,58±0,28	8,32±0,37	8,48±0,10
8	8,97±0,23	8,79±0,089	8,42±0,076	8,54±0,39	8,24±0,43	9,00±0,63
10	9,20±0,075	9,18±0,11	8,61±0,12	8,81±0,31	8,39±0,18	8,60±0,017
13	8,23±0,25	8,62±0,12	7,96±0,090	7,94±0,30	8,11±0,28	7,51±0,17

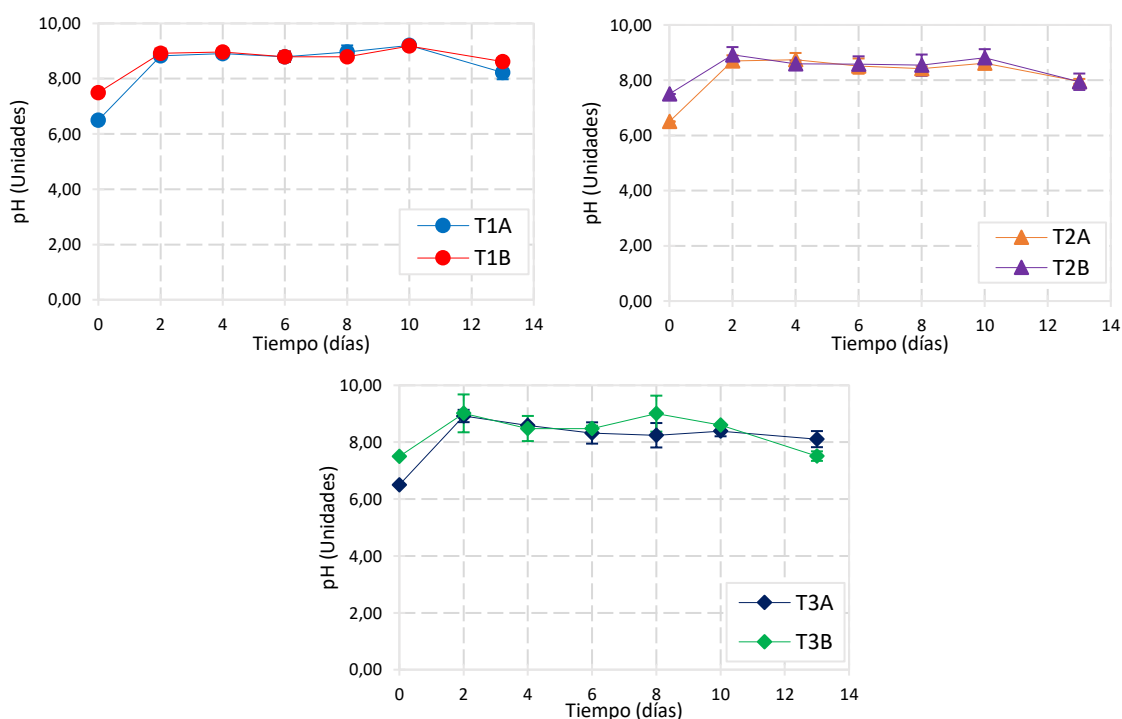


Figura 5.5. Comportamiento del pH durante el proceso experimental

En todos los casos se presentó un comportamiento similar, iniciando con un rápido incremento, seguido de un periodo de estabilización y finalmente decaimiento en todos los valores. En el día dos se alcanzaron valores superiores a 8,7. A partir del día dos hasta el diez, el comportamiento general tendió a oscilar entre 8,2 y 9,2, mientras que al final del periodo de cultivo el pH disminuyó en cada uno de los tratamientos alcanzando valores entre 7,5 y 8,6 aproximadamente.

Turon et al. (2016) exponen que cuando no se realiza control de pH, el valor aumenta debido al consumo de compuestos orgánicos, conduciendo al incremento de amoníaco tóxico (NH_3) si hay amonio presente en el medio. De acuerdo con Cho et al. (2015), el pH se eleva debido a la fotosíntesis de la microalga y a la reducción de ácidos orgánicos del sustrato, asimismo, el rápido crecimiento del pH puede resultar en la inhibición del crecimiento heterótrofo (Turon et al, 2016).

El valor de pH regula la disponibilidad de diferentes fuentes de carbono utilizadas por las microalgas en la fotosíntesis. El valor de pH también se incrementa rápidamente debido al consumo de carbono inorgánico, especialmente CO_2 , lo cual favorece la acumulación de iones OH^- , incluso si se suministra aire atmosférico por medio de burbujeo, puede que no proporcione suficiente CO_2 para evitar el aumento del pH (Ruiz-Marín et al. 2010; Ruiz, 2011; Khalid et al. 2016).

Con base en lo anterior, el incremento del pH se puede relacionar con la transformación de la materia orgánica. En la Figura 5.1 se observa que aproximadamente hasta el día cuatro se llevó a cabo un rápido consumo de DQO, posteriormente, la concentración se estabilizó, lo que podría indicar que una vez agotada la fuente de carbono orgánico fácilmente asimilable, se favorecería el metabolismo autótrofo promoviendo el consumo de carbono inorgánico en el medio, provocando que el valor del pH se mantenga superior a 8,0 Unidades en todos los tratamientos. En algunos tratamientos se observa que los valores de pH oscilaron, mientras que en el tratamiento T_3A se presentó una disminución a partir del día dos hasta el día ocho, comportamiento que se podría relacionar con el crecimiento celular. Al final del periodo de cultivo, los valores disminuyeron en todos los tratamientos, como resultado de la estabilización del crecimiento microalgal con la subsecuente posible acumulación de CO_2 .

El estudio de Cho et al. (2015), se evaluó el efecto de la concentración inicial de sustrato y el efecto del pH con control (7,0) y sin control inicial, en la mayoría de los tratamientos los valores para el porcentaje de reducción, consumo y tasa de consumo fueron similares, sin embargo, el control de pH favoreció el consumo de materia orgánica, especialmente en el tratamiento que presentó el mejor desempeño (pH controlado = 7,0 y sustrato sin diluir). En ese sentido se podría concluir que el pH con control inicial favorece la disminución de la materia orgánica cuando se presentan condiciones óptimas de disponibilidad de sustratos fácilmente asimilables. Sin embargo, al variar la concentración de sustrato inicial (factor que genera un efecto en el pH por los compuestos orgánicos presentes), el control del pH podría presentar menor efecto, no afectaría de manera significativa la disminución de la DQO, dada su tendencia a incrementarse a medida que transcurre el tiempo en un cultivo mixotrófico.

5.3. Efecto del pH y la relación S/X en la reducción de Nitrógeno amoniacal total (NAT)

En la Figura 5.6 y Tabla 5.8 se exponen los resultados del comportamiento del NAT durante el montaje experimental. En la mayor parte de los tratamientos, el valor del NAT se incrementó en el día dos, excepto en los tratamientos T_1A y T_1B , en los cuales se puede evidenciar una disminución, con valores de $1,67 \pm 0,52$ y $1,72 \pm 0,67 \text{ mgL}^{-1}$ respectivamente. Del día dos al cuatro se observa un incremento general de la concentración, siendo más pronunciado en T_1A y T_1B . A partir del día cuatro la concentración disminuyó en todos los casos. A partir del día seis los tratamientos T_2A , T_2B , T_3A y T_3B presentaron un comportamiento con tendencia a la estabilización, mientras que en T_1A y T_1B se evidencia una rápida disminución, lo cual se relaciona con la mayor disponibilidad del nutriente debido

al incremento que presentó en el cuarto día, promoviendo su asimilación y utilización en los procesos metabólicos de la microalga.

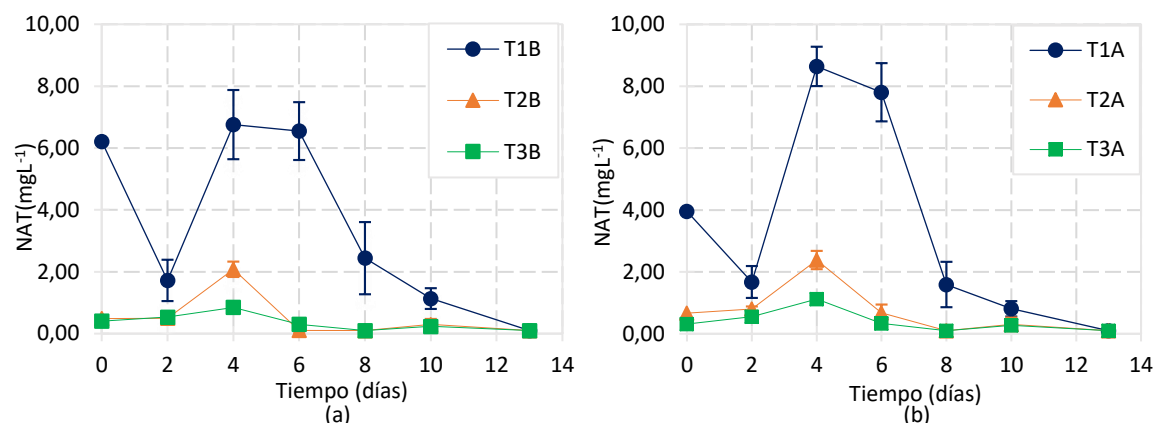


Figura 5.6. Comportamiento del NAT durante el proceso experimental
(a) nivel 2 de pH (7,5); (b) nivel 1 de pH (6,5)

Tabla 5.8. Valores del NAT durante el proceso experimental

Valores de NAT (mgL ⁻¹)						
Tratamientos						
Día	T ₁ A	T ₁ B	T ₂ A	T ₂ B	T ₃ A	T ₃ B
0	3,95±1,37	6,21±2,12	0,67±0,24	0,49±0,16	0,32±0,16	0,40±0,035
2	1,67±0,52	1,72±0,67	0,80±0,082	0,49±0,14	0,55±0,12	0,53±0,16
4	8,64±0,64	6,76±1,12	2,38±0,30	2,08±0,25	1,12±0,13	0,85±0,10
6	7,81±0,94	6,55±0,94	0,68±0,27	0,11±0,095	0,33±0,093	0,30±0,068
8	1,59±0,73	2,44±1,17	0,10±0,00	0,10±0,00	0,10±0,023	0,10±0,00
10	0,81±0,25	1,13±0,34	0,31±0,22	0,30±0,18	0,28±0,043	0,24±0,025
13	0,10±0,00	0,10±0,00	0,10±0,00	0,10±0,00	0,10±0,00	0,10±0,00

Es importante indicar que para T₂A, T₂B, T₃A y T₃B en el día ocho y para todos los tratamientos al final del periodo de cultivo, el valor del NAT fue menor al límite detectable ($<0,10 \pm 0,00$ mgL⁻¹) por el método analítico utilizado (Sección 4.5). Sin embargo, para poder realizar los cálculos de porcentaje de reducción, consumo y tasa de consumo se utilizó la concentración mínima (0,10 mgL⁻¹) utilizada en la curva de calibración del método.

La relación S/X incidió en la concentración inicial del NAT, se pudo observar que a mayor dilución del sustrato la disponibilidad de nitrógeno disminuyó. Los valores iniciales indican que se presentó limitación de nitrógeno en cada una de las condiciones de relación S/X evaluadas. Rosales et al. (2018) indican que a un valor de 23,6 mgL⁻¹ se presentan condiciones limitantes de este nutriente, lo que podría tener efectos directos en el crecimiento microalgal. Zheng et al. (2018) exponen que concentraciones de 21 mgL⁻¹ o menores, pueden ser insuficientes para llevar a cabo el crecimiento de las microalgas. En el presente caso de estudio la concentración de NAT (Tabla 5.1) fue de $6,46 \pm 0,15$ mgL⁻¹, valor que disminuyó al realizar las respectivas diluciones.

La limitación de nitrógeno en el medio genera una condición de estrés en la microalga que induce a la acumulación de lípidos. La flexibilidad de la concentración de fósforo y nitrógeno en la biomasa, le permite a la microalga ajustar su concentración intracelular de nitrógeno y fósforo a los suministrados por el agua residual. Esta flexibilidad es esencial para garantizar la reducción del nitrógeno y fósforo del agua residual (Beuckels et al., 2015).

A pesar de la baja disponibilidad de NAT en el agua residual, fue posible observar una tendencia, en cuanto a la influencia de los factores evaluados (pH y relación S/X) en la reducción de nitrógeno amoniacal, para lo cual se determinó el porcentaje de reducción (Ecuación 5), tasa de consumo (Ecuación 8) y consumo (Ecuación 11).

En la Tabla 5.9 y la Figura 5.7 se presentan los valores y el comportamiento del porcentaje de reducción del NAT para cada tratamiento durante los trece días de montaje, los cuales se encontraron en un rango de 62 y 98%. Los porcentajes más altos se alcanzaron en los tratamientos con la máxima relación S/X (T₁A y T₁B) con valores de $97,23 \pm 1,08$ y $98,24 \pm 0,66\%$ respectivamente, mientras que los valores más bajos se alcanzaron en los tratamientos (T₃A y T₃B) con valores de $62,32 \pm 19,17$ y $75,08 \pm 2,18 \%$ respectivamente.

Tabla 5.9. Porcentaje de reducción de NAT durante el proceso experimental

Tratamiento	Porcentaje de reducción (%)	Desviación estándar
T ₁ A	97,23	1,08
T ₁ B	98,24	0,66
T ₂ A	83,20	7,75
T ₂ B	77,65	7,87
T ₃ A	62,32	19,17
T ₃ B	75,08	2,18

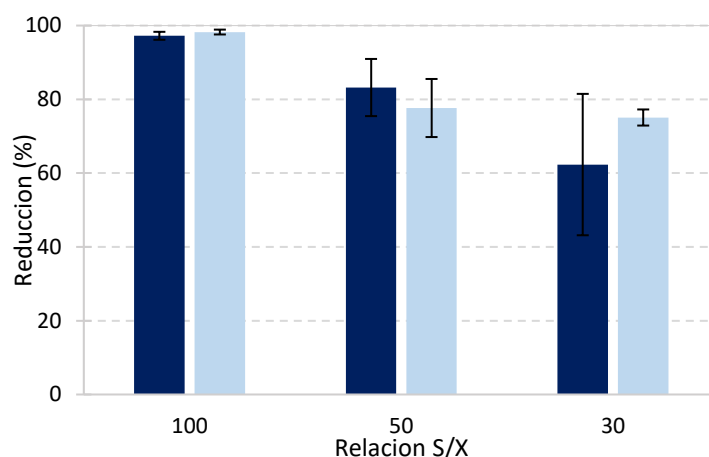
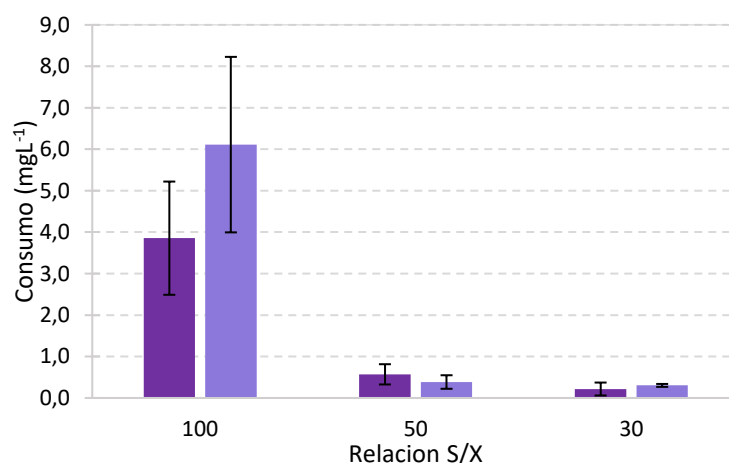


Figura 5.7. Porcentaje de reducción de NAT durante el proceso experimental
pH (■) nivel 1 y (□) nivel 2

En la Tabla 5.10 y la Figura 5.8 se presentan los valores y el comportamiento del consumo de NAT durante los trece días de montaje. El mayor consumo se alcanzó en los tratamientos con la máxima relación S/X (T₁A y T₁B) con valores de $3,85 \pm 1,37$ y $6,11 \pm 2,12 \text{ mgL}^{-1}$ respectivamente, mientras que las cantidades más bajas se obtuvieron en los tratamientos (T₃A y T₃B) con valores de $0,22 \pm 0,16$ y $0,30 \pm 0,035 \text{ mgL}^{-1}$ respectivamente.

Tabla 5.10. Consumo de NAT

Tratamiento	Consumo (mgL ⁻¹)	Desviación estándar
T ₁ A	3,85	1,37
T ₁ B	6,11	2,12
T ₂ A	0,57	0,24
T ₂ B	0,39	0,16
T ₃ A	0,22	0,16
T ₃ B	0,30	0,035

**Figura 5.8.** Consumo de NAT durante el proceso experimental
pH (■) nivel 1 y (■) nivel 2

En la Figura 5.9 y Tabla 5.11 se presentan los valores y el comportamiento de la tasa de consumo de NAT durante los trece días de montaje. La mayor tasa de consumo se alcanzó en los tratamientos con la máxima relación S/X (T₁A y T₁B) con valores de $0,30 \pm 0,11$ y $0,47 \pm 0,16$ mgL⁻¹d⁻¹ respectivamente, mientras que las tasas más bajas se obtuvieron en los tratamientos (T₃A y T₃B) con valores de $0,017 \pm 0,012$ y $0,023 \pm 0,0027$ mgL⁻¹d⁻¹ respectivamente.

Tabla 5.11. Tasa de Consumo de NAT

Tratamiento	Tasa de consumo (mgL ⁻¹ d ⁻¹)	Desviación estándar
T ₁ A	0,30	0,11
T ₁ B	0,47	0,16
T ₂ A	0,044	0,019
T ₂ B	0,030	0,013
T ₃ A	0,017	0,012
T ₃ B	0,023	0,0027

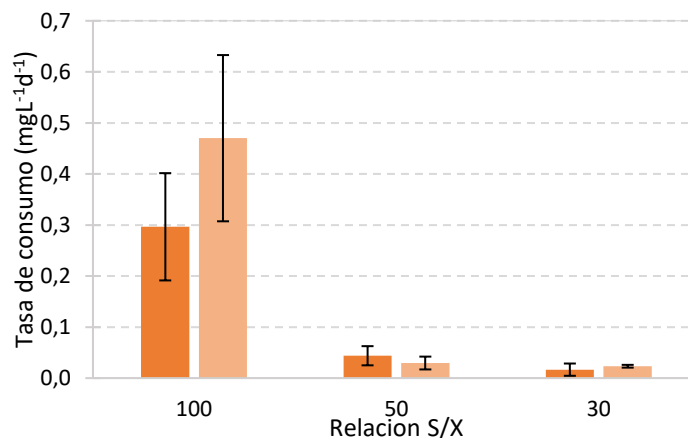


Figura 5.9. Tasa de consumo de NAT durante el proceso experimental
pH (■) nivel 1 y (■) nivel 2

En los tratamientos T₁A y T₁B se pudo observar un rápido consumo entre el día seis y ocho, lo cual puede estar relacionado con el crecimiento de biomasa que se presentó a partir del día seis (sección 5.4). Para el resto de los tratamientos, el agotamiento del NAT se presentó en el día ocho, lo cual podría estar relacionado con las bajas concentraciones de este nutriente en el medio en comparación con T₁A y T₁B (Gupta y Pawar, 2018).

En la Tabla 5.12 se muestran valores de porcentajes de reducción, consumo y tasas de consumo consultados en la literatura, para cultivos de microalgas en diferentes tipos de agua residual.

De acuerdo con la tendencia presentada en los resultados, se observa que a mayor relación S/X se presentaron mayores porcentajes de reducción, consumo y tasa de consumo de NAT, es decir que la variable genera un efecto significativo en el comportamiento del NAT, lo cual se corrobora en el análisis estadístico ($p < 0,05$).

En el estudio de Lu et al. (2015) se presentó un comportamiento similar, con un decrecimiento lento en la concentración de nitrógeno total a mayor dilución del sustrato. Por otro lado, se presentó que a mayor relación S/X la rapidez del consumo de nitrógeno total se incrementó. Dicho comportamiento se relaciona con la menor disponibilidad de nitrógeno en los tratamientos con mayor dilución del sustrato, presentando un rápido agotamiento al segundo día de cultivo.

En el presente caso de estudio, se observó que a mayor relación S/X se presentó mayor disponibilidad de nitrógeno en el sustrato, asociado con una mayor concentración inicial e incremento significativo del NAT entre el día dos y cuatro para T₁A y T₁B, en comparación con el resto de los tratamientos (Figura 5.6). Asimismo, la reducción continua de NAT durante el periodo de cultivo permitió alcanzar los máximos valores para el consumo y tasa de consumo en comparación al resto de tratamientos. Al respecto Lu et al. (2015) exponen que para evitar dichas variaciones relacionadas con la disponibilidad del nutriente y maximizar la tasa de consumo es necesario suplementar nitrógeno en intervalos apropiados en cultivos continuos y semicontinuos.

