

**Centro de Investigación Científica y de
Educación Superior de Ensenada**



**"REMOCION DE NUTRIENTES CON MICROALGAS
EN AGUA RESIDUAL SINTETICA"**

**TESIS
MAESTRIA EN CIENCIAS**

Oc. JUAN GABRIEL CORREA REYES

ENSENADA B.C. MEXICO JUNIO DE 1996



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE
EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA**



**DIVISIÓN DE OCEANOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ACUICULTURA**

**“REMOCIÓN DE NUTRIENTES CON MICROALGAS
EN AGUA RESIDUAL SINTÉTICA”**

TESIS

**que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios
para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS presenta:**

Oc. JUAN GABRIEL CORREA REYES

Ensenada, Baja California, Junio de 1996.

RESUMEN de la tesis de Juan, Gabriel Correa Reyes presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en OCEANOGRAFÍA con opción en ECOLOGÍA. Ensenada, Baja California, México. Junio de 1996.

“REMOCIÓN DE NUTRIENTES CON MICROALGAS EN AGUA RESIDUAL SINTÉTICA”

Resumen aprobado por:

Por medio de cultivos estáticos (batch), se seleccionaron dos microalgas que por sus características de crecimiento rápido y de fácil adaptación a las condiciones de cultivo en agua con alta concentración de nutrientes, presentan interés para el tratamiento de aguas residuales. Las microalgas seleccionadas se mantuvieron en cultivos semicontínuos, con diluciones diarias de hasta el 50 % del volumen, en un medio con una concentración de nutrientes similar al reportado para las aguas residuales de la ciudad de Ensenada, B.C., con ciclos de luz-obscuridad de 14-10 horas y temperaturas de 25.5 y 17 °C, respectivamente. La especie *Scenedesmus obliquus* fue la que presentó la mejor remoción diaria de amonio, cercana a $6.2 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ cuando se usó un factor de dilución de los cultivos del 30%; por otro lado, esta especie removió la menor cantidad de nitrato (con el mismo factor de dilución), cerca de $2.64 \text{ mg N-NO}_3 \cdot \text{l}^{-1} \text{ d}^{-1}$. La mayor producción de proteínas se encontró en los cultivos de *Scenedesmus obliquus* con un factor de dilución del 30%, la cual resultó cercana a $25 \text{ mg Prot.} \cdot \text{l}^{-1} \text{ d}^{-1}$. En vista que la cantidad de nitrógeno proteínico solo fue de 3.99 mg (42%), se concluye que una parte importante del nitrógeno amoniacal presente en el agua residual sintética fue removida en forma de gas por efecto del cambio de pH causado por las microalgas, que en este caso fue de 6.65 mg (70%). No se pudo comprobar si el crecimiento de la enterobacteria *Escherichia coli*, se ve afectado por los valores de pH. Sin embargo, en cultivos mixtos de *Escherichia coli* y las dos cepas de *Scenedesmus* (*Scenedesmus obliquus* y *Scenedesmus sp.*), la enterobacteria se mantuvo aproximadamente constante con la primera de las cepas y tendió a disminuir con la otra, demostrando probablemente un efecto bacteriostático de la primera y uno de tipo antibiótico en el caso de la segunda.

“REMOVAL OF NUTRIENTS WITH MICROALGAE IN SIMULATING WASTEWATER”

ABSTRACT

Two strains of the freshwater chlorophyte *Scenedesmus* were selected for their characteristics of rapid growth and easy adaptation to high nutrient concentrations, as potential candidates for tertiary wastewater treatment. They were kept in semi-continuous cultures with daily dilutions of 30 to 50%, with 14-10h light-dark cycles and temperatures of 25.5 (day) and 17°C (night), in a medium simulating the composition of the secondarily-treated wastewaters of the city of Ensenada, B.C., Mexico. *Scenedesmus obliquus* (SC-O-1 strain), showed the best ammonia removal, close to 6.3 mg N-NH₄⁺ l⁻¹ d⁻¹. It also showed the lowest N-NO₃⁻ removal, close to 2.6 mg l⁻¹ d⁻¹. Both were found with 30% daily dilutions, with which we found also the highest protein production, of 25 mg l⁻¹ d⁻¹, equivalent to approximately 4 mg of protein-nitrogen. In view of this and of the high pH values in the cultures, with which a long percentage of ammonia is in the un-ionized, gaseous form, it is concluded that a large amount of ammonia is removed by stripping, through culture aeration. Parallel experiments failed to reveal a negative effect of high pH on *Escherichia coli* growth. However, in mixed cultures of *E. coli* with either strain of *Scenedesmus*, concentrations of *E. coli* remained constant or showed a tendency to decrease, possibly as a result of bacteriostatic or antibiotic activity by *Scenedesmus*.