Tabla 5.12. Parámetros consultados en la literatura

Reducción (%)	Tasa de consumo (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	Consumo (mgL ⁻¹)	Microalga	Agua residual	Referencia
45	0,24 ^b	2,93 ^b	<i>Chlorella Vulgaris</i>	Textil	Lim et al. (2010)
99,7	195,55 ^b	977,76 ^b	<i>Chlorella Vulgaris</i>	Estiércol Vacuno sin digestar	Wang et al. (2010)
89,10	8,32 ^b	41,6 ^b	<i>Chlorella Pyrenoidosa</i>	Procesamiento de soya	Hongyang et al. (2011)
50	0,37 ^b	7,50 ^b	<i>Chlorella Vulgaris</i>	Artificial	Hernandez-Reyes et al. (2012)
83,83	6,58	52,64 ^b	<i>Chlorella sp.</i>	Granjas industria láctea	Lu et al. (2015) ^a
91,60	257,61 ^b	28,62 ^b	<i>Chlorella Pyrenoidosa</i>	Almidón y alcohol	Yang et al. (2015) ^a
99,20	24,80 ^b	49,6 ^b	<i>Chlorella sp.</i>	Agua residual artificial	Wang et al. (2016)
65,50	18,44 ^b	221,39 ^b	<i>Chlorella Vulgaris</i>	Porcina	Cao et al. (2018)
99,30	1,93 ^b	34,75 ^b	<i>Chlorella Vulgaris</i>	Agua residual de lodo espesado	Ge et al. (2018) ^a
100	3,75 ^b	30 ^b	<i>Chlorella Sorokiniana</i>	Procesamiento industrial de alimentos	Gupta y Pawar (2018) ^a
95	0,68 ^b	22,60 ^b	<i>Scenedesmus sp.</i>	Curtiembre	Rosales et al. (2018)

^a Nitrógeno total

^b Calculado con datos suministrados

En la Figura 5.6 se puede observar que para los tratamientos T₁A y T₁B se produjo una reducción en la concentración de NAT en el día dos y se incrementó entre el día dos y cuatro, dicho comportamiento puede estar relacionado con el consumo de compuestos orgánicos, en la Figura 5.1 se puede observar que se produjo una rápida reducción de la DQO hasta el día cuatro, favoreciendo el incremento de la biomasa microalgal (sección 5.4) y por lo tanto la asimilación de nutrientes. Al respecto, Gupta y Pawar (2018) exponen que los porcentajes de reducción de nitrógeno se incrementan con la disponibilidad de fuentes de carbono fácilmente asimilables, alcanzando porcentajes de reducción superiores al 80% al suplementar agua residual procedente de digestión anaerobia con agua residual de una industria de alimentos. En el estudio de Zheng et al. (2018) solo el 19% del NAT fue removido en una mezcla de agua residual porcina e industria cervecera debido a la presencia de bajas concentraciones de nitrógeno residual e insuficiente fuente de carbono.

De igual forma, Yang et al. (2015) y Cheah et al. (2018) exponen que en el crecimiento mixotrófico la reducción de nutrientes se ve afectada por el suplemento de fuentes de carbono fácilmente asimilables, sin embargo, un suministro excesivo puede inhibir el crecimiento de la microalga por la presencia de compuestos orgánicos complejos, disminuyendo el porcentaje de reducción, tasa de consumo y consumo de nitrógeno y fósforo.

En ese sentido, en la Figura 5.6 se puede observar que a partir del día cuatro para los tratamientos T₁A y T₁B se produjo una lenta reducción del NAT hasta el final del periodo de cultivo, lo cual podría estar relacionado con la poca disponibilidad de fuentes de carbono fácilmente asimilables dado el rápido consumo de la DQO.

Para el caso del resto de tratamientos la concentración de nitrógeno se incrementó levemente hasta el día cuatro posteriormente disminuyó con tendencia a la estabilización lo cual se puede explicar por la poca de disponibilidad de nitrógeno en el medio, lo cual se ve reflejado en el consumo y tasa de consumo.

El comportamiento del NAT también se puede relacionar con el tipo de metabolismo mixotrófico, bajo esta condición el comportamiento heterótrofo y autótrofo pueden ocurrir simultáneamente o de manera independiente (Lin et al., 2015). Para el caso de T₁A y T₁B, la reducción de la concentración de nitrógeno hasta el día dos se relaciona con el crecimiento de biomasa bajo condiciones mixotróficas, aprovechando los procesos fotosintéticos y el consumo de materia orgánica. Sin embargo, el aumento entre el día dos y cuatro pudo estar relacionado con una tendencia al metabolismo heterótrofo debido al bajo rendimiento del crecimiento de biomasa, al respecto, Ge et al. (2018) al estudiar los efectos del tipo de cultivo en la reducción de nutrientes y crecimiento de biomasa, exponen que en condiciones heterotróficas las concentraciones de nutrientes aumentan ligeramente en los primeros días de cultivo, probablemente por la liberación de material intracelular de células muertas debido al bajo rendimiento del crecimiento de biomasa.

Asimismo, los autores exponen que en el crecimiento mixotrófico a pesar de la ausencia de nutrientes en el medio, se puede presentar una producción continua de biomasa, debido probablemente a que se promueve de forma heterotrófica el crecimiento adicional de microalgas por medio de la utilización de nutrientes almacenados internamente cuando se presentan limitaciones de nitrógeno, lo cual podría explicar el comportamiento del resto de tratamientos evaluados en el presente estudio, ya que se pudo observar crecimiento (sección 5.4) a pesar de las bajas concentraciones de nitrógeno durante el periodo de cultivo.

Para el caso del pH, como ya había sido indicado en el ítem anterior, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos con la misma relación S/X, pero diferente nivel de pH, lo cual se corrobora en el análisis estadístico ($p > 0,05$). Es importante aclarar, que la diferencia en los valores del consumo y la tasa de consumo entre los tratamientos T₁A y T₁B, puede estar relacionada con la diferencia en la concentración inicial de nitrógeno para cada tratamiento

El aumento del nitrógeno también puede estar relacionado con el comportamiento del pH, a partir del día dos puede haber ocurrido una interconversión metabólica en la cual el NO_3^- es reducido a NH_4^+ por el efecto de la actividad fotosintética de las microalgas. Las formas de N: $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ son altamente dependientes de la temperatura y del pH. La formación de especies de $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ se encuentra en función del pH, concentraciones inferiores a 9,25 favorecen la formación de NH_4^+ y valores superiores a 9,25, ocasiona que el NH_3 (gas) predomine sobre el NH_4^+ (Beltrán, 2014). En el presente estudio el valor del pH en los días dos y cuatro fue menor a 9,25 en todos los tratamientos, lo que podría haber favorecido el aumento en la concentración de nitrógeno amoniacal.

5.4. Efecto del pH y la relación S/X en la reducción de Ortofosfatos

En la Figura 5.10 y Tabla 5.13 se exponen los resultados del comportamiento de la concentración de Ortofosfatos durante el montaje experimental. En los tratamientos T₁A y T₁B la concentración presentó una tendencia a disminuir durante el montaje experimental, sin embargo, no se presentó agotamiento al final del periodo de cultivo. Un caso similar se presentó en el tratamiento T₂A, sin embargo, entre el día cuatro y diez se pudo observar una tendencia a la estabilización, seguido de una disminución hasta el día trece. Para los tratamientos T₂B, T₃A y T₃B se evidenció un incremento de la concentración en el día cuatro, posteriormente los valores tendieron a disminuir hasta el final del periodo de cultivo.

Tabla 5.13. Valores de Ortofosfatos durante el proceso experimental

Valores de Ortofosfatos (mgL ⁻¹)						
Tratamientos						
Día	T ₁ A	T ₁ B	T ₂ A	T ₂ B	T ₃ A	T ₃ B
0	19,05±2,23	20,71±1,43	8,78±0,35	6,40±1,13	3,60±0,57	3,94±1,58
4	11,89±1,06	11,22±1,31	6,64±1,35	7,87±0,81	5,99±0,50	6,07±0,48
6	10,83±1,24	10,03±1,56	7,11±0,76	6,99±0,72	4,96±0,088	4,82±0,59
8	8,58±0,84	9,12±0,85	6,41±0,19	5,01±0,70	2,96±0,17	3,64±0,39
10	8,45±0,88	7,30±0,30	6,44±0,58	5,54±0,43	3,70±0,67	3,79±0,59
13	4,00±2,05	3,01±0,54	0,45±0,21	0,30±0,00	0,30±0,00	0,30±0,00

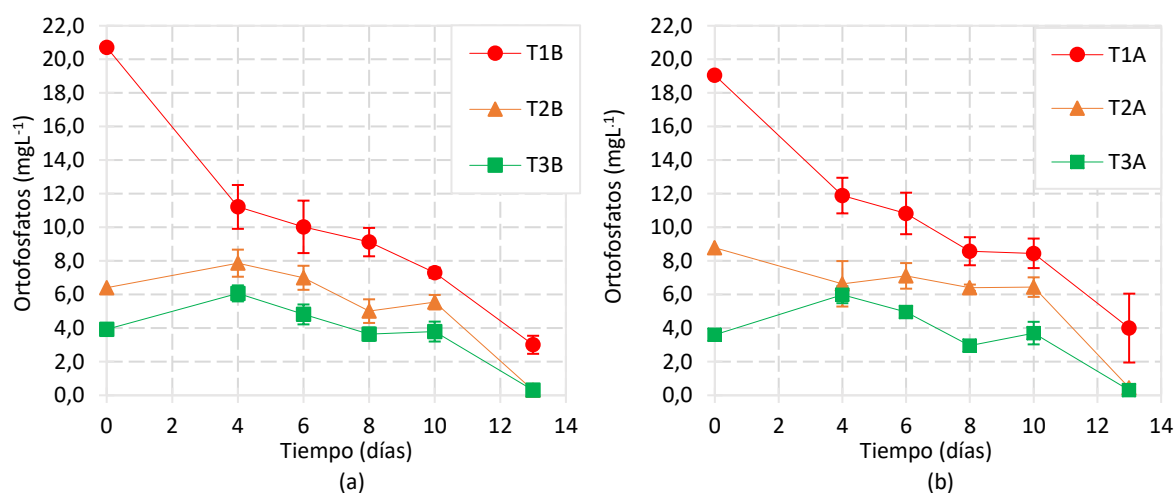


Figura 5.10. Comportamiento de la concentración de Ortofosfatos durante el proceso experimental. (a) nivel 2 de pH (7,5); (b) nivel 1 de pH (6,5)

Para analizar la influencia de los factores evaluados (pH y relación S/X) en la reducción de ortofosfatos, se determinó el porcentaje de reducción (Ecuación 6), tasa de consumo (Ecuación 9) y consumo (Ecuación 12) variables que permiten evaluar y comparar el rendimiento de cada tratamiento.

En la Tabla 5.14 y la Figura 5.11 se presentan los valores y el comportamiento del porcentaje de reducción de Ortofosfatos para cada tratamiento durante los trece días de montaje, los cuales se encontraron en un rango de 78,94 y 95,22 %. Los porcentajes más altos se alcanzaron en los tratamientos T₂A y T₂B con valores de 94,88 ± 2,67 y 95,22 ± 0,79% respectivamente, mientras que los valores más bajos se alcanzaron en los tratamientos (T₁A y T₁B) con valores de 78,94 ± 10,55 y 85,46 ± 2,55 % respectivamente.

En este caso, es importante destacar que los porcentajes más bajos pueden estar relacionados con la disponibilidad del nutriente, el cual presentaba mayor concentración inicial en T₁A y T₁B en comparación con el resto de los tratamientos; en ese sentido, la tasa de consumo y el consumo permiten determinar de una forma más adecuada la eficiencia de los tratamientos.

Tabla 5.14. Porcentaje de reducción de Ortofosfatos durante el proceso experimental

Tratamiento	Porcentaje de reducción (%)	Desviación estándar
T ₁ A	78,94	10,55
T ₁ B	85,46	2,55
T ₂ A	94,88	2,67
T ₂ B	95,22	0,79
T ₃ A	91,52	1,46
T ₃ B	91,42	3,70

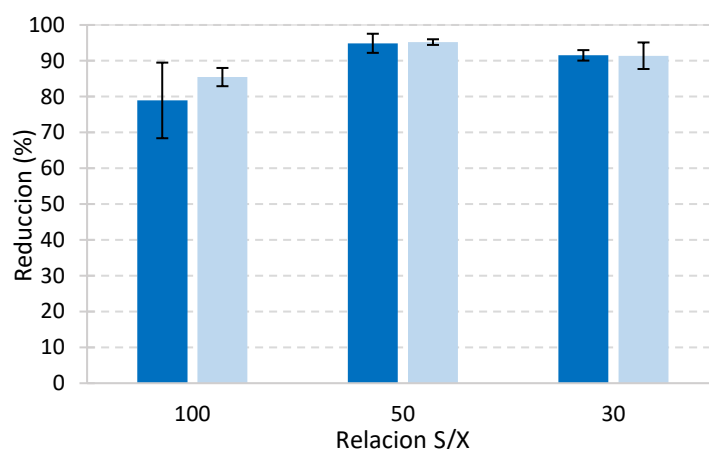


Figura 5.11. Porcentaje de reducción de Ortofosfatos durante el proceso experimental
pH (■) nivel 1 y (□) nivel 2

En la Tabla 5.15 y Figura 5.12 se presentan los valores y el comportamiento del consumo de Ortofosfatos durante los trece días de montaje. El mayor consumo se alcanzó en los tratamientos con la máxima relación S/X (T₁A y T₁B) con valores de $15,05 \pm 2,67$ y $17,70 \pm 1,44$ mgL⁻¹ respectivamente, mientras que las cantidades más bajas se obtuvieron en los tratamientos (T₃A y T₃B) con valores de $3,30 \pm 0,57$ y $3,64 \pm 1,58$ mgL⁻¹ respectivamente.

Tabla 5.15. Consumo de Ortofosfatos

Tratamiento	Consumo (mgL ⁻¹)	Desviación estándar
T ₁ A	15,05	2,67
T ₁ B	17,70	1,44
T ₂ A	8,34	0,54
T ₂ B	6,10	1,13
T ₃ A	3,30	0,57
T ₃ B	3,64	1,58

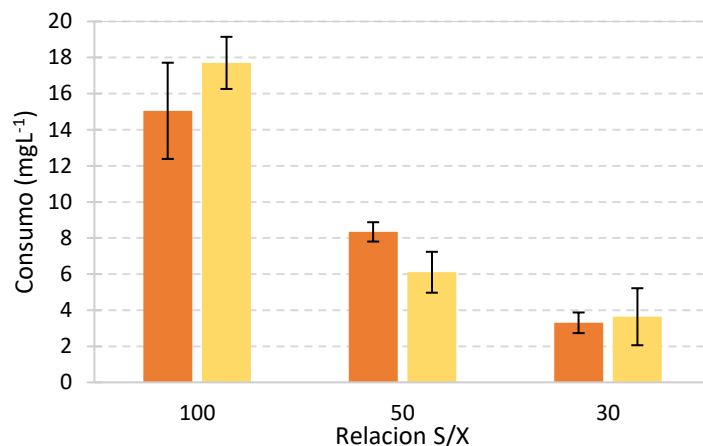


Figura 5.12. Consumo de Ortofosfatos durante el proceso experimental
pH (■) nivel 1 y (■) nivel 2

En la Figura 5.13 y Tabla 5.16 se presentan los valores y el comportamiento de la tasa de consumo de Ortofosfatos durante los trece días de montaje. La mayor tasa de consumo se alcanzó en los tratamientos con la máxima relación S/X (T₁A y T₁B) con valores de $1,16 \pm 0,21$ y $1,36 \pm 0,11$ mgL⁻¹d⁻¹ respectivamente, mientras que las tasas más bajas se obtuvieron en los tratamientos (T₃A y T₃B) con valores de $0,25 \pm 0,044$ y $0,28 \pm 0,12$ mgL⁻¹d⁻¹ respectivamente.

Tabla 5.16. Tasa de Consumo de Ortofosfatos

Tratamiento	Tasa de consumo (mgL ⁻¹ d ⁻¹)	Desviación estándar
T ₁ A	1,16	0,21
T ₁ B	1,36	0,11
T ₂ A	0,64	0,041
T ₂ B	0,47	0,087
T ₃ A	0,25	0,044
T ₃ B	0,28	0,12

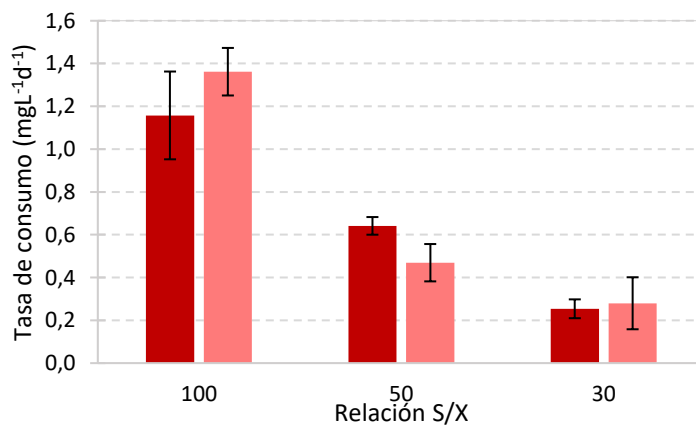


Figura 5.13. Tasa de consumo de Ortofosfatos durante el proceso experimental
pH (■) nivel 1 y (■) nivel 2

En la Tabla 5.17 se muestran valores de porcentajes de reducción, consumo y tasas de consumo consultados en la literatura, para cultivos de microalgas en diferentes tipos de agua residual.

Tabla 5.17. Parámetros consultados en la literatura

Reducción (%)	Tasa de consumo (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	Consumo (mgL ⁻¹)	Microalga	Agua residual	Referencia
96	0,26 ^b	3,64 ^b	<i>Chlorella Vulgaris</i>	Agua residual artificial	Feng et al. (2011) ^a
74	0,18 ^b	3,7 ^b	<i>Chlorella Vulgaris</i>	Artificial	Hernández-Reyes et al. (2012)
100	2,03	16,24	<i>Chlorella sp.</i>	Granjas industria láctea	Lu et al. (2015) ^a
95,05	3,90 ^b	18,72 ^b	<i>Chlorella sp.</i>	Municipal	Cabral et al. (2017)
51,44	4,3 ^b	0,35 ^b	<i>Chlorella Vulgaris</i>	Porcina	Cao et al. (2018) ^a
100	0,085 ^b	1,7	<i>Chlorella Vulgaris</i>	Agua residual de lodo espesado	Ge et al. (2018)
54	1,29 ^b	10,33 ^b	<i>Chlorella Sorokiniana</i>	Procesamiento industrial de alimentos	Gupta y Pawar (2018) ^a
83	0,76 ^b	25,40 ^b	<i>Scenedesmus sp.</i>	Curtiembre	Rosales et al. (2018)

^a Fosforo total

^b Calculado con datos suministrados

Los porcentajes de reducción presentados en la Tabla 5.14 se encuentran entre los rangos consultados en la literatura (Tabla 5.17). Los tratamientos T₂A y T₂B alcanzaron porcentajes de reducción superiores al 94% siendo cercanos a los datos reportados por Feng et al. (2011) utilizando la microalga *C. vulgaris* y agua residual artificial. Por otro lado, los valores más bajos en términos de porcentaje de reducción alcanzados en los tratamientos T₁A y T₁B fueron superiores a los reportados por Cao et al. (2018) en los cuales se utilizó un tipo de agua residual agroindustrial y la microalga *C. vulgaris*.

Los valores del consumo en los tratamientos T₁A y T₁B fueron similares a los valores reportados en los estudios de Lu et al. (2015) y Cabral et al. (2017), utilizando el mismo género de microalga y concentraciones iniciales similares, sin embargo, la diferencia en la duración de periodo de cultivo se ve reflejado en los valores de la tasa de consumo. La variación que se presenta en los valores depende como se citó previamente en la disponibilidad del nutriente y las condiciones para su fácil asimilación.

En la Figura 5.10 se puede observar que la relación S/X incidió en la concentración inicial de los Ortofosfatos, pues a mayor dilución del sustrato la disponibilidad de fósforo disminuyó. Asimismo, el incremento que se presentó hasta el día cuatro en los tratamientos T₂B, T₃B y T₃A, puede estar relacionado con el comportamiento de la biomasa (sección 5.4) pues al inicio del proceso se pueden presentar condiciones inhibitorias que afectan crecimiento de biomasa, como la adaptación al sustrato, limitación de nitrógeno e incremento del pH, lo que puede provocar liberación de material extracelular de células muertas (Lu et al., 2015, Ge et al., 2018)

Entre los días cuatro y seis se puede observar una lenta reducción de los Ortofosfatos, lo cual puede estar relacionado con la disponibilidad de fuentes de carbono orgánico, pues como se pudo observar en la sección 5.2, la DQO disminuyó rápidamente hasta día cuatro de cultivo. Al respecto Honyang et al. (2011) exponen que la presencia de altas concentraciones de carbono orgánico fácilmente asimilable por las microalgas, contribuye significativamente en la tasa de reducción de nutrientes.