DEDICATORIA

A MI MAMA

Por que a lo largo de toda mi vida siempre he encontrado en ella amor, apoyo y comprensión y por que siempre que la he necesitado a estado ahí para aconsejarme. TE QUIERO MUCHO MAMITA.

A MIS ABUELITOS

Genaro y Juanita (†), por que su recuerdo y cariño siguen viviendo dentro de mi. Además, de que nunca olvidaré todos los consejos y amor que recibí de ellos.

A LETY

Por ser mi gran compañera durante todos estos años, por su gran cariño y paciencia y por que con su alegría me dio ánimos de seguir cuando me sentí cansado. GRACIAS BEBITA TE QUIERO MUCHO.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Domenico Voltolina, por todo su ayuda y consejos a lo largo de este trabajo de tesis y por haber creído en mi y permitirme ser un estudiante mas en su proyecto de investigación.

Agradezco sinceramente al Dr. Alberto Zirino, al Dr. Leonardo Lizarraga, a la Dra. Diana Tentori, a la Dra. Roxana Rico y a la M. en C. Lourdes Trujillo por haber formado mi comité de tesis y sobre todo por las acertadas críticas y sugerencias a lo largo del trabajo de tesis.

A la Oc. María Leticia Monroy Lara por todo su apoyo incondicional, sus sugerencias y críticas y por aguantar todos mis enojos a lo largo de este trabajo de tesis.

A mi tíos Adolfo, Alfonso, Genaro, German, Ana, Gela, Marcela y Mercedes, por su gran apoyo, cariño y confianza durante toda mi vida.

A mis primos Mónica, Juan Carlos, German, Mauricio, Arturo, Fernando, Pilar, Jazmín, Adolfo, Marco, David, Sofía y Genarin, por todos los momentos tan inolvidables que hemos vivido.

A mis amigos Mónica, Alfredo, Elisa, Alejandra, Yolanda, Eduardo, Marisela, Pily y Fam. y a mis compañeros de generación (CLASE DEL 94) por compartir una etapa importante de mi vida.

Al Tec. Francisco Valenzuela, al Biol. Norberto Flores y a Karla López, por su valiosa ayuda en el mantenimiento y reparación de equipo de laboratorio, trámites administrativos y en especial por su gran amistad brindada a lo largo de estos años.

A los miembros de la Asociación de Salvavidas y Rescate de Baja California por todos los momentos que he vivido con ellos a lo largo de estos años de servicio.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada y en especial al Departamento de Acuicultura por toda la ayuda brindada a lo largo de este trabajo de tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la ayuda económica para realizar mis estudios de posgrado.

A mis perros Teddy y Cindy que en innumerables ocasiones se quedaron sin sus paseos y que sin importar eso siempre me transmitieron alegría y cariño.

A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron en la realización de este trabajo y no por ser menos importantes, no aparecen en estas líneas.

GRACIAS.

CONTENIDO

	<u>Páginas</u>	
I	INTRODUCCIÓN	1
	I.1. Hipótesis	4
	I.2. Objetivos	4
II	MATERIALES Y MÉTODOS	6
	II.1 Selección de especies	6
	II.2 Cultivos semicontínuos de la especie seleccionada	8
	II.3 Cultivos mixtos con <i>Escherichia coli</i>	10
III	RESULTADOS	12
	III.1 Selección de especies	12
	III.2 Cuantificación de la pérdida de amonio en forma gaseosa en situación simulada de cultivo	15
	III.3 Cultivos semicontínuos de las especies seleccionadas	19
	III.3.1 <i>Scenedesmus obliquus</i> (SC-O-1)	19
	III.3.2 <i>Scenedesmus sp.</i> (SC-X-2)	20
	III.4 Determinación de macronutrientes	22
	III.4.1 <i>Scenedesmus obliquus</i> (SC-O-1)	22
	III.4.1.1 Amonio	22
	III.4.1.2 Nitratos	24
	III.4.1.3 Nitritos	25
	III.4.1.4 Fosfatos	26
	III.4.2 <i>Scenedesmus sp.</i> (SC-X-2)	27
	III.4.2.1 Amonio	27
	III.4.2.2 Nitratos	29
	III.4.2.3 Nitritos	30
	III.4.2.4 Fosfatos	31
	III.5 Composición de las microalgas	33