Asimismo, la tasa de reducción de fósforo disminuye cuando se presenta limitación de nitrógeno en el sustrato, tal como sucede en el presente caso de estudio, por el contrario, la tasa de reducción de nitrógeno es independiente de la concentración de fósforo en el medio (Beuckles et al., 2015).

Li et al. (2019b) exponen que una adecuada relación nitrógeno – fósforo (N/P) en el medio permite optimizar el crecimiento y la reducción de nutrientes, al respecto dicho valor puede variar de 4/1 a casi 40/1, y entre 6,8 a 10,0 se demuestra como el rango óptimo, una relación N/P más alta que la óptima podría causar la limitación de fósforo, mientras que más baja conduciría a la limitación de nitrógeno, por lo que el bajo contenido de nitrógeno en el sustrato limitaría la capacidad de absorción de fósforo de las microalgas. En el presente caso de estudio se presentó una relación de 0,11/1 (N/P<1), lo que indica que no se contó con una relación óptima dada la limitación del nitrógeno.

Otro factor que permite explicar el comportamiento de los ortofosfatos entre los días cuatro y seis es la condición de crecimiento mixotrófico, tal como se explicó en la Sección 5.3.1, dado que pueden ocurrir simultáneamente crecimiento heterótrofo y autótrofo, Ge et al. (2018) exponen que en condiciones heterotróficas las concentraciones de nutrientes aumentan ligeramente en los primeros días de cultivo, probablemente por la liberación de material intracelular de células muertas debido al bajo rendimiento del crecimiento de biomasa.

En términos generales, se pudo observar que a mayor relación S/X se presentaron mayores valores para el consumo y tasa de consumo de Ortofosfatos. En el caso del porcentaje de reducción como se explicó previamente, la mayor concentración de fósforo al comienzo del proceso experimental se vio reflejado en el resultado, sin embargo, al complementar dicho parámetro con el comportamiento del consumo y tasa de consumo se pueden seleccionar los tratamientos con mejor desempeño. Con el análisis estadístico ($p<0,05$) se corrobora que la relación S/X genera un efecto significativo en el comportamiento de los Ortofosfatos.

En el estudio de Lu et al. (2015) al variar la concentración de sustrato, se alcanzó el menor porcentaje de reducción (65,33 %) en el tratamiento que presentaba la mayor relación S/X, sin embargo, la tasa de consumo fue la más alta ($2,74 \text{ mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$) en comparación con el resto de los tratamientos, indicando que una mayor concentración de fósforo en el sustrato ayudaría a acelerar la eficiencia de reducción. Esto explicaría la continua disminución de Ortofosfatos en T₁A y T₁B, maximizando el consumo y la tasa de consumo en comparación con el resto de tratamientos, en los cuales se presentó una menor concentración inicial de Ortofosfatos.

Para el caso del pH se puede observar que no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos con la misma relación S/X, ($p>0,05$). Sin embargo, para el consumo y la tasa de consumo en los tratamientos T₁A y T₁B se presentaron diferencias en las cantidades respectivas, tal como se citó previamente se puede explicar por la disponibilidad inicial de Ortofosfatos en el medio.

El comportamiento del pH cuando no se realiza control, tiende a incrementarse durante el periodo de cultivo, lo que podría explicar que no se observen diferencias significativas entre los tratamientos con los diferentes niveles evaluados (Cho et al., 2015, Turon et al., 2016).

La disponibilidad del fósforo también se ve afectada por el comportamiento del pH. De acuerdo con de Godos et al. (2009) la reducción de la concentración de fósforo en sistemas biológicos puede llevarse a cabo por asimilación biótica relacionado con microorganismos y precipitación abiótica de ortofosfatos debido a altos niveles de pH en el medio (9,0 -11,0).

Kumar et al. (2010) exponen que cuando el pH es superior a 10,0 se puede producir una eliminación fisicoquímica, promoviendo formación de compuestos como magnesio, calcio, carbonato y fosfato.

En el presente caso de estudio se podría descartar la influencia de reducción de Ortofosfatos por precipitación, dado que los valores del pH en los tratamientos durante el periodo de cultivo fueron menores a 9,0 unidades. En los tratamientos T₁A y T₁B se presentó una excepción entre los días siete y ocho, alcanzando valores de $9,20 \pm 0,075$ y $9,18 \pm 0,11$ respectivamente, lo que podría indicar que, en ese lapso, se pudo presentar de manera adicional a la reducción llevada a cabo por las microalgas, precipitación de Ortofosfatos.

5.5. Evaluación del crecimiento de biomasa

En la Figura 5.14 y Tabla 5.17 se exponen los resultados del comportamiento del crecimiento de biomasa durante el montaje experimental.

Para cada uno de los tratamientos no fue posible evidenciar las cinco fases de crecimiento teóricas expuestas en la Sección 3.7. El comportamiento general consistió en un incremento hasta el día dos y posterior decrecimiento hasta el día seis (T₁A, T₁B, T₂B, T₃B), para el caso de T₂A y T₃A se presentó crecimiento hasta el día cuatro y luego decrecimiento hasta el día seis. Se supone que hasta el día seis se extendió la fase de adaptación, ya que no se pudo observar una tendencia al incremento de biomasa, que pudiera indicar el inicio de la fase exponencial. A partir del día seis se alcanza la fase exponencial, sin embargo, no es posible evidenciar el inicio de la fase estacionaria.

Tabla 5.17. Valores del crecimiento de biomasa durante el proceso experimental

Valores de crecimiento de biomasa (gL ⁻¹)						
Tratamientos						
Día	T ₁ A	T ₁ B	T ₂ A	T ₂ B	T ₃ A	T ₃ B
0	0,38±0,014	0,30±0,042	0,18±0,014	0,19±0,024	0,13±0,020	0,17±0,025
2	0,55±0,12	0,86±0,10	0,31±0,071	0,69±0,24	0,17±0,049	0,24±0,042
4	0,35±0,093	0,78±0,10	0,40±0,094	0,44±0,11	0,46±0,11	0,20±0,030
6	0,30±0,053	0,43±0,069	0,31±0,058	0,28±0,047	0,15±0,071	0,11±0,0056
8	0,56±0,080	0,77±0,042	0,55±0,064	0,48±0,092	0,34±0,061	0,35±0,068
10	0,60±0,061	0,89±0,10	0,48±0,00	0,62±0,11	0,35±0,015	0,36±0,046
13	0,70±0,21	1,29±0,69	0,63±0,061	0,70±0,32	0,54±0,00	0,46±0,26

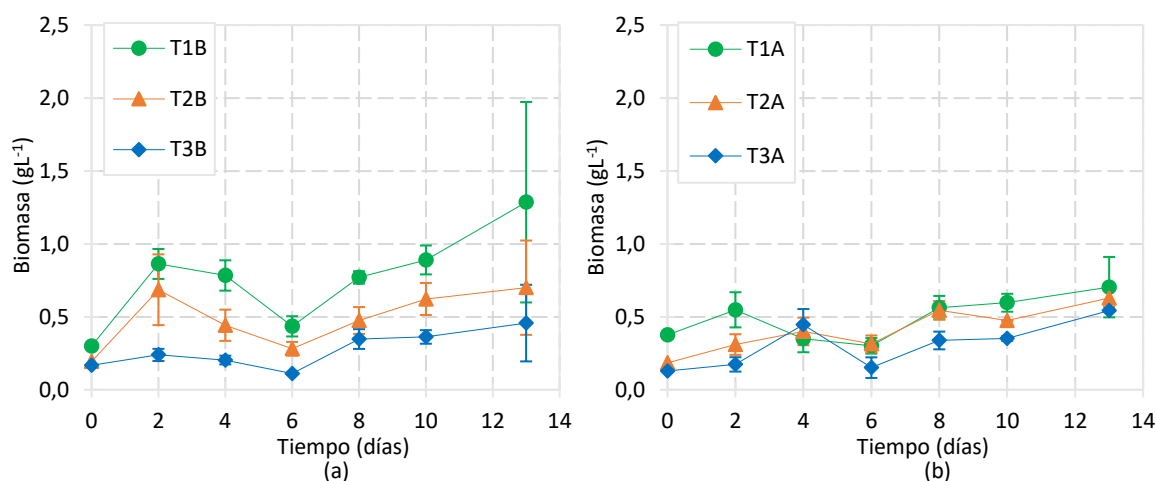


Figura 5.14. Comportamiento de la concentración de biomasa durante el proceso experimental
(a) nivel 2 de pH (7,5); (b) nivel 1 de pH (6,5)

Los tratamientos T₂B y T₃B exhiben tendencia a alcanzar la fase estacionaria al final del periodo de cultivo. Por su parte, los tratamientos T₁A y T₁B presentan un comportamiento característico de la fase exponencial, desde el día seis hasta el final del periodo de cultivo.

Es importante destacar que los datos al final del periodo de cultivo para los tratamientos T₁B, T₂B, T₃B y T₁A presentaron alta variabilidad, tal como se corrobora en el análisis estadístico. En ese sentido, no hay certeza de que los tratamientos se encuentren próximos a alcanzar la fase estacionaria, se asume de acuerdo con el comportamiento de los datos, que se encuentran en la fase exponencial.

Las variaciones en los datos pueden estar relacionadas con el número de réplicas utilizadas, ya que la medición de concentración de biomasa (peso seco) para cada tratamiento, se llevó a cabo utilizando solo una réplica, en comparación con las mediciones de DQO, NAT, Orotofosfatos, en las cuales se usaron dos replicas.

Durante el periodo de cultivo se pudo observar un cambio en la coloración de los reactores, de verde - amarillo a verde – lima, lo que podría indicar un aumento en la concentración de biomasa característico de la fase exponencial. En la Figura 5.15 se puede observar la comparación de coloración en los reactores al inicio y final del periodo de cultivo

En la Tabla 5.18 y la Figura 5.16 se presentan los valores y el comportamiento de la productividad de biomasa para cada tratamiento durante los trece días de montaje. Los mayores valores de productividad se alcanzaron en los tratamientos T₁B y T₂B con valores de $0,076 \pm 0,048$ y $0,039 \pm 0,024$ gL⁻¹d⁻¹ respectivamente, mientras que los valores más bajos se alcanzaron en los tratamientos T₁A y T₃B con valores de $0,025 \pm 0,016$ y $0,022 \pm 0,022$ gL⁻¹d⁻¹ respectivamente.



(a)



(b)

Figura 5.15. Variación de color en los reactores del montaje experimental
(a) Reactores al inicio del periodo de cultivo; (b) Reactores al final del periodo de cultivo

Tabla 5.18. Productividad de biomasa durante el proceso experimental

Tratamiento	Productividad (gL ⁻¹ d ⁻¹)	Desviación estándar
T ₁ A	0,025	0,016
T ₁ B	0,076	0,048
T ₂ A	0,034	0,0050
T ₂ B	0,039	0,024
T ₃ A	0,032	0,00073
T ₃ B	0,022	0,022

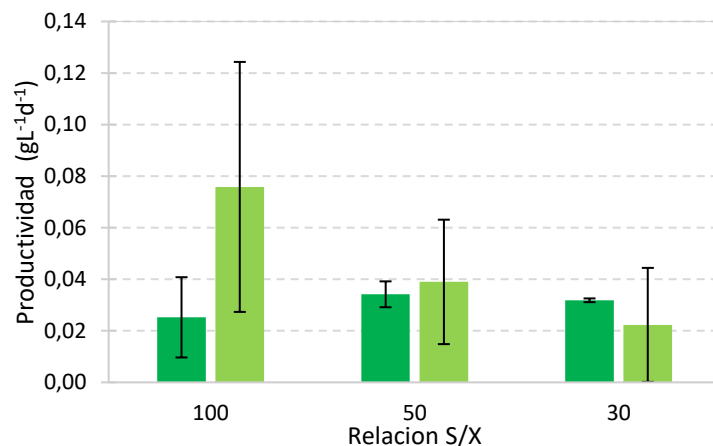


Figura 5.16. Productividad de Biomasa durante el proceso experimental
pH (■) nivel 1 y (■) nivel 2

En la Tabla 5.19 y la Figura 5.17 se presentan los valores y el comportamiento de la biomasa máxima (B_{max}) para cada tratamiento durante los trece días de montaje. Los mayores valores de B_{max} se alcanzaron en los tratamientos T₁A y T₁B con valores de $0,704 \pm 0,21$ y $1,29 \pm 0,69$ gL⁻¹ respectivamente, mientras que los valores más bajos se alcanzaron en los tratamientos (T₃A y T₃B) con valores de $0,54 \pm 0,00$ y $0,46 \pm 0,26$ gL⁻¹ respectivamente. Los valores más altos de B_{max} se alcanzaron al final del periodo de cultivo.

Tabla 5.19. Biomasa máxima obtenida durante el proceso experimental

Tratamiento	Biomasa máxima (gL ⁻¹)	Desviación estándar
T ₁ A	0,704	0,21
T ₁ B	1,29	0,69
T ₂ A	0,63	0,061
T ₂ B	0,70	0,32
T ₃ A	0,54	0,00
T ₃ B	0,46	0,26

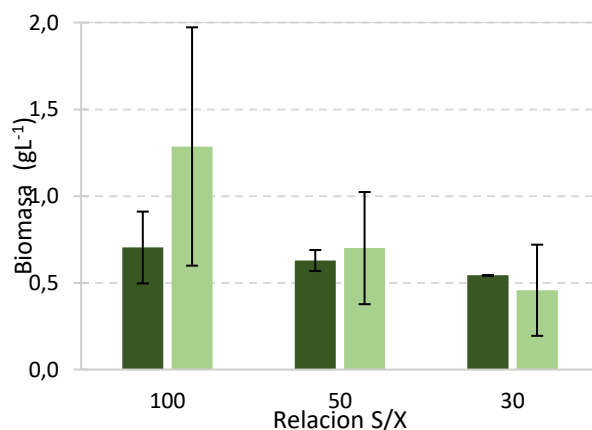


Figura 5.17. Biomasa máxima obtenida durante el proceso experimental
pH (■) nivel 1 y (■) nivel 2

A modo de comparación, en la Tabla 5.20 se muestran valores de productividad y B_{max} consultados en la literatura para cultivos de microalgas en diferentes tipos de agua residual.

Tabla 5.20. Parámetros consultados en la literatura

Productividad (g L ⁻¹ d ⁻¹)	Biomasa Máxima (g L ⁻¹)	Microalga	Agua residual	Referencia
0,0014 ^b	0,01	<i>Chlorella</i>	BG11 + Glucosa	Bhatnagar et al. (2011)
0,19 ^b	1,37	<i>Minutissima</i>	Industria de alfombras	
0,24	1,72	<i>Chlorella</i> <i>Vulgaris</i>	Agua residual artificial	Feng et al. (2011)
0,76	2,15	<i>Chlorella</i> <i>Pyrenoidosa</i>	Procesamiento de soya	Hongyang et al. (2011)
0,14	1,13	<i>Chlorella</i> <i>Vulgaris</i>	Agua residual municipal	Ebrahimian et al. (2014)
0,26	2,25	<i>Chlorella</i> sp.	Granjas industria láctea	Lu et al. (2015)
0,43	3,01	<i>Chlorella</i> <i>Pyrenoidosa</i>	Almidón digestado y alcohol	Yang et al. (2015)
0,11	2,23	<i>Chlorella</i> <i>Pyrenoidosa</i>	Lodo activado digestado	Tan et al. (2016)
1,93 ^b	0,72	<i>Chlorella</i> <i>Vulgaris</i>	Agua residual de lodo espesado	Ge et al. (2018)
0,048	0,54	<i>Chlorella</i> <i>Vulgaris</i>	Industria cervecera	Zheng et al. (2018)
0,071	0,85	<i>Desmodesmus</i> <i>armatus</i>	Procesamiento de Yuca hidrolizada + BBM	Okpozu et al. (2019)

^b Calculado con datos suministrados

El comportamiento del crecimiento de biomasa expuesto en la Figura 5.14, especialmente hasta el día seis, se puede relacionar con la limitación de nitrógeno. En ese sentido, Lin et al. (2015) exponen que, bajo condiciones de limitación de nitrógeno, la síntesis de las proteínas y ácidos nucleicos disminuye, por lo tanto, la división celular y el crecimiento se ve restringido, destinando la mayoría del carbono asimilado a la producción y almacenamiento de materiales resistentes al estrés, como lípidos y almidón. Lo cual podría explicar el rápido consumo de DQO durante el periodo de cultivo, como una medida preventiva mientras persiste la condición de estrés.

Si bien, se presentó una tendencia a la disminución de la concentración de biomasa en los primeros seis días, el posterior crecimiento en la fase exponencial podría estar relacionado con el crecimiento mixotrófico, Ge et al. (2018) e Ikarán et al. (2015) exponen que, a pesar de la ausencia de nutrientes en el medio, se puede presentar una producción continua de biomasa, debido a que se promueve de forma heterotrófica el crecimiento adicional de microalgas, como resultado de la utilización de nutrientes almacenados internamente cuando se presenta limitación de nitrógeno.

Bajo condiciones de limitación o ayuno de nutrientes, la microalga rápidamente cambia su metabolismo de la síntesis de proteínas a almidón. El almidón acumulado en las células

provee energía para su posterior crecimiento cuando las condiciones sean restauradas. Sin embargo, el ayuno genera un crecimiento desbalanceado que puede causar la muerte de la microalga. Además, la respuesta fisiológica de diferentes especies de microalgas al ayuno difiere y también varía de minutos a días. En el estudio de Choix (2014) se expone que en condiciones de ayuno de nutrientes, *C. Vulgaris* no pudo recobrar su densidad celular incluso cuando la concentración de nutrientes del medio de cultivo fue restablecida. Lo anterior podría explicar los bajos rendimientos obtenidos en el presente estudio, al final del periodo de cultivo.

Los valores de productividad y B_{max} presentados en la Tabla 5.18 y Tabla 5.19 se encuentran en los rangos reportados en la literatura (Tabla 5.20). Los valores más altos de productividad de biomasa alcanzados por los tratamientos T₁B y T₂B fueron inferiores a los valores reportados en los estudios de Hongyang et al. (2011) y Lu et al. (2015), en los cuales se utilizó un tipo de agua residual agroindustrial y el mismo género de microalga. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el crecimiento se presentó bajo diferentes condiciones, como características de sustrato, condiciones de cultivo y tipo de microalga. El mismo comportamiento se presentó en la B_{max} , los valores más altos alcanzados en los tratamientos T₁B y T₁A fueron inferiores, indicando un menor rendimiento. Asimismo, el tiempo para alcanzar la B_{max} fue mayor (13 días) en comparación con los estudios citados, en los cuales se alcanzó la B_{max} en 8 y 5 días respectivamente. Tan et al. (2016) indican que la B_{max} y productividad de biomasa son parámetros importantes para determinar los costos asociados con el cultivo de microalgas, por lo tanto, el objetivo es maximizar el crecimiento de biomasa en un periodo menor.

Al comparar los resultados obtenidos en este estudio con lo reportado por Okpozu et al. (2019), quienes usaron agua residual hidrolizada del procesamiento de yuca, suplementada con Medio Basal Bold y la microalga *Desmodesmus armatus*, se tiene que en el tratamiento T₁B se alcanzaron valores de productividad y B_{max} superiores. Si bien, la carga orgánica de los sustratos difiere, al igual que la microalga utilizada, se podría concluir que los resultados de crecimiento de biomasa obtenidos en el presente caso de estudio exhibieron un comportamiento adecuado, teniendo en cuenta que se alcanzaron valores de productividad y B_{max} superiores utilizando un sustrato con mayor carga orgánica y limitación de nutrientes.

Los resultados muestran que al variar la relación S/X, no se presentaron diferencias significativas en los valores de la productividad y B_{max} , con excepción del tratamiento T₁B, en el cual se alcanzaron los valores máximos. Lo anterior indica que la relación S/X no genera un efecto significativo sobre los parámetros evaluados, sin embargo, este comportamiento se puede relacionar con la limitación del crecimiento causado por el bajo suplemento de nitrógeno, lo que conlleva a un rápido consumo de la DQO, e incremento en el tiempo requerido para alcanzar la B_{max} .

En el estudio de Lin et al. (2015) al incrementar la concentración de sacarosa se inhibió el crecimiento de *Chlorella sp.*, en un periodo considerable, es decir que se incrementó el tiempo de duración de la fase de adaptación. De acuerdo con esto, si bien en el presente estudio, las fluctuaciones y rendimiento en el crecimiento se atribuyen principalmente a la condición de limitación de nitrógeno, no se puede descartar el periodo de adaptación de las microalgas a las características del sustrato, como su elevada carga orgánica y posible presencia de compuestos inhibitorios, dando como resultado el incremento del tiempo requerido para alcanzar la biomasa máxima, así como la disminución de la productividad (Turon et al., 2015).

Sin embargo, el rápido consumo de la DQO puede indicar la presencia de fuentes de carbono fácilmente asimilables en el sustrato, condición que en el presente estudio podría considerarse favorable, ya que permitiría un mayor aprovechamiento en los procesos metabólicos bajo condiciones de estrés.

Para el caso del pH, se observa (Figura 5.16 y Figura 5.17) un comportamiento similar en los valores de la productividad y B_{max} entre los tratamientos a diferente nivel de pH, a excepción del tratamiento T₁B, lo cual se puede explicar por el incremento del pH durante el periodo de cultivo.

Si bien, no se observa un efecto significativo debido al comportamiento del pH, se debe tener en cuenta que el incremento en los valores de pH puede generar un efecto negativo en el crecimiento de biomasa. Ebrahimian et al. (2014) exponen que la producción de biomasa decrece al presentarse un incremento del pH a un valor cercano de 10,0. Por su parte, Zheng et al. (2018) al evaluar el crecimiento de *C. vulgaris* en un agua residual de origen porcino a diferentes valores de pH (7,0, 8,0 y 9,0), concluyeron que a medida que se incrementaba dicha variable se presentaba una reducción del crecimiento microalgal, relacionado con una reducción en la eficiencia fotosintética.

Entre los días dos y diez (Figura 5.5 y Tabla 5.7), los valores del pH fueron superiores a 8,0 por lo que se pudo haber afectado el crecimiento microalgal.

Cao et al. (2018) exponen que la acidificación del medio de cultivo con valores de 4,0, 5,0 y 6,0 de pH estimulan el crecimiento de biomasa inhibiendo la actividad microbiana y aumentando la disponibilidad de CO₂ que puede ser asimilado por el metabolismo autótrofo.

Por lo anterior, se puede afirmar que la disminución del pH al final del periodo de cultivo pudo estar relacionado con el incremento de biomasa microalgal que se produjo a partir del día seis, dado que el crecimiento se pudo haber sustentado por los materiales almacenados en condiciones de estrés, es posible que se presentara mayor disponibilidad de CO₂, favoreciendo la disminución del pH.

En el estudio de Tan et al. (2016) se llevó a cabo el cultivo de *C. pyrenoidosa* en un agua residual de lodo digestado anaeróbiamente, estudiando la influencia del pH en la B_{max} y productividad. Al incrementar el valor de pH en 8,3 y 8,8, la B_{max} presentaba una disminución aproximada del 28,73, 38,19 y 60,5% en primavera, otoño y verano respectivamente, mientras que la productividad de biomasa presentaba una reducción de 67,15, 54,39 y 83,63 % en primavera, otoño y verano.

En ese sentido, es posible que los valores para la B_{max} y productividad se hallan visto disminuidos por el efecto del incremento del pH. Asimismo, el tiempo para alcanzar la B_{max} se incrementó lo cual significa un aumento en los costos de operación y disminución en el potencial de la tecnología para su aplicación.

5.6. Análisis estadístico

5.6.1. Análisis exploratorio

Para cada uno de los parámetros analizados, se llevó a cabo un análisis exploratorio con el fin de definir los aspectos más significativos asociados con los datos de manera preliminar, los cuales se probaron eventualmente mediante métodos formales (ANOVA y comparación de medias).

Reducción, consumo y tasa de consumo de DQO

En la Tabla 5.21 se exponen los datos del análisis exploratorio realizado para evaluar la reducción de DQO.

Tabla 5.21. Análisis exploratorio para la reducción de DQO

Tratamiento	x_{min} (%)	x_{max} (%)	$\bar{x} \pm \sigma$ (%)	Me (%)	C_v (%)
T ₁ A	93,65	94,85	94,31 $\pm$ 0,61	94,42	0,65
T ₁ B	92,81	95,09	94,27 $\pm$ 1,26	94,92	1,34
T ₂ A	85,43	90,40	88,50 $\pm$ 2,68	89,65	3,027
T ₂ B	85,48	91,58	88,87 $\pm$ 3,11	89,55	3,50
T ₃ A	79,46	85,17	82,98 $\pm$ 3,08	84,33	3,72
T ₃ B	78,28	88,50	81,86 $\pm$ 5,75	78,81	7,03

De los resultados contenidos en la Tabla 5.21 se puede observar que los tratamientos que generaron la mayor reducción media fueron T₁A y T₁B con valores de 94,31 y 94,27 % y coeficientes de variación de 0,65 y el 1,34 % respectivamente. Los tratamientos con menores porcentajes de reducción fueron T₃A y el T₃B con una reducción media de 82,98% y 81,86% y coeficientes de variación de 3,72% y 7,03% respectivamente.

Se debe aclarar que el coeficiente de variación (C_v) es la desviación estándar expresada como porcentaje de la media aritmética, es una medida de la variabilidad porcentual asociada con la medición de una variable específica a partir de la cual, se puede juzgar el procedimiento experimental asociado. Respecto a cuan permisible es la variabilidad asociada a una variable, no existe una regla formal que permita definirla. No obstante, se suele asumir como valor óptimo un coeficiente de variación menor o igual al 10%, aceptable entre 11 y 20 % y mayor al 20% indica que se debe tener especial cuidado con los resultados; estos deberían usarse entonces para fines descriptivos, no para interpolar o decidir sobre posibles tendencias (Rodríguez et al., 1991, Departamento Administrativo Nacional de Estadística, 2008, Gordón-Mendoza y Camargo-Buitrago, 2015).

En el presente estudio, los coeficientes de variación se consideran pequeños (<10%) oscilando entre 0,65 y 7,03 %, además, a pesar de existir diferencias entre la reducción promedio para los tratamientos evaluados, estos parecen estar en una escala aproximadamente igual, por lo cual, sería apresurado escoger un mejor tratamiento sin aplicar una prueba de comparación.

Los resultados para el consumo de DQO se exponen en la Tabla 5.22.

Tabla 5.22. Análisis exploratorio para el consumo de DQO

Tratamiento	x_{min} (mgL ⁻¹)	x_{max} (mgL ⁻¹)	$\bar{x} \pm \sigma$ (mgL ⁻¹)	Me (mgL ⁻¹)	C_v (%)
T ₁ A	3.578,9	3.773,1	3.653,40 $\pm$ 104,70	3.608,11	2,87
T ₁ B	3.637,3	3.776,2	3.697,56 $\pm$ 71,24	3.679,22	1,93
T ₂ A	1.454,7	1.571,3	1.525,78 $\pm$ 62,40	1.551,33	4,09
T ₂ B	1.381,3	1.538,0	1.481,33 $\pm$ 86,86	1.524,7	5,86
T ₃ A	804,5	869,0	829,26 $\pm$ 34,75	814,29	4,19
T ₃ B	736,4	856,9	781,028 $\pm$ 66,046	749,81	8,46

Se puede observar que los tratamientos que generaron el mayor consumo fueron T₁A y T₁B con valores de 3.653,40 y 3.697,56 mgL⁻¹ respectivamente. Los tratamientos en los que se

presentó el menor consumo fueron T₃A y el T₃B con un consumo medio de 829,26 y 781,028 mgL⁻¹ respectivamente. Se resalta que los coeficientes de variación se consideran pequeños en todos los casos (<10%) oscilando entre 1,93 y 8,46 %, destacando que el máximo valor de coeficiente de variación se obtuvo en el tratamiento T₃B que presentó el peor desempeño en términos de consumo de DQO.

La tasa de consumo presentó un comportamiento similar al de reducción y consumo de DQO. Los resultados se muestran en la Tabla 5.23.

Tabla 5.23. Análisis exploratorio para la tasa de consumo de DQO

Tratamiento	x_{min} (mgL ⁻¹ d ⁻¹)	x_{max} (mgL ⁻¹ d ⁻¹)	$\bar{x} \pm \sigma$ (mgL ⁻¹ d ⁻¹)	Me (mgL ⁻¹ d ⁻¹)	C_v (%)
T ₁ A	275,30	290,24	281,03 ± 8,05	277,55	2,87
T ₁ B	279,79	290,47	284,43 ± 5,48	283,02	1,93
T ₂ A	111,90	120,87	117,37 ± 4,80	119,33	4,09
T ₂ B	106,26	118,31	113,95 ± 6,68	117,28	5,86
T ₃ A	61,88	66,84	63,79 ± 2,67	62,64	4,19
T ₃ B	56,64	65,92	60,08 ± 5,08	57,68	8,46

Se puede observar que los tratamientos que generaron la mayor tasa de consumo fueron T₁A y T₁B con valores de 281,03 y 284,43 mgL⁻¹d⁻¹ respectivamente. Los tratamientos con las tasas de consumo más bajas fueron T₃A y T₃B con valores medios de 63,79 y 60,08 mgL⁻¹d⁻¹ respectivamente.

Los coeficientes de variación se consideraron pequeños en todos los casos (<10%) oscilando entre 1,93 y 8,46 %, el coeficiente de variación más elevado se obtuvo en el tratamiento T₃B el cual presentó el peor desempeño en términos de la tasa de consumo de DQO. Asimismo, el tratamiento con el mejor desempeño (T₁B) obtuvo el coeficiente de variación más bajo. Es importante resaltar que la baja variabilidad en todos los casos podría ser reflejo de un adecuado control experimental.

En la Tabla 5.24 se exponen los datos del análisis exploratorio realizado para evaluar la reducción de nitrógeno.

Tabla 5.24. Análisis exploratorio para la reducción de nitrógeno

Tratamiento	x_{min} (%)	x_{max} (%)	$\bar{x} \pm \sigma$ (%)	Me (%)	C_v (%)
T ₁ A	96,014	98,085	97,22 ± 1,080	97,58	1,11
T ₁ B	97,51	98,78	98,24 ± 0,65	98,43	0,67
T ₂ A	74,26	87,69	83,20 ± 7,75	87,67	9,31
T ₂ B	69,12	84,63	77,65 ± 7,87	79,21	10,13
T ₃ A	41,50	79,20	62,30 ± 19,20	66,24	30,75
T ₃ B	72,84	77,19	75,08 ± 2,18	75,20	2,90

Para el porcentaje de reducción de nitrógeno, los tratamientos que generaron la mayor reducción media fueron T₁A y T₁B, con valores de 97,22 y 98,24 % respectivamente y coeficientes de variación asociados del 1,11 y 0,67 %, se destaca como en ambos casos se presentó una variación pequeña, la cual apenas superó el 1%. Por otro lado, los tratamientos que presentaron los porcentajes de reducción más bajos fueron T₃A y T₃B con valores de 62,30 y 75,08 % respectivamente y coeficientes de variación de 30,75 y 2,90 %. El control de la variabilidad en la mayoría de los casos pudo estar relacionado con

condiciones ambientales adecuadas, así como una buena disposición y aleatorización de los tratamientos.

En la Tabla 5.25 se exponen los datos del análisis exploratorio realizado para evaluar el consumo de nitrógeno.

Tabla 5.25. Análisis exploratorio para consumo de nitrógeno

Tratamiento	x_{min} (mgL ⁻¹)	x_{max} (mgL ⁻¹)	$\bar{x} \pm \sigma$ (mgL ⁻¹)	Me (mgL ⁻¹)	C_v (%)
T ₁ A	2,409	5,12	3,85 ± 1,36	4,032	35,43
T ₁ B	3,92	8,14	6,11 ± 2,12	6,27	34,64
T ₂ A	0,28	0,71	0,57 ± 0,24	0,71	42,81
T ₂ B	0,22	0,55	0,38 ± 0,16	0,38	42,42
T ₃ A	0,079	0,38	0,21 ± 0,15	0,19	72,22
T ₃ B	0,26	0,33	0,303 ± 0,035	0,303	11,59

Para el caso del consumo de nitrógeno, los mejores tratamientos fueron T₁A y T₁B, los cuales presentaron un consumo promedio de 3,85 y 6,11 mgL⁻¹ respectivamente y coeficientes de variación iguales a 35,43 y 34,64 %. Los tratamientos que presentaron el menor consumo de nitrógeno fueron T₃A y T₃B con valores de 0,21 y 0,303 mgL⁻¹ respectivamente y coeficientes de variación asociados del 72,22 y 11,59 %. Se debe aclarar que la variabilidad asociada con los mejores tratamientos se podría considerar alta, por lo cual, se deberá proceder con precaución al momento de elegir al que se considere óptimo entre los dos.

En la Tabla 5.26 se exponen los datos del análisis exploratorio realizado para evaluar la tasa de consumo de nitrógeno.

Tabla 5.26. Análisis exploratorio para la tasa de consumo de nitrógeno

Tratamiento	x_{min} (mgL ⁻¹ d ⁻¹)	x_{max} (mgL ⁻¹ d ⁻¹)	$\bar{x} \pm \sigma$ (mgL ⁻¹ d ⁻¹)	Me (mgL ⁻¹ d ⁻¹)	C_v (%)
T ₁ A	0,185	0,394	0,297 ± 0,105	0,31	35,43
T ₁ B	0,301	0,626	0,47 ± 0,16	0,48	34,64
T ₂ A	0,022	0,054	0,044 ± 0,018	0,055	42,81
T ₂ B	0,0172	0,0423	0,030 ± 0,012	0,029	42,42
T ₃ A	0,0054	0,0293	0,017 ± 0,012	0,015	72,24
T ₃ B	0,0206	0,0260	0,023 ± 0,0027	0,023	11,59

Los mejores tratamientos al igual que para el consumo de nitrógeno fueron T₁A y T₁B, con una tasa de consumo promedio de 0,297 y 0,470 mgL⁻¹d⁻¹ respectivamente. El coeficiente de variación para cada caso fue de 35,43 y 34,64%. Los tratamientos que presentaron los valores más bajos para la tasa de consumo fueron T₃A y T₃B, con una tasa de consumo promedio de 0,017 y 0,023 mgL⁻¹d⁻¹ y coeficiente de variación igual a 72,22 y 11,59% respectivamente.

En la Tabla 5.27 se presentan los datos del análisis exploratorio realizado para evaluar el porcentaje de reducción del fósforo.

Tabla 5.27. Análisis exploratorio para la reducción de fósforo

Tratamiento	x_{min} (%)	x_{max} (%)	$\bar{x} \pm \sigma$ (%)	Me (%)	C_v (%)
T ₁ A	72,16	91,09	78,94 $\pm$ 10,55	73,56	13,37
T ₁ B	82,76	87,81	85,45 $\pm$ 2,55	85,79	2,98
T ₂ A	91,98	97,22	94,88 $\pm$ 2,67	95,45	2,81
T ₂ B	94,55	96,092	95,22 $\pm$ 0,78	95,017	0,83
T ₃ A	89,84	92,57	91,51 $\pm$ 1,46	92,12	1,60
T ₃ B	87,34	94,57	91,42 $\pm$ 3,70	92,33	4,05

Los tratamientos que presentaron los mejores rendimientos fueron T₂A y T₂B, con porcentajes de reducción igual a 94,88 y 95,22 % respectivamente. Los coeficientes de variación fueron iguales a 2,81 y 0,83%. Los tratamientos con los rendimientos más bajos fueron T₁A y T₁B con una reducción promedio igual a 78,94 y 85,45 % para cada caso. Los coeficientes de variación fueron de 13,37 y 2,98 %.

En la Tabla 5.28 se presentan los datos del análisis exploratorio realizado para evaluar el consumo de fosforo.

Tabla 5.28. Análisis exploratorio para consumo de fósforo

Tratamiento	x_{min} (mgL ⁻¹)	x_{max} (mgL ⁻¹)	$\bar{x} \pm \sigma$ (mgL ⁻¹)	Me (mgL ⁻¹)	C_v (%)
T ₁ A	12,13	17,37	15,05 $\pm$ 2,67	15,65	17,72
T ₁ B	16,43	19,27	17,71 $\pm$ 1,44	17,41	8,16
T ₂ A	7,71	8,64	8,34 $\pm$ 0,54	8,65	6,43
T ₂ B	5,21	7,37	6,10 $\pm$ 1,13	5,72	18,58
T ₃ A	2,65	3,74	3,30 $\pm$ 0,57	3,51	17,31
T ₃ B	2,07	5,22	3,64 $\pm$ 1,58	3,61	43,44

En el consumo de fósforo, los tratamientos que presentaron los mejores rendimientos fueron T₁A y T₁B, con valores de 15,05 y 17,71 mgL⁻¹ respectivamente. Los coeficientes de variación fueron iguales a 17,72 y 8,16 %. Los tratamientos que presentaron los valores más bajos de consumo fueron T₃A y T₃B con valores de 3,30 y 3,64 mgL⁻¹ para cada caso. Los coeficientes de variación fueron de 17,31 y 43,44 %.

En la Tabla 5.29 se presentan los datos del análisis exploratorio realizado para evaluar la tasa de consumo de fosforo.

Tabla 5.29. Análisis exploratorio para la tasa de consumo de fósforo

Tratamiento	x_{min} (mgL ⁻¹ d ⁻¹)	x_{max} (mgL ⁻¹ d ⁻¹)	$\bar{x} \pm \sigma$ (mgL ⁻¹ d ⁻¹)	Me (mgL ⁻¹ d ⁻¹)	C_v (%)
T ₁ A	0,933	1,34	1,16 $\pm$ 0,205	1,204	17,72
T ₁ B	1,26	1,48	1,36 $\pm$ 0,11	1,34	8,16
T ₂ A	0,59	0,66	0,64 $\pm$ 0,041	0,67	6,43
T ₂ B	0,40	0,57	0,47 $\pm$ 0,087	0,44	18,58
T ₃ A	0,204	0,27	0,25 $\pm$ 0,044	0,27	17,31
T ₃ B	0,15	0,402	0,28 $\pm$ 0,12	0,28	43,44

La tasa de consumo presentó el mismo comportamiento que el consumo, los tratamientos que presentaron los mejores rendimientos fueron T₁A y T₁B, con valores de 1,16 y 1,36 mgL⁻¹d⁻¹ respectivamente. Los coeficientes de variación fueron iguales a 17,72 y 8,16 %. Los tratamientos que presentaron los valores más bajos de tasa consumo fueron T₃A y T₃B con valores de 0,25 y 0,28 mgL⁻¹d⁻¹ para cada caso. Los coeficientes de variación fueron de 17,31 y 43,44 %.

En la Tabla 5.30 se presentan los datos del análisis exploratorio realizado para evaluar la productividad de biomasa.

Tabla 5.30. Análisis exploratorio para la productividad de biomasa

Tratamiento	x_{min} (gL ⁻¹ d ⁻¹)	x_{max} (gL ⁻¹ d ⁻¹)	$\bar{x} \pm \sigma$ (gL ⁻¹ d ⁻¹)	Me (gL ⁻¹ d ⁻¹)	C_v (%)
T ₁ A	0,013	0,035	0,025 ± 0,015	0,025	63,19
T ₁ B	0,041	0,109	0,075 ± 0,048	0,075	64,38
T ₂ A	0,031	0,038	0,035 ± 0,0050	0,034	14,45
T ₂ B	0,022	0,057	0,040 ± 0,024	0,040	60,35
T ₃ A	0,0304	0,031	0,031 ± 0,00072	0,031	2,34
T ₃ B	0,0059	0,037	0,022 ± 0,022	0,022	102,77

Los tratamientos que presentaron los mejores valores de productividad de biomasa fueron T₁B y T₂B, con valores de 0,075 y 0,040 gL⁻¹d⁻¹ respectivamente. Los coeficientes de variación fueron iguales a 64,38 y 60,35 %. Los tratamientos que presentaron los valores más bajos de productividad de biomasa fueron T₁A y T₃B con valores de 0,025 y 0,022 gL⁻¹d⁻¹ para cada caso. Los coeficientes de variación fueron de 63,19 y 102,77 %.

Se aprecia como cuatro de los seis tratamientos presentaron una variabilidad considerada alta ($C_v > 20\%$) con coeficientes de variación en un rango de 60,35 a 102,77%, lo que puede indicar que existieron condiciones disímiles bajo las cuales se aplicaron los tratamientos en cuestión; lo que pudo estar relacionado con factores inherentes al proceso experimental, errores aleatorios o condiciones ambientales no controladas adecuadamente. Si es seleccionado T₁B como el mejor tratamiento, se debe proceder con precaución a la hora de extrapolar conclusiones o indagar sobre los motivos que llevaron a dicha variabilidad.

En la Tabla 5.31 se presentan los datos del análisis exploratorio realizado para evaluar la biomasa máxima.

Tabla 5.31. Análisis exploratorio para la biomasa máxima

Tratamiento	x_{min} (gL ⁻¹)	x_{max} (gL ⁻¹)	$\bar{x} \pm \sigma$ (gL ⁻¹)	Me (gL ⁻¹)	C_v (%)
T ₁ A	0,55	0,85	0,704 ± 0,20	0,70	29,43
T ₁ B	0,80	1,77	1,28 ± 0,68	1,28	53,42
T ₂ A	0,58	0,67	0,62 ± 0,060	0,62	9,64
T ₂ B	0,47	0,92	0,700 ± 0,32	0,70	46,17
T ₃ A	0,54	0,54	0,54 ± 0	0,54	0
T ₃ B	0,27	0,64	0,45 ± 0,26	0,45	57,45

Los tratamientos que presentaron los mayores valores de biomasa máxima fueron T₁A y T₁B, con valores de 0,704 y 1,28 gL⁻¹ respectivamente. Los coeficientes de variación fueron iguales a 29,43 y 53,42 %. Los tratamientos que presentaron los valores más bajos de productividad de biomasa fueron T₃A y T₃B con valores de 0,54 y 0,45 gL⁻¹ para cada caso. Los coeficientes de variación fueron iguales a 0 y 57,45 %. Los valores elevados en los coeficientes de variación también pueden estar relacionados con el número de replicas que se utilizaron para llevar a cabo el análisis, ya que al aumentar el número de replicas se aumenta la precisión en la estimación de las medias y se incrementa la precisión por medio de la reducción de errores estándar (Kuehl, 2001).