CONTENIDO (continuación)

	<u>Páginas</u>
III.5.1 <i>Scenedesmus obliquus</i> (SC-O-1)	33
III.5.1.1 Proteínas	33
III.5.1.2 Carbohidratos	34
III.5.1.3 Lípidos	35
III.5.2 <i>Scenedesmus sp.</i> (SC-X-2)	36
III.5.2.1 Proteínas	36
III.5.2.2 Carbohidratos	38
III.5.2.3 Lípidos	40
III.6 Balance de nitrógeno	41
III.6.1 <i>Scenedesmus obliquus</i> (SC-O-1)	41
III.6.2 <i>Scenedesmus sp.</i> (SC-X-2)	43
III.7 Efecto del pH sobre la enterobacteria <i>Escherichia coli</i>	46
III.7.1 <i>Scenedesmus obliquus</i> (SC-O-1)	46
III.7.2 <i>Scenedesmus sp.</i> (SC-X-2)	47
IV.- DISCUSIONES	50
V.- CONCLUSIONES	55
LITERATURA CITADA	56

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
1	Valores promedio diarios y desviación estándar de la biomasa de la microalga <i>Chlorella zopfingiensis</i> (CL-Z-1), cultivada en medio de agua residual sintética (ARS), en unidades de densidad óptica (a) y de peso seco ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) (b).	13
2	Valores promedio diarios y desviación estándar de la biomasa de <i>Scenedesmus</i> sp. (SC-X-2), cultivada en medio de agua residual sintética (ARS), en unidades de densidad óptica (a) y de peso seco ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) (b).	14
3	Valores promedio diarios y desviación estándar de la biomasa de <i>Scenedesmus obliquus</i> (SC-O-1), cultivada en medio de agua residual sintética (ARS), en unidades de densidad óptica (a) y de peso seco ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) (b).	14
4	Valores promedio diarios y desviación estándar de la biomasa de <i>Chlorella</i> sp. (CL-?), cultivada en medio de agua residual sintética (ARS), en unidades de densidad óptica (a) y de peso seco ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) (b).	15
5	Valores promedio de la densidad óptica, antes y después de diluir, de cultivos semicontínuos de <i>Scenedesmus obliquus</i> (SC-O-1) en medio de agua residual sintética (ARS), con ciclos de luz oscuridad y bajo los factores de dilución 30 (a) y 40% (b). — : días de toma de muestras y - - - : días que duró la dilución.	19
6	Valores de pH en cultivos semicontínuos de <i>Scenedesmus obliquus</i> (SC-O-1) en medio de agua residual sintética (ARS), con ciclos de luz oscuridad y bajo dos factores de dilución (30 y 40 %).	20
7	Valores promedio de la densidad óptica, antes y después de diluir, de cultivos semicontínuos de <i>Scenedesmus</i> sp. (SC-X-2) en medio de agua residual sintética (ARS), con ciclos de luz oscuridad y bajo los factores de dilución 30 (a), 40 (b) y 50%(c). — : días de toma de muestras y - - - : días que duro la dilución.	21
8	Valores de pH en cultivos semicontínuos de <i>Scenedesmus</i> sp. (SC-X-2) en medio de agua residual sintética (ARS), con ciclos de luz oscuridad y bajo tres factores de dilución (30, 40 y 50%).	22

LISTA DE FIGURAS (continuación)

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
9	Valores de concentración de la enterobacteria <i>Escherichia coli</i> , inicial (I), al final del periodo de luz (PL) y al final del periodo de obscuridad (PO), en tres diferentes ensayos y pH. Medio de cultivo fresco con pH de 7.5 (A), 8.5 (B) y 9.5 (C), medio de cultivo utilizado por <i>Scenedesmus obliquus</i> (SC-O-1), con pH de 7.5 (D), 8.5 (E) y 9.5 (F) y en cultivo de <i>Scenedesmus obliquus</i> (SC-O-1) (G).	48
10	Valores de concentración de la enterobacteria <i>Escherichia coli</i> , inicial (I), al final del periodo de luz (PL) y al final del periodo de obscuridad (PO), en tres diferentes ensayos y pH. Medio de cultivo fresco con pH de 7.5 (A), 8.5 (B) y 9.5 (C), medio de cultivo utilizado por <i>Scenedesmus</i> sp. (SC-X-2), con pH de 7.5 (D), 8.5 (E) y 9.5 (F) y en cultivo de <i>Scenedesmus</i> sp. (SC-X-2) (G).	49