5.6.2. Análisis de Varianza y determinación de efectos más Significativos

Posterior al análisis exploratorio, es de interés conocer de manera formal que efectos fueron significativos para las variables respuesta; ya sea la relación S/X, el pH o su interacción. La técnica utilizada para este caso es el Análisis de Varianza o ANOVA, la regla de decisión consiste en rechazar la hipótesis nula de no significancia de los tratamientos si la probabilidad F calculada es menor al nivel de significancia fijado, que por lo general es del 5%, como en este caso. Si no se cumple que el valor calculado sea menor al nivel de significancia, no se rechaza la hipótesis y se dirá que los efectos evaluados no son significativos para la variable respuesta.

En la Tabla 5.32, Tabla 5.33, Tabla 5.34 y Tabla 5.35 se exponen los resultados del ANOVA para los datos evaluados.

Tabla 5.32. Análisis de varianza para el nitrógeno

Método	Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	p
Reducción	pH	1	33,81	33,81	0,534
	Relación S/X	2	2560,30	1280,15	0,000
	pH*Relación S/X	2	258,07	129,04	0,25
	Error	12	991,22	82,60	
	Total	17	3843,40		
Consumo	pH	1	2,33	2,33	0,167
	Relación S/X	2	85,30	42,65	0,00
	pH*Relación S/X	2	5,37	2,68	0,124
	Error	12	12,91	1,076	
	Total	17	105,92		
Tasa de Consumo	pH	1	0,0137	0,0137	0,167
	Relación S/X	2	0,504	0,252	0,00
	pH*Relación S/X	2	0,0317	0,0158	0,124
	Error	12	0,0764	0,00636	
	Total	17	0,626		

Tabla 5.33. Análisis de varianza para el fósforo

Método	Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	p
Reducción	pH	1	22,83	22,83	0,344
	Relación S/X	2	528,12	264,06	0,002
	pH*Relación S/X	2	41,10	20,55	0,443
	Error	12	282,79	23,57	
	Total	17	874,84		
Consumo	pH	1	0,284	0,284	0,729
	Relación S/X	2	529,011	264,50	0,000
	pH*Relación S/X	2	17,976	8,988	0,05
	Error	12	27,179	2,265	
	Total	17	574,450		
Tasa de Consumo	pH	1	0,00168	0,0016	0,729
	Relación S/X	2	3,130	1,565	0,000
	pH*Relación S/X	2	0,106	0,0531	0,05
	Error	12	0,160	0,0134	
	Total	17	3,399		

Tabla 5.34. Análisis de varianza para la DQO

Método	Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	<i>p</i>
Reducción	pH	1	0,0303	0,0303	0,866
	Relación S/X	2	423,081	211,540	0,000
	pH*Relación S/X	2	1,786	0,893	0,917
	Error	12	122,857	10,238	
	Total	17	548,026		
Consumo	pH	1	1.176	1.176	0,652
	Relación S/X	2	26.887.593	13.443.797	0,000
	pH*Relación S/X	2	8.202	4.101	0,496
	Error	12	66.088	5.507	
	Total	17	2.6963.059		
Tasa de Consumo	pH	1	7	7	0,652
	Relación S/X	2	159.098	53.035	0,000
	pH*Relación S/X	2	49	24,3	0,496
	Error	12	391	32,6	
	Total	17	159.545		

Tabla 5.35. Análisis de varianza para la Biomasa

Método	Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	<i>p</i>
Productividad	pH	1	0,000719	0,000719	0,321
	Relación S/X	2	0,00112	0,000563	0,450
	pH*Relación S/X	2	0,00196	0,000983	0,278
	Error	6	0,00369	0,000615	
	Total	11	0,00750		
Biomasa máxima	pH	1	0,107	0,107	0,372
	Relación S/X	2	0,507	0,253	0,192
	pH*Relación S/X	2	0,243	0,121	0,404
	Error	6	0,691	0,115	
	Total	11	1,550		

De acuerdo con los resultados expuestos previamente, se puede observar que las interacciones entre los efectos no resultaron significativas para la explicación de la variable respuesta en cada uno de los casos, ya que el valor obtenido de “p” fue mayor que el nivel de significancia fijado ($p > 0,05$), es decir que la influencia conjunta del pH y la relación S/X no determinó en gran medida el comportamiento de la variable respuesta. Para el caso del nitrógeno, fósforo y DQO (Tabla 5.32, Tabla 5.33, Tabla 5.34) el efecto que contribuyó de manera significativa a la explicación de la variabilidad fue la relación S/X ($p < 0,05$).

Para el caso de la biomasa (Tabla 5.35) no se detectó ningún efecto significativo, es decir que tanto la relación S/X como el pH no generaron un cambio significativo sobre la variable respuesta. En este caso, es importante aclarar que este resultado no indica que la relación S/X y el pH de manera individual o su interacción no causaron un efecto sobre la respuesta, sino que este efecto no fue lo suficientemente grande para generar un cambio cuantificable en la respuesta mediante el ANOVA, lo cual puede estar relacionado con el uso de dos replicas para el caso de la biomasa, lo que podría causar que la variabilidad existente sea mayor y difícil de explicar.

Una vez realizado el ANOVA, se procedió a comprobar la existencia de diferencias significativas entre tratamientos por medio de la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de Medias.

5.6.3. Prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de medias

En primera instancia, es necesario aclarar que para realizar la prueba se requiere que se cumpla el supuesto de homocedasticidad o variabilidad constante entre los grupos a probar, por lo tanto, se debe llevar a cabo una prueba de igualdad de varianzas, en este caso se llevó a cabo la prueba de Levene para validar la homocedasticidad entre los grupos de datos, resultados que se encuentran contenidos en el Anexo 2.

Los resultados de la **prueba de Kruskal-Wallis** se resumen en la Tabla 5.36.

Tabla 5.36. Resultados Prueba de Kruskal-Wallis

Parámetros		Rechazo de hipótesis nula ($p < 0,05$)	Valor- p
Nitrógeno	Reducción	Sí	0,022
	Consumo	Sí	0,022
	Tasa de Consumo	Sí	0,022
Fosforo	Reducción	Sí	0,034
	Consumo	Sí	0,00794
	Tasa de Consumo	Sí	0,00794
DQO	Reducción	Sí	0,013
	Consumo	Sí	0,008
	Tasa de Consumo	Sí	0,008
Biomasa	Productividad	No	0,45
	Biomasa Máxima	No	0,41

De los resultados expuestos en la Tabla 5.35 se puede observar que en la mayoría de parámetros se detectó, al menos, una diferencia significativa entre las medias de los tratamientos ($p < 0,05$), exceptuando las variables medidas para la biomasa, lo cual pudo estar relacionado con la toma de solo dos réplicas, influyendo en que no se pueda modelar adecuadamente la variabilidad existente.

Una vez se detecta que al menos uno de los tratamientos difiere del resto mediante la prueba de Kruskal-Wallis, se procede a comparar todas las posibles parejas de tratamientos entre sí para determinar cuáles, entre las mejores, corresponde al mejor tratamiento. La prueba que se utiliza en este caso es la de rangos de Wilcoxon.

5.6.4. Prueba de rangos de Wilcoxon

Los resultados de la comparación entre grupos para todos los parámetros y las variables medidas mediante la prueba de comparación de Wilcoxon se exponen en la en la Tabla 5.37.

Tabla 5.37. Resultados prueba de rangos de Wilcoxon

Parámetros		Mejor tratamiento	Medias	Coficiente de variación (C_v)	Intervalo de confianza (95%)
Nitrógeno	Reducción (%)	T ₁ B	98,24	0,67	94,54 - 99,90
	Consumo (mgL ⁻¹)	T ₁ B	6,11	34,64	0,86 - 11,37
	Tasa de Consumo (mgL ⁻¹ d ⁻¹)	T ₁ B	0,4701	34,64	0,06 - 0,87
Fosforo	Reducción (%)	T ₂ B	95,221	0,83	93,26 - 97,18
	Consumo (mgL ⁻¹)	T ₁ B	17,71	8,16	14,12 - 21,29
	Tasa de Consumo (mgL ⁻¹ d ⁻¹)	T ₁ B	1,36	8,16	1,09 - 1,64
DQO	Reducción (%)	T ₁ A	94,310	0,65	92,79 - 95,83
	Consumo (mgL ⁻¹)	T ₁ B	3.697,56	1,93	3.520,70 - 3.874,40
	Tasa de Consumo (mgL ⁻¹ d ⁻¹)	T ₁ B	284,43	1,93	270,82 - 298,03
Biomasa	Productividad (gL ⁻¹ d ⁻¹)	T ₁ B	0,075	64,38	0,0081 - 0,142
		T ₂ B	0,040	60,35	0,007 - 0,073
	Biomasa Máxima (gL ⁻¹)	T ₁ B	1,28	53,42	0,33 - 2,24
		T ₁ A	0,704	29,43	0,416 - 0,991

De los resultados expuestos en la Tabla 5.37 se puede observar que los mejores tratamientos son las combinaciones T₁B, T₁A y T₂B.

En el caso de la biomasa, tanto para la productividad como para la biomasa máxima, el comportamiento de los datos no permitió encontrar mediante los métodos evaluados, la existencia tanto de efectos significativos como de diferencia entre los tratamientos, debido a esto, se procedió a seleccionar aquellos que optimizaron la respuesta a partir de los estadísticos obtenidos en el análisis exploratorio. Para los dos casos, los tratamientos seleccionados fueron T₁B y T₂B.

Cabe destacar que en los casos donde se presentó una baja variabilidad ($C_v < 10\%$), los intervalos de confianza presentaron una amplitud pequeña, siendo esto favorable en la construcción de estos límites en términos inferenciales al permitir una mayor precisión a la hora de determinar el valor que más se aproxima al verdadero.

5.6.5. Validación de Supuestos

Posterior a realizar el análisis de varianza y determinar diferencias significativas entre tratamientos para cada variable asociada con los parámetros y, probar las diferencias entre estos, el siguiente paso es la evaluación de los supuestos asociados con los errores, los cuales han de otorgar mayor peso a los resultados.

Los supuestos a evaluar son: la normalidad, independencia y la homocedasticidad, a una significancia del 5% y se llevan a cabo mediante las pruebas de Shapiro-Wilk, Breusch-Godfrey y Breusch-Pagan respectivamente. El procedimiento teórico para cada procedimiento consiste en lo siguiente:

- 1) Para la normalidad es de interés no rechazar la hipótesis nula de normalidad para los residuales, esto se traduce en probar el siguiente sistema:

$$\begin{aligned} H_0: & \text{Los residuales se distribuyen normalmente} \\ & \text{vs} \\ H_a: & \text{Los residuales no se distribuyen normalmente} \end{aligned}$$

- 2) Para la independencia, se busca que los residuales sean independientes, por tanto, los coeficientes asociados a una posible relación lineal entre estos deben ser cero y se debe no rechazar la hipótesis nula, es decir:

$$\begin{aligned} H_0: & \text{Los residuales no se encuentran auto correlacionados} \\ & \text{vs} \\ H_a: & \text{Los residuales se encuentran auto relacionados} \end{aligned}$$

- 3) Para la homocedasticidad se busca no rechazar la hipótesis nula (H_0) que indica que los residuales poseen una varianza constante, es decir:

$$\begin{aligned} H_0: & \text{Los residuales poseen varianza constante} \\ & \text{vs} \\ H_a: & \text{Los residuales no poseen varianza constante} \end{aligned}$$

Por lo tanto, en todos los casos la probabilidad “ p ” calculada debe ser mayor al nivel de significancia fijado (5%).

El procedimiento se llevó a cabo por medio del paquete estadístico **R**, ya que incluye las pruebas de interés implementadas. Los resultados se muestran en la Tabla 5.38.

Tabla 5.38. Validación de Supuestos (Valores – p)

Parámetros		Supuestos		
		Normalidad	Homocedasticidad	Independencia
Nitrógeno	Reducción	0,005	0,12	0,84
	Consumo	0,90	0,024	0,33
	Tasa de Consumo	0,90	0,024	0,33
Fosforo	Reducción	0,96	0,0086	0,09
	Consumo	0,88	0,19	0,24
	Tasa de Consumo	0,88	0,19	0,24
DQO	Reducción	0,55	0,01	0,51
	Consumo	0,44	0,88	0,07
	Tasa de Consumo	0,44	0,88	0,07
Biomasa	Productividad	0,99	0,009	0,57
	Biomasa Máxima	0,98	0,008	0,52

Los resultados permiten concluir que la mayoría de las variables cumplieron con el supuesto de normalidad ($p>0,05$); la única excepción se dio para la reducción de nitrógeno, no obstante, es importante aclarar que la no normalidad suele no tener un efecto tan significativo sobre los resultados del ANOVA, ya que se pueden presentar desviaciones moderadas soportadas por el método, por lo tanto, este supuesto podría relajarse. Asimismo, una varianza no constante entre grupos no suele tener un efecto significativo sobre los resultados, sin embargo, la carencia de no correlación entre las observaciones, es decir que no se presente independencia podría llegar a tener un efecto significativo sobre las conclusiones siendo, quizás, el supuesto más importante entre los que se prueban y que en todos los casos se cumplió (Glass et al. 1972, Harwell et al. 1992, Lix et al. 1996). Las gráficas relacionadas con las pruebas de los supuestos se encuentran contenidas en el Anexo 3.

5.7. Selección de mejor tratamiento

Para la selección del mejor tratamiento, se tendrá en cuenta la optimización del porcentaje de reducción, consumo, tasa de consumo, productividad de biomasa y B_{max} . Asimismo, se tendrá en cuenta el análisis estadístico.

Para el porcentaje de reducción, tasa de consumo y consumo de DQO, los tratamientos que presentaron el mejor desempeño fueron T₁A (S/X=100, pH=6,5) y T₁B (S/X=100, pH=7,5), los valores obtenidos para cada variable se exponen en la Tabla 5.39

Tabla 5.39. Tratamiento óptimo para DQO

Tratamiento	%DQO (%)	$rDQO$ (mgL ⁻¹ d ⁻¹)	ΔDQO (mg)
T ₁ A	94,32 ± 0,61	281,029 ± 8,054	3.653,39 ± 104,70
T ₁ B	94,27±1,27	284,43 ± 5,48	3.697,56 ± 71,24

Para el porcentaje de reducción, tasa de consumo y consumo de NAT los tratamientos que presentaron el mejor desempeño fueron T₁A (S/X=100, pH=6,5) y T₁B (S/X=100, pH=7,5) los valores obtenidos para cada variable se exponen en la Tabla 5.40.

Tabla 5.40. Tratamiento optimo NAT

Tratamiento	%N – NH ₃ (%)	$rN - NH_3$ (mgL ⁻¹ d ⁻¹)	$\Delta N - NH_3$ (mg)
T ₁ A	97,23 ± 1,08	0,30 ± 0,11	3,85 ± 1,37
T ₁ B	98,24 ± 0,66	0,47± 0,16	6,11 ± 2,12

Para el porcentaje de reducción, tasa de consumo y consumo de Ortofosfatos los tratamientos que presentaron el mejor desempeño fueron T₁A (S/X=100, pH=6,5) y T₁B (S/X=100, pH=7,5) los valores obtenidos para cada variable se exponen en la Tabla 5.41.

Tabla 5.41. Tratamiento óptimo para Ortofosfatos

Tratamiento	%PO ₄ ⁻³ (%)	rPO_4^{-3} (mgL ⁻¹ d ⁻¹)	ΔPO_4^{-3} (mg)
T ₁ A	78,94 ± 10,55	1,16 ± 0,21	15,05 ± 2,67
T ₁ B	85,46 ± 2,55	1,36 ± 0,11	17,70 ± 1,44

Para el caso del crecimiento de biomasa, el tratamiento que presenta los valores más altos de producción de biomasa y B_{max} es T₁B (S/X=100, pH=7,5) con valores de $0,076 \pm 0,048 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ y $1,29 \pm 0,69 \text{ gL}^{-1}$ respectivamente.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede observar que las microalgas contribuyen significativamente con la reducción de DQO y nutrientes. Para el caso de la DQO todos los tratamientos presentaron porcentajes de reducción superiores al 80%. Los mejores tratamientos (Tabla 5.39) presentan porcentajes superiores al 90%, valor que se ve reflejado en la tasa de consumo y consumo, alcanzando una rápida disminución de la concentración de DQO durante el periodo de cultivo.

Para el caso del NAT, a pesar de que se presentaron fluctuaciones en la concentración, especialmente en T₁A y T₁B, se alcanzó el agotamiento al final del periodo de cultivo para todos los tratamientos, en este caso la selección se llevó a cabo teniendo en cuenta los valores de consumo y tasa de consumo, los cuales fueron superiores debido a la diferencia en la concentración inicial de NAT. Si bien, el rápido agotamiento pudo estar relacionado con bajas concentraciones en el medio, se debe destacar que en otros estudios se han reportado porcentajes de reducción, consumo y tasa de consumo superiores utilizando sustratos con mayor disponibilidad de NAT (Tabla 5.12) indicando el potencial de las microalgas en la reducción de nitrógeno.

Para el caso de los Ortofosfatos, los tratamientos seleccionados no exhibieron el mayor porcentaje de reducción, para el resto de tratamientos, se alcanzaron porcentajes superiores al 90%, sin embargo, al comparar los valores del consumo y tasa de consumo, se puede concluir que T₁A y T₁B presentaron un mejor comportamiento en la disminución de Ortofosfatos, dado que para el mismo periodo se logró una mayor reducción del nutriente en el medio.

Se puede concluir, de acuerdo con los resultados presentados, que el cultivo de microalgas ofrece una solución de tratamiento terciario debido a la capacidad de las microalgas para absorber nitrógeno y fósforo para llevar a cabo sus procesos metabólicos (Hemalatha y Venkata, 2016)

La selección de los mejores tratamientos de acuerdo con el comportamiento en la reducción de nutrientes y DQO durante el periodo de cultivo, presento concordancia con los resultados seleccionados en el análisis exploratorio y la prueba de rangos de Wilcoxon.

La selección del mejor tratamiento por medio de prueba de rangos de Wilcoxon no se pudo aplicar para el caso de la biomasa, debido al comportamiento de los datos, por lo tanto, se procedió a seleccionar el tratamiento que optimizó la variable respuesta (productividad y B_{max}) a partir de los estadísticos obtenidos en el análisis exploratorio. En este caso, el tratamiento T₁B presento los mejores resultados, sin embargo, debido a la alta variabilidad ($C_v > 10\%$) se recomienda proceder con precaución.

La variabilidad en los datos de la productividad y B_{max} puede estar relacionado, como se citó en la sección 5.5, con el número de replicas utilizadas (2), o por errores al momento de ejecutar el método de cuantificación de biomasa (peso seco). En ese sentido, la selección del tratamiento se va a limitar al comportamiento presentado en el crecimiento de biomasa y desempeño en la reducción de nutrientes y DQO de acuerdo con las condiciones de cultivo durante el proceso experimental.

Bajo condiciones de limitación de nutrientes se produce una rápida asimilación de las fuentes de carbono, destinadas a la producción de lípidos y almidón, materiales que permiten sustentar procesos metabólicos mientras persista la condición de estrés o ayuno (Lin et al., 2015).

Por lo tanto, se requiere de sustratos fácilmente asimilables, en la sección 5.2 se pudo observar que al incrementar la relación S/X se presentó un aumento en el consumo de DQO, lo que indica que existe una mayor disponibilidad de fuentes de carbono fácilmente asimilables, igualmente al incrementar la relación S/X se presentaba mayor disponibilidad de nutrientes. Es decir, que los tratamientos en los que se puede sustentar un mayor crecimiento de biomasa de acuerdo con sus condiciones de cultivo son T₁A y T₁B.

El tratamiento T₁B obtuvo los mejores resultados en términos de la productividad de biomasa y B_{max} , sin embargo, las condiciones de cultivo como la limitación de nitrógeno y elevados valores de pH, afectaron el crecimiento de biomasa, incrementando el tiempo requerido para alcanzar la B_{max} , y disminuyendo el rendimiento de la productividad de biomasa.

Al comparar los tratamientos (T₁A y T₁B), se puede concluir que T₁B presentó el mejor rendimiento durante el periodo de cultivo, obteniendo los mejores resultados en la reducción de DQO, nutrientes y alcanzado el mayor crecimiento de biomasa.

6. CONCLUSIONES

Se logró el cultivo de la microalga *Chlorella sp.* utilizando agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca, demostrando que la composición del sustrato permitió el crecimiento en condiciones de cultivo mixotróficas, promoviendo la asimilación de nutrientes y la transformación de las fuentes de carbono orgánico, dando como resultado un crecimiento de biomasa algal y tratamiento biológico del afluente.