LISTA DE TABLAS

<u>Tabla</u>		<u>Página</u>
I	Composición del medio de cultivo de agua residual sintética (ARS) (Tomado de Soto-Sainz, 1993).	7
II	Valores promedio y desviación estándar de la concentración de amonio ($\text{mg N-NH}_4^+ \cdot \text{l}^{-1}$) presente en el recipiente de cultivo simulado y en la trampa. Concentración total y % de amonio explicado y presente en la trampa con un pH de 8.5 en el medio de cultivo.	16
III	Valores promedio y desviación estándar de la concentración de amonio ($\text{mg N-NH}_4^+ \cdot \text{l}^{-1}$) presente en el recipiente de cultivo simulado y en la trampa. Concentración total y % de amonio explicado y presente en la trampa con un pH de 9.5 en el medio de cultivo.	16
IV	Valores promedio y desviación estándar de la concentración de amonio ($\text{mg N-NH}_4^+ \cdot \text{l}^{-1}$), con la formulación completa del medio de cultivo, presente en el recipiente de cultivo simulado y en la trampa, concentración total y % de amonio explicado y del presente en la trampa con un pH de 8.5 del medio de cultivo.	17
V	Valores promedio y desviación estándar de la concentración de amonio ($\text{mg N-NH}_4^+ \cdot \text{l}^{-1}$), con la formulación completa del medio de cultivo, presente en el recipiente de cultivo simulado y en la trampa, concentración total y % de amonio explicado y del presente en la trampa con un pH de 9.5 del medio de cultivo.	17
VI	Valores promedio y desviación estándar de la concentración de amonio (N-NH_4^+) y nitrato (N-NO_3^-), en mg N l^{-1} , a un pH de 8.5, con la formulación completa del medio de cultivo durante un ciclo de luz-obscuridad. Se muestran las concentraciones del cultivo, de la trampa, las concentraciones totales, los porcentajes totales explicados y los porcentajes presentes en la trampa.	18

LISTA DE TABLAS (continuación)

<u>Tabla</u>		<u>Página</u>
VII	Valores promedio y desviación estándar de la concentración de amonio (N-NH_4^+) y nitrato (N-NO_3^-), en $\text{mg N}\cdot\text{l}^{-1}$, a un pH de 9.5, con la formulación completa del medio de cultivo durante un ciclo de luz-obscuridad. Se muestran las concentraciones del cultivo, de la trampa, las concentraciones totales, los porcentajes totales explicados y los porcentajes presentes en la trampa.	18
VIII	Valores de concentración de amonio en $\text{mg N-NH}_4^+\cdot\text{l}^{-1}$: inicial (I), final periodo de luz (FPL), final en trampa periodo de luz (TPL), explicada periodo de luz (ΣPL), asimilación periodo de luz (ΔPL), final periodo de obscuridad (FPO), total en trampa al final del periodo de obscuridad (TPO), explicada periodo de obscuridad (ΣPO), asimilación periodo de obscuridad (ΔPO) y diferencia entre los valores iniciales y los medidos al final del ciclo luz-obscuridad (Δ), en los recipientes con cultivos semicontínuos de <i>Scenedesmus obliquus</i> (SC-O-1), con diluciones diarias de 30 (a) y 40% (b).	23
IX	Valores de concentración de nitratos en $\text{mg N-NO}_3\cdot\text{l}^{-1}$: inicial (I), final periodo de luz (FPL), desaparición al final periodo de luz (ΔPL), final periodo de obscuridad (FPO), desaparición al final periodo de obscuridad (ΔPO), y diferencia entre el inicio y final de los periodos de luz y obscuridad en los recipientes de cultivo (Δ), durante los cultivos semicontínuos de <i>Scenedesmus obliquus</i> (SC-O-1), con diluciones diarias de 30 (a) y 40% (b).	24
X	Valores de concentración de nitritos en $\text{mg N-NO}_2\cdot\text{l}^{-1}$: final periodo de luz (FPL) y final periodo de obscuridad (FPO), en cultivos semicontínuos de <i>Scenedesmus obliquus</i> (SC-O-1), con diluciones diarias de 30 y 40%.	25
XI	Valores de concentración de fosfatos reactivos en $\text{mg P-PO}_4\cdot\text{l}^{-1}$: inicial (I), final periodo de luz (FPL), asimilación final periodo luz (ΔPL), final periodo de obscuridad (FPO), asimilación final periodo de obscuridad (ΔPO) y diferencia entre el inicio y final de los periodos de luz y obscuridad en los recipientes de cultivo (Δ), en cultivos semicontínuos de <i>Scenedesmus obliquus</i> (SC-O-1), con diluciones diarias de 30 (a) y 40% (b).	26

LISTA DE TABLAS (continuación)

<u>Tabla</u>		<u>Página</u>
XII	Valores de concentración de amonio en $\text{mg N-NH}_4^+ \cdot \text{l}^{-1}$: inicial (I), final periodo de luz (FPL), final en trampa periodo de luz (TPL), explicada periodo de luz (ΣPL), asimilación periodo de luz (ΔPL), final periodo de oscuridad (FPO), final en trampa periodo de oscuridad (TPO), explicada periodo de oscuridad (ΣPO), asimilación periodo de oscuridad (ΔPO) y diferencia entre los periodos de luz-oscuridad en los recipientes de cultivo (Δ), en cultivos semicontínuos de <i>Scenedesmus sp.</i> (SC-X-2), con diluciones diarias de cultivo de 30 (a), 40 (b) y 50% (c).	28
XIII	Valores de concentración de nitratos en $\text{mg N-NO}_3^- \cdot \text{l}^{-1}$: inicial (I), final periodo de luz (FPL), desaparición final periodo de luz (ΔPL), final periodo de oscuridad (FPO), desaparición final periodo de oscuridad (ΔPO), y diferencia entre el inicio y final de los periodos de luz y oscuridad en los recipientes de cultivo (Δ), durante los cultivos semicontínuos de <i>Scenedesmus sp.</i> (SC-X-2), con diluciones diarias de 30 (a), 40% (b) y 50% (c).	29
XIV	Valores de concentración de nitritos en $\text{mg N-NO}_2^- \cdot \text{l}^{-1}$: final periodo de luz (FPL) y final periodo de oscuridad (FPO), en cultivos semicontínuos de <i>Scenedesmus sp.</i> (SC-X-2), con diluciones diarias de 30, 40% y 50%.	31
XV	Valores de concentración de fosfatos en $\text{mg P-PO}_4^{3-} \cdot \text{l}^{-1}$: inicial (I), final periodo de luz (FPL), asimilación final periodo luz (ΔPL), final periodo de oscuridad (FPO), asimilación final periodo de oscuridad (ΔPO) y diferencia entre los periodos de luz y oscuridad en los recipientes de cultivo (Δ), en cultivos semicontínuos de <i>Scenedesmus sp.</i> (SC-X-2), con diluciones diarias de 30 (a), 40% (b) y 50% (c).	32
XVI	Valores de concentración de proteínas, en $\text{mg Prot} \cdot \text{l}^{-1}$, inicial (I), periodo de luz (PL), producción durante el periodo de luz (ΔPL), final del periodo de oscuridad (PO), producción durante el periodo de oscuridad (ΔPO), total producido en ambos periodos (PP) y nitrógeno proteínico calculado, en $\text{mg N} \cdot \text{l}^{-1}$ (NPC.), en cultivos semicontínuos de <i>Scenedesmus obliquus</i> (SC-O-1), con diluciones diarias de 30 (a) y 40% (b).	33

LISTA DE TABLAS (continuación)