La relación S/X es un factor que afecta significativamente la reducción de nutrientes y DQO, se pudo observar que a mayor relación S/X, se producía un incremento en los porcentajes de reducción, consumo y tasa de consumo, alcanzando los mejores resultados a un nivel de relación S/X igual a 100 g DQO por g inóculo. Para el caso del factor pH, no se pudieron observar diferencias significativas en los resultados bajo los niveles evaluados, lo cual puede estar relacionado con su comportamiento general a incrementar su valor durante el periodo de cultivo en cada uno de los tratamientos.

En términos generales, se puede indicar que para obtener resultados óptimos en términos de reducción de nutrientes y DQO utilizando agua residual del proceso de extracción almidón de yuca, se debería emplear una relación S/X de 100, asegurando la disponibilidad de Nitrógeno mínima de $6,46 \pm 0,15 \text{ mgL}^{-1}$ y pH de 7,5 unidades (T_1B), ya que fue el tratamiento en el que se obtuvieron los mayores valores de porcentaje de reducción, consumo y tasa de consumo.

Para el crecimiento de biomasa, estadísticamente se pudo observar que ningún factor presentó una influencia significativa en el comportamiento de la productividad y biomasa máxima, como resultado probablemente de la variabilidad que presentaron los datos. Al analizar el comportamiento del crecimiento de acuerdo con los resultados, se pudo corroborar lo expuesto en el análisis estadístico, pues se presentaron fluctuaciones que no permitieron evidenciar el efecto individual o combinado de los factores: relación S/X y pH.

En ese sentido, para la selección del mejor tratamiento se procedió a analizar las condiciones del cultivo, en el cual se presentó limitación de nitrógeno, situación que genera una condición de estrés y disminuye el crecimiento. Como respuesta, la microalga prioriza el almacenamiento de fuentes de carbono orgánico para sustentar sus procesos metabólicos y posterior crecimiento, en ausencia de componentes primordiales como lo es el nitrógeno. Bajo esas condiciones, el escenario que promueve el mayor beneficio para la microalga es el sustrato con el nivel más alto de relación S/X (100), debido a la mayor concentración inicial de nutrientes y disponibilidad de fuentes de carbono fácilmente asimilables.

La limitación de Nitrógeno demuestra una influencia significativa sobre las microalgas, se pudo evidenciar un efecto indeseable al disminuir el crecimiento. Asimismo, el incremento en el tiempo requerido para alcanzar la biomasa máxima afecta el potencial de la tecnología para la aplicación a escala real, debido al incremento en los costos del cultivo.

En términos metabólicos se podría haber favorecido el comportamiento heterótrofo para asimilar rápidamente el carbono orgánico, si bien, una de las premisas en el análisis de resultados era que la microalga sustentaba su crecimiento al consumir el carbono inorgánico una vez se agotaban las fuentes de carbono fácilmente asimilables, es posible que el crecimiento adicional se deba principalmente a los compuestos almacenados por la microalga en la condición de limitación de nitrógeno.

El crecimiento de las microalgas usando como sustrato agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca generó una reducción de NAT, DQO y Ortofosfatos del orden de $98,24 \pm 0,66$, $94,27 \pm 1,27$ y $85,46 \pm 2,55$ respectivamente, evidenciando el potencial de tratamiento de este microorganismo para la reducción de materia orgánica y nutrientes, sin embargo, el rendimiento en el crecimiento puede afectar su potencial aplicación como tecnología de tratamiento, por lo que se deben enfocar estudios en optimizar el crecimiento de biomasa.

7. RECOMENDACIONES

Para futuros trabajos de investigación, usando agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca, como sustrato para promover la reducción de nutrientes, DQO y el crecimiento algal se pueden considerar las siguientes recomendaciones:

Teniendo en cuenta el efecto de la limitación de nitrógeno en la reducción de nutrientes y crecimiento, se recomienda asegurar que la relación N/P se encuentre en el rango óptimo. Li et al. (2019b) consideran que el rango óptimo se encuentra entre 6,8 y 10,0.

Si bien, suplementar nitrógeno puede suponer un aumento en los costos de tratamiento, varios estudios han demostrado que se pueden suplementar compuestos limitantes en un sustrato al realizar mezclas de agua residual de diferentes industrias, de tal manera que se pueda suplir la limitación de nutrientes o fuente de carbono. Yang et al. (2015) y Zheng et al. (2018) obtuvieron un incremento en la productividad de biomasa al mezclar agua residual procedente de diferentes industrias alimenticias, sin embargo, se debe determinar la proporción adecuada de la mezcla para garantizar resultados satisfactorios. En ese sentido, se podría realizar una revisión bibliográfica de los estudios reportados, para seleccionar el tipo de agua residual y evaluar en un procedimiento experimental diferentes proporciones entre mezclas.

Se recomienda analizar el efecto de la comunidad bacteriana en el cultivo de microalgas, es posible que se pueda estar presentando competencia por la asimilación de fuentes de carbono y nutrientes, en el estudio se asume que el consumo de DQO se debe principalmente a las microalgas, resultando en un crecimiento al final del periodo de cultivo, pero no hay certeza del efecto de la comunidad bacteriana. Puede existir un efecto que incremente la condición de estrés o, por el contrario, suponer un estímulo para la microalga. Choix (2014) expone que existen bacterias que promueven rutas metabólicas en las microalgas que permiten incrementar el almacenamiento de fuentes de carbono en condiciones de estrés e incrementar la densidad celular, lo cual podría ser un motivo de investigación por la posible sinergia entre los microorganismos.

La condición de estrés también se puede presentar en el proceso de adaptación a nuevas condiciones como las características de un sustrato, si bien, en el presente caso de estudio se asumió que se presentó adaptabilidad de las microalgas por el rápido consumo de la DQO, es posible que la carga orgánica en la mayor relación S/X contribuyera a incrementar la fase de adaptación, al respecto se recomienda evaluar el beneficio de un mayor tiempo de aclimatación. Khalid et al. (2018) recomiendan que se realicen tres ciclos de aclimatación para reducir la fase de adaptación de la microalga.

Se recomienda realizar el control del pH durante el periodo de cultivo, ya que un incremento durante el periodo de cultivo afecta al crecimiento de biomasa microalgal. Zheng et al. (2018) recomiendan un valor de 7,0 para incrementar el crecimiento de *C. Vulgaris* en un agua residual agroindustrial.

La cuantificación de la biomasa microalgal a través del método de peso seco presentó variaciones significativas en el ensayo, se recomienda incrementar el número de replicas para reducir la variabilidad que se pueda presentar. Se podría reducir el número de reactores evaluando las mejores condiciones e incrementar su volumen para disponer de mayor cantidad de muestra.

Se podrían evaluar condiciones de crecimiento autótrofo, heterótrofo, o inhibir alguno de los dos metabolismos con la finalidad de evidenciar el potencial mixotrófico de la microalga para reducir nutrientes, DQO y crecimiento.

8. REFERENCIAS

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A., Ibraheem, I. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 19(3), 257-275.
- Abreu, A.P., Fernandes, B., Vicente, A.A., Teixeira, J., Dragone, G. (2012). Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresource Technology*. 118, 61–66.
- Alarcón, M., Dufour, D. (2002). Almidón agro de yuca en Colombia: producción y recomendaciones. Cali: Centro Internacional de Agricultura tropical (CIAT).
- Andersen, R. A., Berges, J. A., Harrison, P. J., Watanabe, M. M. (2005). Appendix A Recipes for Freshwater and Seawater Media. In R. Andersen. *Algal Culturing Techniques*. 429- 538
- Andrade, M., Costa, J. (2007). Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture*. 264, 130-134.
- APHA, AWWA., WEF. (2012) Standard Methods for Examination of Water and Wastewater.
- Ardila, L. (2012). Medición de la capacidad de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* para la remoción de cromo de aguas de curtiembre. Universidad Nacional de Colombia.
- Aristizábal, J., Sánchez, T., Mejía, D. (2007). Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Barrios, J. (2015). Influencia del pH sobre la producción biológica de hidrógeno a partir de agua residual agroindustrial. Universidad del Valle.
- Barsanti, L., Gualtieri, P. (2006). *Algae Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. CRC Press, New York.
- Bautista, J. (2020). Crecimiento de microalgas a partir del efluente del tratamiento anaerobio del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca. Universidad del Valle.
- Beltrán, J. (2014). Desarrollo de un proceso de remoción de nutrientes de efluentes eutróficos por un consorcio de microalgas nativas de Nuevo León, México cultivadas en un nuevo fotobiorreactor. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Beuckels, A., Smolders, E., Muyllaert, K. (2015). Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. *Water Research*. 77, 98–106.
- Bhatnagar, A., Chinnasamy, S., Singh, M., Das, K.C. (2011). Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Applied Energy*. 88, 3425–3431.
- Bhatnagar, A., Sillanpää, M., Witek-Krowiak, A. (2015). Agricultural waste peels as versatile biomass for water purification - a review. *Chemical Engineering Journal*. 15, 244-271.
- Borghetti, I. (2009). Avaliação do crescimento da microalga *Chlorella minutissima* em meio de cultura com diferentes concentrações de manipueira. Universidade Federal do Paraná.
- Breuer, G., Lamers, P.P., Martens, D.E., Draaisma, R.B., Wijffels, R.H. (2012). The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresource Technology*. 124, 217–226.
- Cabral, N., Tavares, J., Duarte, V., Cavalcante, M. (2017). Potential of Phosphorus removal in bioreactor operated with cells of *Chlorella sp* immobilized in alginate calcium matrix. *Science & Engineering Journal*. 26, 59–65.
- Cai, T., Park, S., Li, Y. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 19, 360-369.

- Campos, A., Daga, J., Rodrigues, E., Franzener, G., Suguiy, M., Syperreck, V. (2006). Tratamento de águas residuárias de fecularia por meio de lagoas de estabilização. *Engenharia Agrícola*. 26, 235-242.
- Candido, C., Lombadi, A. (2018). The physiology of *Chlorella vulgaris* grown in conventional and biodigested treated. *Algal Research*. 30, 79-85.
- Cao, L., Zhou, T., Li, Z., Wang, J., Tang, J., Ruan, R., Liu, Y. (2018). Effect of combining adsorption-stripping treatment with acidification on the growth of *Chlorella vulgaris* and nutrient removal from swine wastewater. *Bioresource Technology*. 263, 10–16.
- Castro, C., Parra, J. (2011). Aprovechamiento de vinazas como medio de cultivo para la producción de *chlorella vulgaris* UTEX 1803 a escala de laboratorio. Universidad Industrial de Santander.
- Cerón, V., Peña, M., Madera, C (2015). Uso de Lagunas Algales de Alta Tasa para tratamiento de aguas residuales. *Ingeniería y Desarrollo*. 33(1).
- Cheah, W., Show, P., Joon, J., Chang, J-S., Ling, T. (2018). Enhancing biomass and lipid productions of microalgae in palm oil mill effluent using carbon and nutrient supplementation. *Energy Conversion and Management*. 164, 188-197.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25, 294-306.
- Cho, H.U., Kim, Y.M., Choi, Y.N., Xu, X., Shin, D.Y., Park, J.M. (2015). Effects of pH control and concentration on microbial oil production from *Chlorella vulgaris* cultivated in the effluent of a low-cost organic waste fermentation system producing volatile fatty acids. *Bioresource Technology*. 184, 245–250.
- Choix Ley, F.J. (2014). Evaluación de la acumulación de carbohidratos en la microalga *Chlorella spp.* asociada con la bacteria *Azospirillum brasilense*. Centro de investigaciones Biológicas del Noroeste
- Colin, X., Farinet, J., Rojas, O., Alazard, D. (2007). Anaerobic treatment of cassava starch extraction wastewater using a horizontal flow filter with bamboo as support. *Bioresource technology*. 98, 1602-1607.
- Cordova, O., Ruiz-Filipi, G., Feroso, F.G., Chamy, R. (2018). Influence of growth kinetics of microalgal cultures on biogas production. *Renewable Energy*. 122, 455-459.
- De Carvalho, J., Borghetti, I., Cartas, L., Woiciechowski, A., Soccol, V., Soccol, C. (2018). Biorefinery integration of microalgae production into cassava processing industry: Potential and perspectives. *Bioresource Technology*. 247, 1165-1172.
- De Godos, I., Blanco, S., Garcia-Encina, P.A., Becares, E., Munoz, R. (2009). Long-term operation of high rate algal ponds for the bioremediation of piggy wastewater at high loading rates. *Bioresource Technology*. 100, 4332–4339.
- De Godos, I., Vargas, V.A., Blanco, S., González, M.C.G., Soto, R., García-Encina, P.A., Becares, E., Muñoz, R. (2010). A comparative evaluation of microalgae for the degradation of piggy wastewater under photosynthetic oxygenation. *Bioresource Technology*. 101, 5150–5158.
- Díaz, V., Ordoñez, C. (2006). Evaluación del pH y la agitación del medio más adecuada para el crecimiento de *Dunaliella salina* en condiciones de laboratorio.
- Dirección de Censos y Demografía. (2008). Estimación e Interpretación del Coeficiente de Variación de la Encuesta Censal: Censo General 2005 – Cgral. Departamento Administrativo Nacional de Estadística. Recuperado de: https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/boletines/censo/est_interp_coefvariacion.pdf
- Dos Santos, J., Veit, M., Juchen, P., Gonçalves, G., Palácio, S., Fagundes-Klen, M. (2018). Use of different coagulants for cassava processing wastewater treatment. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 6, 1821-1827.

- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28, 350–356.
- Ebrahimian, A., Kariminia, H.R., Vosoughi, M. (2014). Lipid production in mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* in a mixture of primary and secondary municipal wastewater. *Renewable Energy*. 71, 502–508.
- ElMekawy, A., Srikanth, S., Bajracharya, S., Hegab, H.M., Nigam, P.S., Singh, A., Mohan, S.V., Pant, D. (2015). Food and agricultural wastes as substrates for bioelectrochemical system (BES): the synchronized recovery of sustainable energy and waste treatment. *Food Research International*. 73, 213–225.
- Feiden, A. (2001). Tratamento de águas residuárias de indústria de fécula de mandioca através de biodigestor anaeróbio com separação de fases em escala piloto. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- Feng, Y., Li, C., Zhang, D. (2011). Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. *Bioresource Technology*. 102, 101–105.
- Ferreira, J.G., Mancebo, R.A., Sanchez, A.R., Lima, F.R., Ramos, E., Pereira, R. de C. (2017). Ecological analysis of hydrogen production via biogas steam reforming from cassava flour processing wastewater. *Journal of Cleaner Production*. 162, 709–716.
- Forero, A. (2015). Fundamento teórico sobre el tratamiento de aguas residuales por fitorremediación. Universidad Militar de granada.
- Ge, S., Champagne, P., Plaxton, W., Leite, G., Marazzi, F. (2016). Microalgal cultivation with waste streams and metabolic constraints to triacylglycerides accumulation for biofuel production. *Biofuels, Bioproducts y Biorefining*.
- Ge, S., Qiu, S., Tremblay, D., Vinere, K., Champagne, P., Jessop, P. (2018). Centrate wastewater treatment with *Chlorella vulgaris*: Simultaneous enhancement of nutrient removal, biomass and lipid production. *Chemical Engineering Journal*. 342, 310–320.
- Glass, G. V., Peckham, P. D., Sanders, J. R. (1972). Consequences of Failure to Meet Assumptions Underlying the Fixed Effects Analyses of Variance and Covariance. *Review of Educational Research*. 42, 237–288.
- Gojkovic, Z., Lu, Y., Ferro, L., Toffolo, A., Funk, C. (2020). Modeling biomass production during progressive nitrogen starvation by North Swedish green microalgae. *Algal Research*. 47.
- Gomez, M., Herrero, C. (1997). Cultivo y aplicación de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chlorella vulgaris* en Cuba. Universidad de la coruña.
- Gong, Q., Feng, Y., Kang, L., Luo, M., & Yang, J. (2014). Effects of light and pH on cell density of *Chlorella Vulgaris*. *Energy Procedia*. 61, 2012–2015.
- Gordón-Mendoza, R., Camargo-Buitargo, I. (2015). Selección de estadísticos para la estimación de la precisión experimental en ensayos de maíz. *Agronomía Mesoamericana*. 26, 55.
- Gupta, S., Pandey, R.A., Pawar, S.B. (2016). Microalgal bioremediation of food-processing industrial wastewater under mixotrophic conditions: Kinetics and scale-up approach. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*. 10, 499–508.
- Gupta, S., Pawar, S.B. (2018). An integrated approach for microalgae cultivation using raw and anaerobic digested wastewaters from food processing industry. *Bioresource Technology*.
- Harwell, M. R., Rubinstein, E. N., Hayes, W. S., Olds, C. C. (1992). Summarizing Monte Carlo Results in Methodological Research: The One- and Two-Factor Fixed Effects ANOVA Cases. *Journal of Educational Statistics*. 17, 315 - 339.
- Hemalatha, M. y Venkata, S. (2016). Bioresource Technology Microalgae cultivation as tertiary unit operation for treatment of pharmaceutical wastewater associated with lipid production. *Bioresource Technology*. 215, 117–122.

- Hernandez, A., Labbé, J. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía*. 49, 157-173.
- Hernandez, P., Rosas, C. (2011). Efecto de la relación carbono/nitrógeno en la productividad de biomasa de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 en fotobioreactores a escala de laboratorio. Universidad Industrial de Santander.
- Hernández-Reyes, B.M., Rodríguez-Palacio, M.C., Lozano-Ramírez, C., Castilla-Hernández, P. (2012). Remoción de nutrientes por tres cultivos de microalgas libres e inmovilizados. *Revista Latinoamericana Biotecnología Ambiental*. Algal. 3, 80–94.
- Hien, P.G., Oanh, L.T.K., Viet, N.T., Lettinga, G. (1999). Closed wastewater system in the tapioca industry in Vietnam. *Water Science and Technology*. 39, 89–96.
- Ho, S., Chen, C., Chang, J. (2012). Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource technology*. 113, 244-252.
- Hongyang, S., Yalei, Z., Chunmin, Z., Xuefei, Z., Jinpeng, L. (2011). Cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* in soybean processing wastewater. *Bioresource Technology*. 102, 9884-9890.
- Ikaran, Z., Suarez-Alvarez, S., Urreta, I., Castañón, S. (2015). The effect of nitrogen limitation on the physiology and metabolism of *Chlorella vulgaris* var L3. *Algal Research*. 10, 134-144.
- Kamyab, H., Fadhil, M., Keyvanfar, A., Abd, M., Talaiekhosani, A., Shafaghat, A., Lee, C., Shiun, L.J., Ismail, H. (2015). Efficiency of Microalgae *Chlamydomonas* on the Removal of Pollutants from Palm Oil Mill Effluent (POME). *Energy Procedia*. 75, 2400-2408.
- Khalid, A., Yaakob, Z., Abdullah, S., Takriff, M. (2016). Enhanced growth and nutrients removal efficiency of *Characium* sp. cultured in agricultural wastewater via acclimatized inoculum and effluent recycling. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 4, 3426-3432.
- Khalid, A., Yaakob, Z., Abdullah, S., Takriff, M. (2018). Growth improvement and metabolic profiling of native and commercial *Chlorella sorokiniana* strains acclimatized in recycled agricultural wastewater. *Bioresource Technology*. 247, 930-939.
- Kim, S., Park, J., Cho, Y., Hwang, S. (2013) Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Bioresource technology*, 144, 8-13.
- Kuehl, R. (2001). Diseño de Experimentos: Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación. Thomson Learning, México D.F.
- Kumar, M.S., Miao, Z.H., Wyatt, S.K. (2010). Influence of nutrient loads, feeding frequency and inoculum source on growth of *Chlorella vulgaris* in digested piggery effluent culture medium. *Bioresource Technology*. 101, 6012–6018.
- Leifeld, V., Dos Santos, T., Zelinski, D., Igarashi-Mafra, L. (2018). Ferrous ions reused as catalysts in Fenton-like reactions for remediation of agro-food industrial wastewater. *Journal of Environmental Management*. 222, 284-292.
- Li, K., Liu, Q., Fang, F., Luo, R., Lu, Q., Zhou, W., Huo, S., Cheng, P., Liu, J., Addy, M., Chen, P., Chen, D., y Ruan, R. (2019b). Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: A review. *Bioresource Technology*. 291(121934).
- Li, S., Zhao, S., Yan, S., Qiu, Y., Song, C., Li, Y., Kitamura, Y. (2019a). Food processing wastewater purification by microalgae cultivation associated with high value-added compounds production - a review. *Chinese Journal of Chemical Engineering*.
- Liang, Y., Sarkany, N., Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology letters*. 31, 1043-1049.

- Liao, Q., Chang, H.X., Fu, Q., Huang, Y., Xia, A., Zhu, X., Zhong, N. (2018). Physiological-phased kinetic characteristics of microalgae *Chlorella vulgaris* growth and lipid synthesis considering synergistic effects of light, carbón and nutrients. *Bioresource Technology*. 250, 583-590.
- Lim, S., Chu, W., Phang, S., (2010). Use of *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater. *Bioresource Technology*. 101, 7314-7322
- Lin, T.S., Wu, J.Y. (2015). Effect of carbon sources on growth and lipid accumulation of newly isolated microalgae cultured under mixotrophic condition. *Bioresource Technology*. 184, 100–107.
- Liu, C. H., Chang, C., Liao, Q., Zhu, X., Liao, C., Chang, J. (2013a). Biohydrogen production by a novel integration of dark fermentation and mixotrophic microalgae cultivation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 38(35), 15807-15814.
- Liu, C., Chang, C., Liao, Q., Zhu, X., Chang, J. (2013b). Photoheterotrophic growth of *Chlorella vulgaris* ESP6 on organic acids from dark hydrogen fermentation effluents. *Bioresource technology*. 145, 331-336.
- Liu, J., Chen, F. (2014). Biology and industrial applications of *Chlorella*: Advances and prospects. *Microalgae Biotechnology*. 153, 1-35.
- Lix, L. M., Keselman, J. C., Keselman, H. J. (1996). Consequences of Assumption Violations Revisited: A Quantitative Review of Alternatives to the One-Way Analysis of Variance “F” Test. *Review of Educational Research*. 66, 579.
- Lu, W., Wang, Z., Wang, X., Yuan, Z. (2015). Cultivation of *Chlorella sp.* using raw dairy wastewater for nutrient removal and biodiesel production: Characteristics comparison of indoor bench-scale and outdoor pilot-scale cultures. *Bioresource Technology*. 192, 382–388.
- Maity, J., Bundschuh, J., Chen, C., Bhattacharya, P. (2014). Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives—A mini review. *Energy*. 78, 104-113.
- Montgomery, D. (2004). Diseño y Análisis de Experimentos. Limusa-Wiley, México D.F
- Moreno-Garcia, L., Adjalléb, K., Barnabéb, S., Raghavan, G.S.V. (2017). Microalgae biomass production for a biorefinery system: Recent advances and the way towards sustainability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 76, 493-506.
- Mujtaba, G., Lee, K. (2017). Treatment of real wastewater using co-culture of immobilized *Chlorella vulgaris* and suspended activated sludge. *Water Research*. 120, 174–184.
- Neves, C., Maroneze, M., dos Santos, A., Francisco, E., Wagner, R., Zepka, L., Jacob-Lopes, E. (2016). Cassava processing wastewater as a platform for third generation biodiesel production. *Sci. Agric*. 73, 412–416.
- Okpozu, O.O., Ogbonna, I.O., Ikwebe, J., Ogbonna, J.C. (2019). Phycoremediation of cassava wastewater by *Desmodemus armatus* and the concomitant accumulation of lipids for biodiesel production. *Bioresource Technology*. 7, 100255.
- Park, C., Whitney, C., McNichol, C., Dickinson, E., Macquarrie, S., Skrupski, P., Zou, J., Wilson, E., O’leary, J., McGinn, J. (2012). Mixotrophic and photoautotrophic cultivation of 14 microalgae isolates from Saskatchewan, Canada: potential applications for wastewater remediation for biofuel production. *Journal of Applied Phycology*. 24, 339-348.
- Pérez, A., Torres, P. (2008). Índices de alcalinidad para el control del tratamiento anaerobio de aguas residuales fácilmente acidificables. *Revista Ingeniería y Competitividad*. 10, 41-52.
- Pérez, A., Torres, P., Silva, J. (2009). Tratamiento anaerobio de las aguas residuales del proceso de extracción de almidón de yuca. Optimización de variables ambientales y operacionales. *Dyna*. 76, 139-148.

- Perez-Garcia, O., Escalante, F., De-Bashan, L., Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*. 45, 11-36.
- Phang, S.M., Chui, Y.Y., Kumaran, G., Jeyaratnam, S., Hashim, M.A. (2001). High rate algal ponds for treatment of wastewater: a case study for the rubber industry. *Photosynthetic Microorganisms in Environmental Biotechnology* (eds Kojima, H y Lee, Y.K). 51–76.
- Pingmuanglek, P., Jakrawatana, N., Gheewala, S. (2017). Supply chain analysis for cassava starch production: Cleaner production opportunities and benefits. *Journal of Cleaner Production*. 162,1075 -1084.
- Rajbhandari, B.K., Annachhatre, A.P. (2004). Anaerobic ponds treatment of starch wastewater: case study in Thailand. *Bioresource Technology*. 95, 135–143.
- Ren, H-Y., Liu, B-F., Kong, F., Zhao, L., Xing, D., Ren, N-Q. (2014). Enhanced energy conversion efficiency from high strength synthetic organic wastewater by sequential dark fermentative hydrogen production and algal lipid accumulation. *Bioresource Technology*. 157, 355-359.
- Rodas-Gaitán, H., Rodríguez, H., Flores-Mendiola, G., Vidales-Contreras, J., Aranda-Ruiz, A., Luna-Maldonado, A. (2012). Efecto de la densidad celular de inoculación en el crecimiento de *Chlorella vulgaris* CLV2 cultivada bajo condiciones mixotróficas. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 35, 83-86.
- Rodríguez, J., Ferreras, L., Núñez, A. (1991). Inferencia estadística, niveles de precisión y diseño muestral. *Revista Española de Investigaciones Sociológicas*. 54, 139–162.
- Rodríguez, J., Torres, P., Uribe, E. (2003). Tratamiento de aguas residuales del proceso de extracción de almidón de yuca en filtro anaerobio: influencia del medio de soporte. *Scientia et Technica*. 3, 75-80.
- Rodríguez, L., Gómez, L., Peraza, Y. (2014). Evaluación del crecimiento de *Chlorella vulgaris* en diferentes concentraciones de vinaza. *Revista centro Azúcar*. 41, 75–85.
- Rodríguez, P., Sánchez, Y., Zumalacárregui, L., Pérez, O., Hernández, A., Echeveste, P., Lombardi, A. (2015). Obtención de biomasa de microalga *Chlorella vulgaris* en un banco de prueba de fotobiorreactores de columna de burbujeo. *AFINIDAD LXXIII*. 574.
- Rosales, A.G., Rodríguez, C.D., Ballen-Segura, M. (2018). Remoción de contaminantes y crecimiento del alga *Scenedesmus sp.* en aguas residuales de curtiembres, comparación entre células libres e inmovilizadas. *Ingeniería y Ciencia*. 14, 11–34.
- Ruiz, A. (2011). Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. Universidad Politécnica de Valencia.
- Ruiz-Marin, A., Mendoza-Espinosa, L., Stephenson, T. (2010). Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology*. 101, 58-64.
- Sacristan, M., Luna, V., Cadena, E., Alva, A. (2014). Producción de biodiésel a partir de microalgas y una cianobacteria cultivadas en diferentes calidades de agua. *Agrociencia*. 48, 271-284.
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P., Vaca, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 35, 265-278.
- Sakarika, M., Kornaros, M. (2016). Effect of pH on growth and lipid accumulation kinetics of the microalga *Chlorella vulgaris* grown heterotrophically under sulfur limitation. *Bioresource Technology*. 219, 694-701.
- Sakarika, M., Kornaros, M. (2017). Kinetics of growth and lipids accumulation in *Chlorella vulgaris* during batch heterotrophic cultivation: Effect of different nutrient limitation strategies. *Bioresource Technology*. 243, 356–365.

- Serrano, L. (2012). Estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel. Universidad Nacional de Colombia.
- Tan, X., Lam, M., Uemura, Y., Lim, J., Wong, C., Lee, K. (2018). Cultivation of microalgae for biodiesel production: A review on upstream and downstream processing. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 26,17-30.
- Tan, X., Zhang, Y-L., Yang, L-B., Chu, H-Q., Guo, J. (2016). Outdoor cultures of *Chlorella pyrenoidosa* in the effluent of anaerobically digested activated sludge: The effects of pH and free ammonia. *Bioresource Technology*. 200, 606-615.
- Tandon, P., Jin, Q. (2017). Microalgae culture enhancement through key microbial approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 80, 1089-1099.
- Torres, P., Cruz, C., Marmolejo, L., Cajigas, A., Pérez, A. (2006). Producción más limpia aplicada al proceso de extracción de almidón de yuca. Informe final. Colciencias, Universidad del Valle, Colombia.
- Torres, P., Pérez, A., Cajigas, A., Jurado, C., Ortiz, N. (2007). Selección de inóculos para El tratamiento anaerobio de aguas residuales del proceso de extracción de almidón de yuca.
- Turon, V., Trably, E., Fouilland, E., Steyer, J-P. (2015). Growth of *Chlorella sorokiniana* on a mixture of volatile fatty acids: The effects of light and temperature. *Bioresource Technology*. 198, 852-860.
- Turon, V., Trably, E., Fouilland, E., Steyer, J-P. (2016). Potentialities of dark fermentation effluents as substrates for microalgae growth: A review. *Process Biochemistry*. 51, 1843-1854.
- Vedula, R., Dalal, S., Majumder, C.B. (2013). Bioremoval of Cyanide and Phenol from Industrial Wastewater: An Update. *Bioremediation Journal*. 17:4, 278-293
- Villa, A., Herazo, D., Torregroza, A. (2014). Efecto del fotoperiodo sobre el crecimiento de la diatomea *Chaetoceros calcitrans* (clon c-cal) en cultivos estáticos. *Intropica*, 9, 111-117.
- Wang, J., Yang, H., Wang, F. (2014). Mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production: status and prospects. *Applied biochemistry and biotechnology*. 172, 3307-3329
- Wang, L., Chen, X., Wang, H., Zhang, Y., Tang, Q., Li, J. (2017). *Chlorella Vulgaris* cultivation in sludge extracts from 2,4,6-TCP wastewater treatment for toxicity removal and utilization. *Journal of Environmental Management*. 187, 146–153.
- Wang, L., Liu, J., Zhao, Q., Wei, W., Sun, Y. (2016). Comparative study of wastewater treatment and nutrient recycle via activated sludge, microalgae and combination systems. *Bioresource Technology*. 211, 1–5.
- Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y., Ruan, R. (2009). Cultivation of green algae *Chlorella sp.* in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Applied biochemistry and biotechnology*. 162(4), 1174-1186.
- Wang, L., Wang, Y., Chen, P., Ruan, R. (2010). Semi-continuous cultivation of *Chlorella vulgaris* for treating undigested and digested dairy manures. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 162, 2324–2332.
- Xia, A., Cheng, J., Ding, L., Lin, R., Song, W., Zhou, J., Cen, K. (2014). Enhancement of energy production efficiency from mixed biomass of *Chlorella pyrenoidosa* and cassava starch through combined hydrogen fermentation and methanogenesis. *Applied Energy*. 120, 23-30.
- Xiong, J., Kurade, M., Jeon, B. (2018). Can Microalgae Remove Pharmaceutical Contaminants from Water ?. *Trends in Biotechnology*. 36.

- Yang, L., Tan, X., Li, D., Chu, H., Zhou, X., Zhang, Y., Yu, H. (2015). Nutrients removal and lipids production by *Chlorella pyrenoidosa* cultivation using anaerobic digested starch wastewater and alcohol wastewater. *Bioresource Technology*. 181, 54–61.
- Yela, J., Peña, L. (2015). Influencia de la relación sustrato: lodo en la producción biológica de hidrógeno a partir de agua residual agroindustrial. Universidad del Valle.
- Zhang, M., Xie, L., Yin, Z., Khanal, S., Zhou, Q. (2016). Biorefinery approach for cassava-based industrial wastes: Current status and opportunities. *Bioresource Technology*. 215, 50-62.
- Zheng, H., Liu, M., Lu, Q., Wu, X., Ma, Y., Cheng, Y., Addy, M., Liu, Y., Ruan, R. (2018). Balancing carbon/nitrogen ratio to improve nutrients removal and algal biomass production in piggery and brewery wastewaters. *Bioresource Technology*. 249, 479–486.

ANEXOS

Anexo 1. Cálculos del montaje experimental

Cálculo de volumen de recipientes en donde se llevó a cabo la mezcla de inóculo y sustrato para cada relación S/X

Se prepararon 3 recipientes diferentes para cada relación S/X, en donde se realizó la mezcla del agua residual y el inóculo. El volumen de cada recipiente se determinó teniendo en cuenta el volumen de trabajo de los reactores correspondientes a cada relación S/X, es decir 6 reactores, el proceso de cálculo se llevó a cabo por medio de la Ecuación 16.

$$V_R = V_r \times N_r \quad \text{Ecuación 16}$$

Donde:

V_R = Volumen de recipientes para la mezcla de agua residual e inóculo (mL)

V_r = Volumen útil de cada reactor del montaje (mL)

N_r = Numero de reactores por cada relación S/X

El volumen útil de cada reactor del montaje fue de 800 mL y el número de reactores por relación S/X fue igual 6. De esta manera se tiene que el volumen de la mezcla en cada recipiente presento el siguiente valor:

$$V_R = 800 \text{ mL} \times 6 = 4.800 \text{ mL}$$

Cálculo de volumen de recipientes en donde se llevó a cabo la preparación de las diluciones del agua residual

Una vez se determinó el volumen de la mezcla entre el sustrato y biomasa para realizar el montaje, se calculó el volumen de agua residual con su respectiva dilución para obtener los valores de cada relación S/X, este procedimiento se llevó a cabo en 3 recipientes diferentes de acuerdo a cada relación S/X. Para determinar el volumen de agua residual en cada recipiente se tuvo en cuenta que la fracción de sustrato en la mezcla es del 90% de esta manera el volumen se calculó por medio de la Ecuación 17.

$$V_A = V_R \times 0,9 \quad \text{Ecuación 17}$$

Donde:

V_A = Volumen de agua residual en los recipientes para cada relación S/X (mL)

V_R = Volumen de recipientes para la mezcla de agua residual e inóculo (mL)

De esta manera el volumen de agua residual en los recipientes fue el siguiente:

$$V_A = 4.800 \text{ mL} \times 0,9 = 4.320 \text{ mL}$$

Con la finalidad de manejar un margen de seguridad se adiciono un valor de 100 mL, obteniendo un volumen total igual a 4.420 mL. Es importante destacar que el valor calculado corresponde al volumen de sustrato en cada recipiente, el cual está compuesto por agua residual preparada en el laboratorio y agua destilada. El volumen de agua destilada está condicionado por el valor de DQO requerido para cada relación S/X. El cálculo del volumen

de agua residual requerida para cada recipiente se determinó de acuerdo con la Ecuación 2 citada en Sección 4.4. A continuación, se expone el método de cálculo utilizado para cada valor de DQO requerido para cada relación S/X.

Relación S/X igual a 100, valor de DQO requerido igual a 5.000 mgL⁻¹.

El valor promedio de la DQO del agua residual utilizada en el montaje experimental fue de 7.400 mgL⁻¹. En ensayos preliminares se determinó que, al realizar la dilución, la concentración de DQO en los recipientes presentaba una disminución de aproximadamente el 17% respecto a la esperada teóricamente. De esta manera para asegurar un valor teórico de 5.000 mgL⁻¹ en el recipiente, se realizó el siguiente calculo:

$$C_2 = 5.000 \text{ mgL}^{-1} + (5.000 \text{ mgL}^{-1} \times 0,17) = 5.850 \text{ mgL}^{-1}$$

El valor calculado corresponde a la variable C_2 de la Ecuación 2 (sección 4.4). De esta manera el volumen de agua residual utilizada en el montaje experimental requerido para obtener un valor de DQO teórico igual a 5.000 mgL⁻¹, se determinó a partir de la Ecuación 2 tal como se muestra a continuación:

$$V_1 = \frac{5.850 \text{ mgL}^{-1} \times 4.420 \text{ mL}}{7.400 \text{ mgL}^{-1}} \approx 3.494 \text{ mL}$$

Para completar el volumen de sustrato se adiciono 926 mL de agua destilada, completando un volumen total de 4.420 mL de sustrato con un valor de DQO teórica igual a 5.000 mgL⁻¹. Para el resto de relaciones se realizó un proceso análogo.

Relación S/X igual a 50, valor de DQO requerido igual a 2.500 mgL⁻¹.

Para obtener un valor teórico de 2.500 mgL⁻¹ en el recipiente, se realizó el siguiente calculo:

$$C_2 = 2.500 \text{ mgL}^{-1} + (2.500 \text{ mgL}^{-1} \times 0,17) = 2.925 \text{ mgL}^{-1}$$

El valor calculado corresponde a la variable C_2 de la Ecuación 2(Sección 4.4). De esta manera el volumen de agua residual utilizada en el montaje experimental requerido para obtener un valor de DQO teórico igual a 2.500 mgL⁻¹, se determinó a partir de la Ecuación 2 tal como se muestra a continuación:

$$V_1 = \frac{2.925 \text{ mgL}^{-1} \times 4.420 \text{ mL}}{7.400 \text{ mgL}^{-1}} \approx 1.747 \text{ mL}$$

Para completar el volumen de sustrato se adiciono 2.673 mL de agua destilada, completando un volumen total de 4.420 mL de sustrato con un valor de DQO teórica igual a 2.500 mgL⁻¹.

Relación S/X igual a 30, valor de DQO requerido igual a 1.500 mgL⁻¹

Para obtener un valor teórico de 1.500 mgL⁻¹ en el recipiente, se realizó el siguiente calculo:

$$C_2 = 1.500 \text{ mgL}^{-1} + (1.500 \text{ mgL}^{-1} \times 0,17) = 1.755 \text{ mgL}^{-1}$$

El valor calculado corresponde a la variable C_2 de la Ecuación 2 (Sección 4.4). De esta manera el volumen de agua residual utilizada en el montaje experimental requerido para obtener un valor de DQO teórico igual a 1.500 mgL^{-1} , se determinó a partir de la Ecuación 2 tal como se muestra a continuación:

$$V_1 = \frac{1.755 \text{ mgL}^{-1} \times 4.420 \text{ mL}}{7.400 \text{ mgL}^{-1}} \approx 1.048 \text{ mL}$$

Para completar el volumen de sustrato se adiciono 3.372 mL de agua destilada, completando un volumen total de 4.420 mL de sustrato con un valor de DQO teórica igual a 1.500 mgL^{-1} .

Cálculo de volumen de inóculo para obtener una concentración de biomasa igual a $0,05 \text{ gL}^{-1}$ en la mezcla de inóculo y sustrato.