<u>Tabla</u>		<u>Página</u>
XVII	Valores de concentración de carbohidratos en $\text{mg Carb}\cdot\text{l}^{-1}$, inicial (I), periodo de luz (PL), producción durante el periodo de luz (ΔPL), final del periodo de oscuridad (PO), producción durante el periodo de oscuridad (ΔPO) y total producido en ambos periodos (PP), en cultivos semicontínuos de <i>Scenedesmus obliquus</i> (SC-O-1), con diluciones diarias de 30 (a) y 40% (b).	34
XVIII	Valores de concentración de lípidos, en $\text{mg Líp}\cdot\text{l}^{-1}$, inicial (I), periodo de luz (PL), producción durante el periodo de luz (ΔPL), final del periodo de oscuridad (PO), producción durante el periodo de oscuridad (ΔPO) y total producido en ambos periodos (PP), en cultivos semicontínuos de <i>Scenedesmus obliquus</i> (SC-O-1), con diluciones diarias de 30 (a) y 40% (b).	36
XIX	Valores de concentración de proteínas, en $\text{mg Prot}\cdot\text{l}^{-1}$, inicial (I), periodo de luz (PL), producción durante el periodo de luz (ΔPL), final del periodo de oscuridad (PO), producción durante el periodo de oscuridad (ΔPO), total producido en ambos periodos (PP) y nitrógeno proteínico calculado, en $\text{mg N}\cdot\text{l}^{-1}$ (NPC.), en cultivos semicontínuos de <i>Scenedesmus sp.</i> (SC-X-2), con diluciones diarias de 30 (a), 40% (b) y 50% (c).	37
XX	Valores de concentración de carbohidratos en $\text{mg Carb}\cdot\text{l}^{-1}$, inicial (I), periodo de luz (PL), producción durante el periodo de luz (ΔPL), final del periodo de oscuridad (PO), producción durante el periodo de oscuridad (ΔPO) y total producido en ambos periodos (PP), en cultivos semicontínuos de <i>Scenedesmus sp.</i> (SC-X-2), con diluciones diarias de 30 (a), 40% (b) y 50% (c).	39
XXI	Valores de concentración de lípidos, en $\text{mg Líp}\cdot\text{l}^{-1}$, inicial (I), periodo de luz (PL), producción durante el periodo de luz (ΔPL), final del periodo de oscuridad (PO), producción durante el periodo de oscuridad (ΔPO) y total producido en ambos periodos (PP), en cultivos semicontínuos de <i>Scenedesmus sp.</i> (SC-X-2), con diluciones diarias de 30 (a), 40% (b) y 50% (c).	40

LISTA DE TABLAS (continuación)

<u>Tabla</u>		<u>Página</u>
XXII	Balance del nitrógeno en cultivos semicontínuos de <i>Scenedesmus obliquus</i> (SC-O-1), bajo factores de dilución del 30 (a) y 40% (b), se muestran los valores de concentración de nitrógeno: total inicial (N-I), final en el medio de cultivo en forma de: nitratos (N-NO ₃ ⁻), amonio (N-NH ₄ ⁺) y nitritos (N-NO ₂ ⁻), sumatoria de los componentes nitrogenados al final del ciclo de cultivo (Σ_1), diferencia entre N-I y Σ_1 (Δ), asimilado y transformado como nitrógeno proteínico (N-Prot.), recuperado en forma de N-NH ₃ por las trampas (NH ₄ ⁺ -T), sumatoria de N-Prot y N-NH ₄ ⁺ -T (Σ_2) y nitrógeno no explicado (Δ_2).	42
XXIII	Balance del nitrógeno en cultivos semicontínuos de <i>Scenedesmus sp.</i> (SC-X-2), bajo factores de dilución del 30 (a), 40 (b) y 50% (c), se muestran los valores de concentración de nitrógeno: total inicial (N-I), final en el medio de cultivo en forma de: nitratos (N-NO ₃ ⁻), amonio (N-NH ₄ ⁺) y nitritos (N-NO ₂ ⁻), sumatoria de los componentes nitrogenados al final del ciclo de cultivo (Σ_1), diferencia entre N-I y Σ_1 (Δ), asimilado y transformado como nitrógeno proteínico (N-Prot.), recuperado en forma de N-NH ₃ por las trampas (NH ₄ ⁺ -T), sumatoria de N-Prot y N-NH ₄ ⁺ -T (Σ_2) y nitrógeno no explicado (Δ_2).	44
XXIV	Razón y valores de porcentajes entre el N-NH ₄ ⁺ y N-NH ₃ , a las diferentes temperaturas y valores de pH utilizados en los sistemas de cultivos y trampa de amonio	46

“REMOCIÓN DE NUTRIENTES CON MICROALGAS EN AGUA RESIDUAL SINTÉTICA”

I INTRODUCCIÓN

En la actualidad, uno de los mayores problemas que atraviesa la humanidad es la contaminación debida a la descarga indiscriminada de desechos de diferente naturaleza, que tienen un efecto nocivo en la flora y la fauna y provocan un desequilibrio en los procesos biológicos de las comunidades.