Una vez se determinó el volumen de la mezcla entre el sustrato y biomasa para realizar el montaje, se calculó el volumen de inóculo requerido en cada recipiente. Para determinar el volumen de inóculo en cada recipiente se tuvo en cuenta que la fracción de inóculo en la mezcla fue igual al 10%. El volumen se calculó por medio de la Ecuación 18.

$$V_i = V_R \times 0,1 \quad \text{Ecuación 18}$$

Donde:

V_i = Volumen de inóculo en los recipientes para cada relación S/X (mL)

V_R = Volumen de recipientes para la mezcla de agua residual e inóculo (mL)

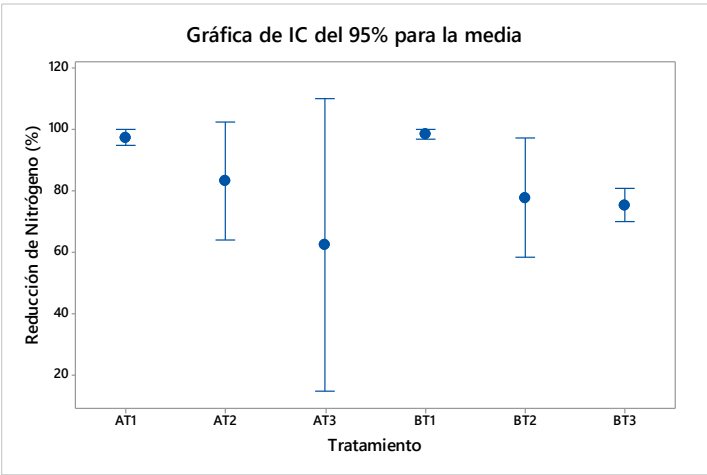
De esta manera el volumen de inóculo en los recipientes fue el siguiente:

$$V_A = 4.800 \text{ mL} \times 0,1 = 480 \text{ mL}$$

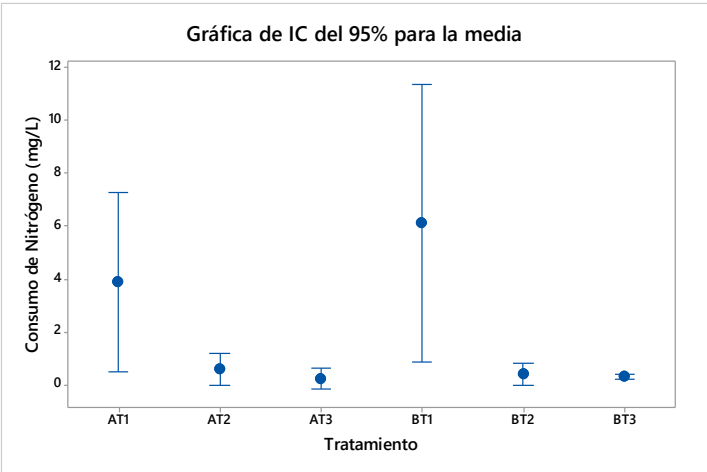
Anexo 2. Prueba de Levene para la homogeneidad de Varianzas

Parámetros		Valor - p	¿Rechazo hipótesis nula? (Significancia 5%)
Nitrógeno	Reducción	0,24	No
	Consumo	0,08	No
	Tasa de consumo	0,08	No
Fosforo	Reducción	0,61	No
	Consumo	0,55	No
	Tasa de consumo	0,55	No
DQO	Reducción	0,82	No
	Consumo	0,97	No
	Tasa de consumo	0,97	No
Biomasa	Productividad	0,00	Si
	Biomasa máxima	0,00	Si

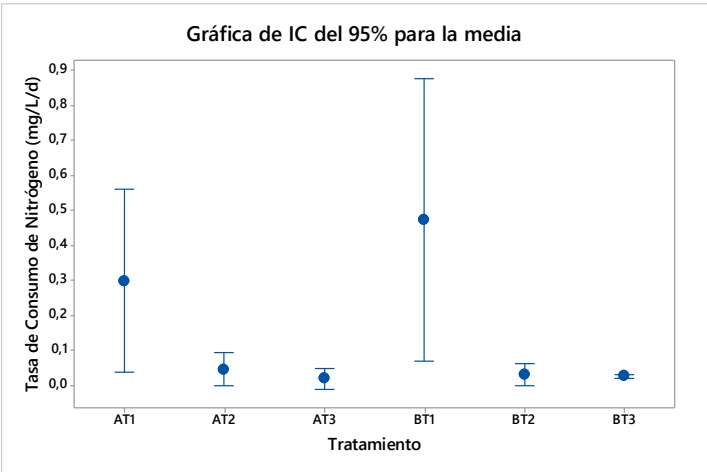
Anexo 3. Graficas intervalos de confianza para Nitrógeno



IC para medias: Reducción de nitrógeno

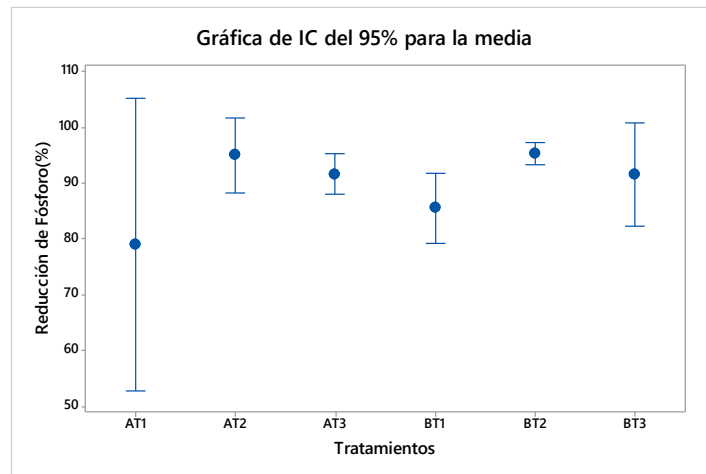


IC para medias: Consumo de nitrógeno

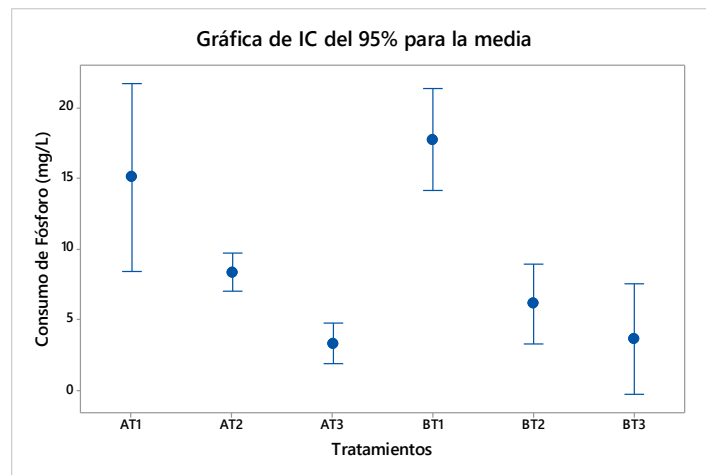


IC para medias: Tasa de Consumo

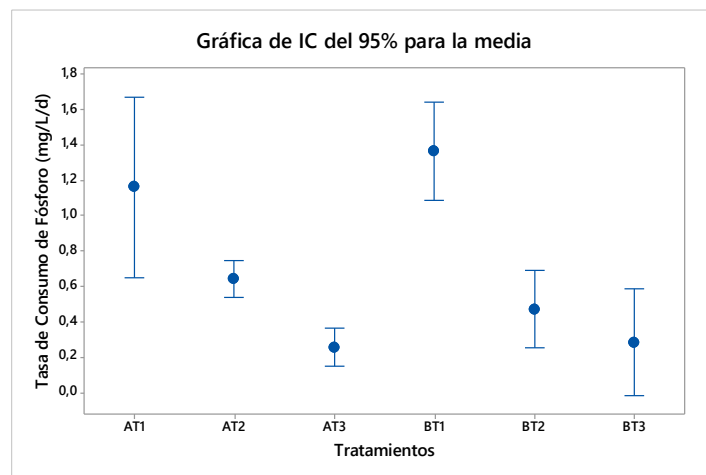
Anexo 4. Graficas intervalos de confianza para Fosforo



IC para medias: Reducción

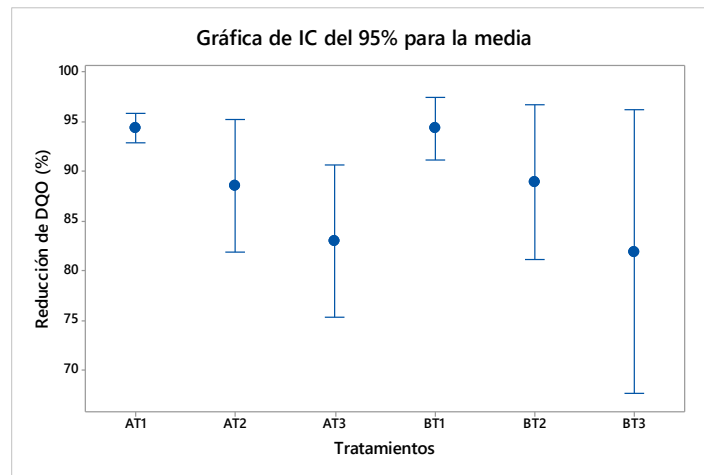


IC para medias: Consumo

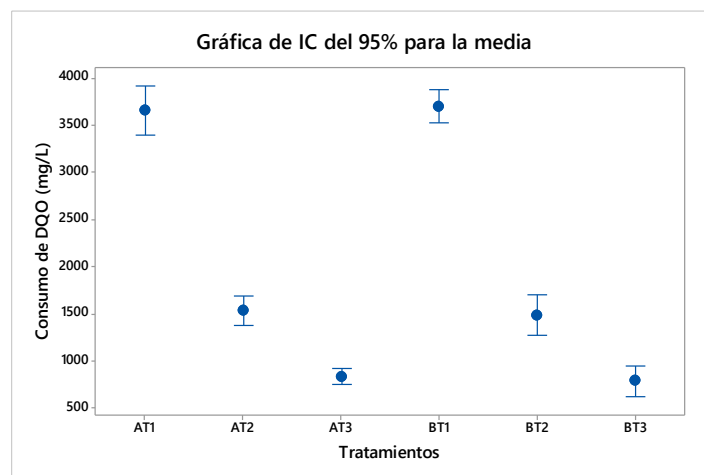


IC para medias: Tasa de Consumo

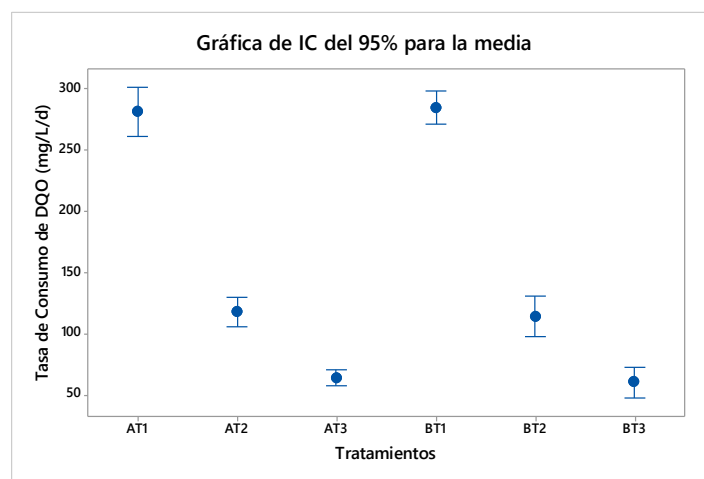
Anexo 5. Graficas intervalos de confianza para DQO



IC para medias: Reducción

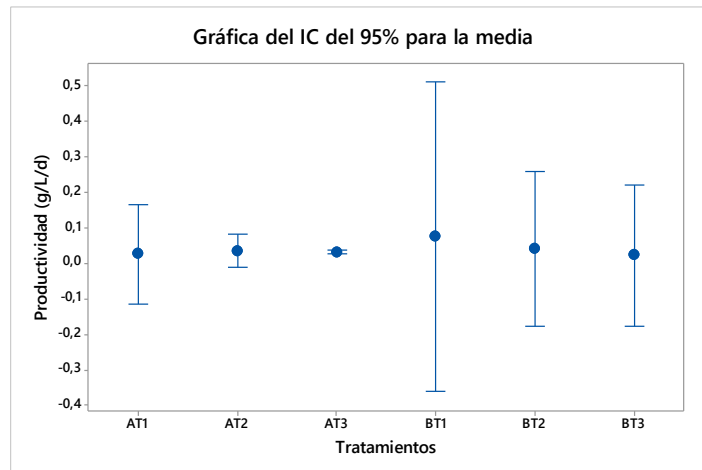


IC para medias: Consumo

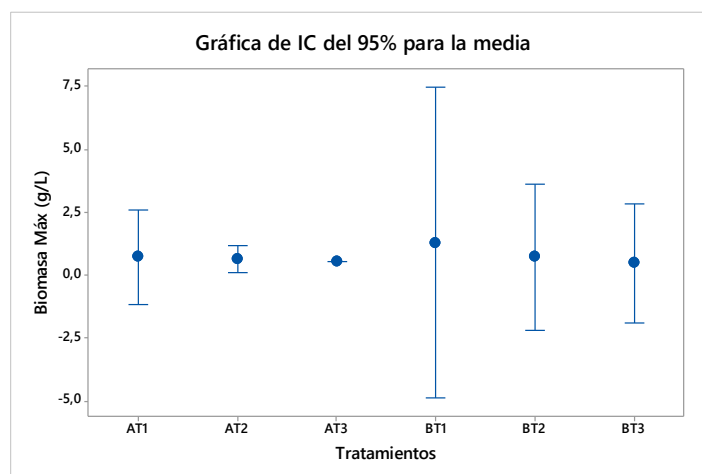


IC para medias: Tasa de Consumo

Anexo 6. Graficas intervalos de confianza crecimiento de Biomasa

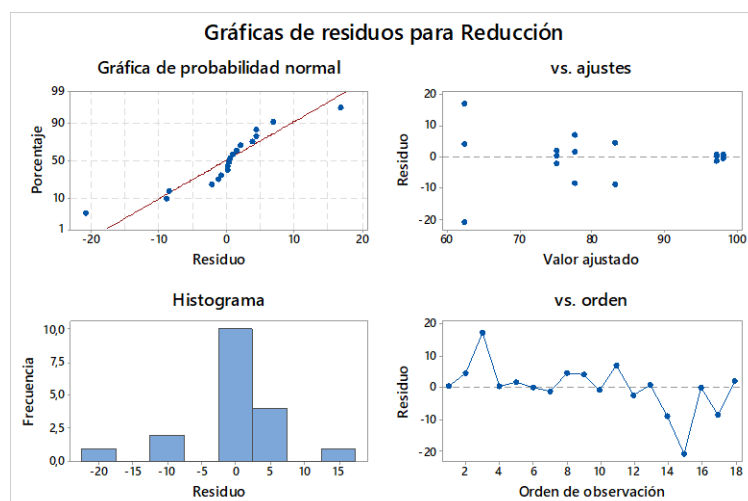


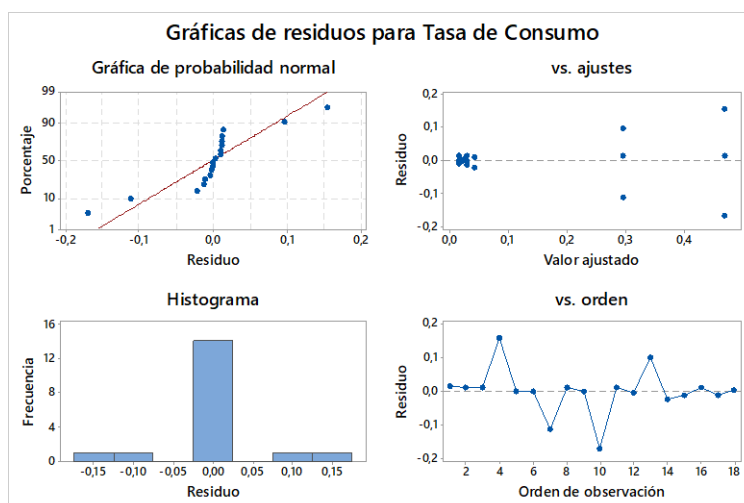
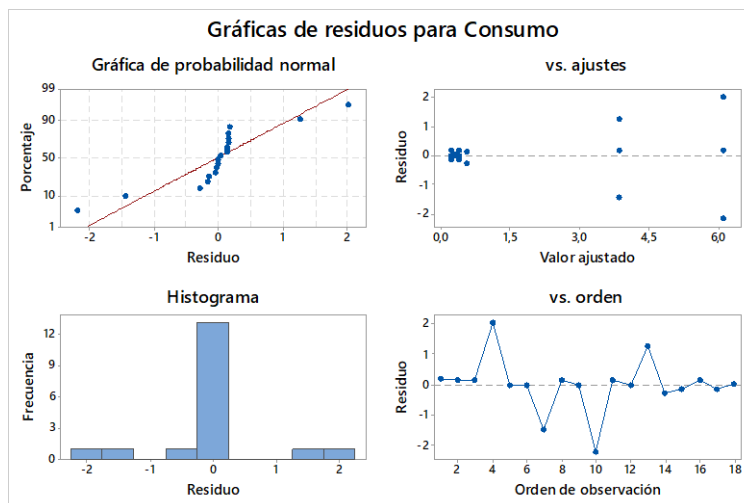
IC para medias: Productividad



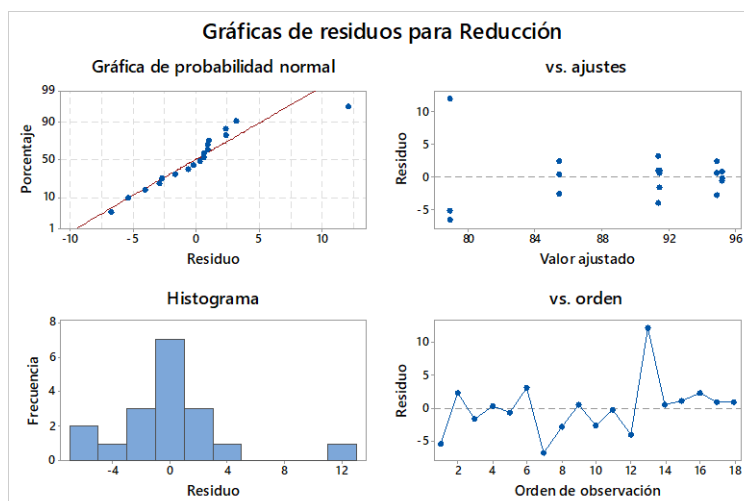
IC para medias: Biomasa Máxima

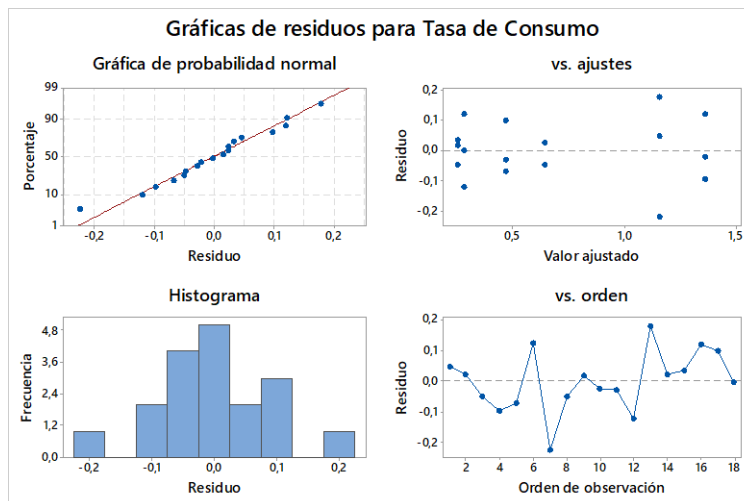
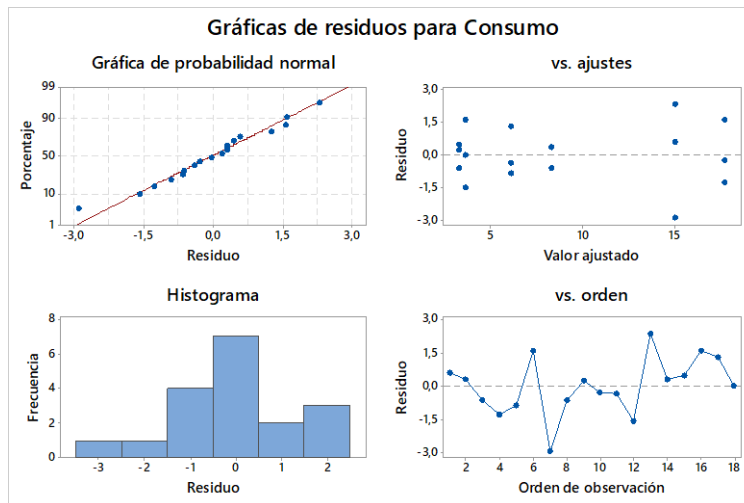
Anexo 7. Graficas validación de supuestos para Nitrógeno



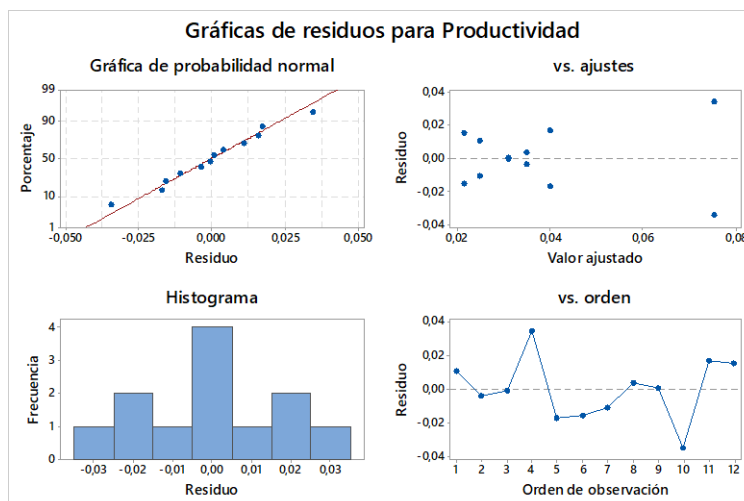


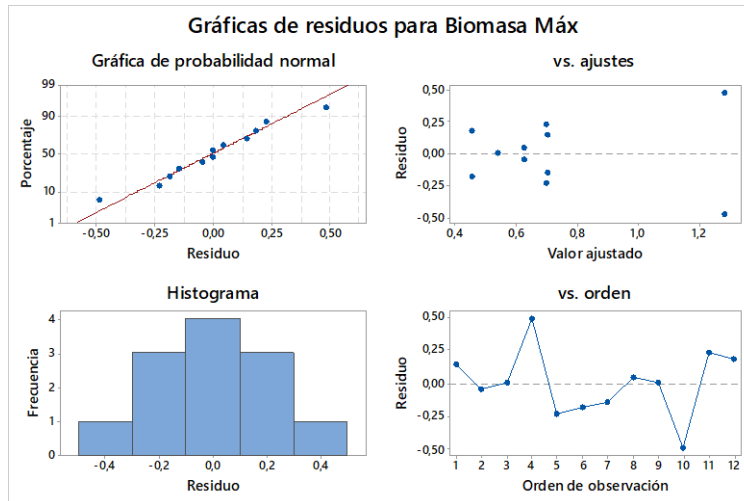
Anexo 8. Graficas validación de supuestos para Fosforo





Anexo 9. Graficas validación de supuestos para DQO





Anexo 10. Graficas validación de supuestos para crecimiento de Biomasa