Si estos desechos están en suspensión o en solución en el agua, cuando se descargan en un cuerpo de agua receptor se definen como aguas residuales. Este tipo de desechos causa problemas ecológicos y sanitarios importantes. Por lo que debería ser obligatorio un tratamiento adecuado para la remoción de los diferentes contaminantes, mediante procesos físicos, biológicos, químicos o la combinación de algunos de éstos, antes de que estas aguas se descarguen a sus diferentes cuerpos receptores.

Según el esquema presentado por Straub (1989), el proceso completo de tratamiento de las aguas residuales consiste de nueve etapas. En vista de que algunas de ellas pueden llevarse a cabo en forma simultánea (Oswald, 1988), el proceso se puede reducir a las cinco siguientes:

Primaria: remoción de sólidos mediante un sistema de filtración mecánica y de sedimentación.

Secundaria: degradación de compuestos orgánicos a través de una biodigestión anaeróbica o aeróbica. Etapa utilizada frecuentemente en México (Cañizares-Villanueva y Casas-Campillo, 1991).

Terciaria: los compuestos finales del tratamiento anterior son extraídos por métodos químicos o biológicos.

Cuaternaria: consiste en la eliminación de tóxicos orgánicos e inorgánicos a través de una coagulación química, en general seguida de una filtración por carbón activado.

Quinaria: remoción de sales inorgánicas, residuos orgánicos y metales pesados por medio de destilación, ósmosis inversa, electrólisis y destilación solar.

La mayor parte de las plantas de tratamiento de aguas residuales en México, usan las dos primeras etapas y disponen del agua en formas diferentes, aunque la más común es bombearla directamente, al cuerpo de agua receptor después de un tratamiento con cloro o con ozono para cumplir con las normas sanitarias. Aún tomando en cuenta los factores de dilución, esta práctica puede causar graves problemas de deterioro ambiental, de los cuales el más común es la eutroficación del cuerpo hídrico que recibe la descarga, a causa de las altas concentraciones de compuestos de nitrógeno y de fósforo del agua residual.

Entre las diferentes opciones para el tratamiento terciario la más frecuente y económicamente la más viable, es el uso de plantas acuáticas que utilizan los nutrientes presentes en el agua y bajan sus concentraciones hasta niveles aceptables, solucionando de esta forma el problema de la eutroficación del cuerpo receptor. Además del lirio acuático (*Eichornia crassipes*), utilizado en algunas plantas de tratamiento en los Estados Unidos, se ha propuesto el uso de microalgas como una alternativa viable para este tratamiento, debido a que el valor comercial de la biomasa resultante es mayor y sobre todo por la velocidad de sus procesos biológicos. Una ventaja adicional es que, a diferencia del lirio acuático, las microalgas viven totalmente sumergidas en el agua, por lo cual su actividad fotosintética causa un importante aumento del pH. Estos cambios de pH podrían acelerar el proceso de desinfección del agua residual, por la acidofilia de las bacterias entéricas que están presentes en grandes cantidades en las aguas residuales (Oswald, 1988; Cañizares-Villanueva y Casas-Campillo, 1991).

Las algas que se han cultivado en aguas residuales pertenecen principalmente a los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus*. En cultivos de grandes dimensiones (lagunas facultativas o de oxidación) se ha reportado también la presencia de los géneros *Chlorogonium*,

Chlamydomonas, *Euglena* y *Microactinium*, aunque en menor cantidad que los dos primeros (Mc Garry *et al.*, 1974).

Las microalgas cultivadas en aguas residuales pueden ser usadas como suplementos en dietas animales y en acuicultura para alimentar peces, moluscos y crustáceos y en ocasiones se han utilizado como fuente de energía, combustible, fertilizantes y productos químicos. En cada caso, dependiendo del destino de la biomasa, deben establecerse diferentes criterios para evitar la presencia de contaminantes tales como metales pesados, residuos de pesticidas, bacterias patógenas y virus entre otros (De la Noüe y De Pauw, 1988).

El tratamiento de aguas residuales con microalgas es muy atractivo debido a la capacidad que tienen las microalgas de convertir la luz y los nutrientes en energía, además de que este mecanismo resulta ser menos oneroso. Algunos ejemplos de la utilidad de esta biomasa podría ser la producción de gas metano, fertilizantes y alimento para otros organismos (Kawasaki *et al.* 1982; Wilde *et al.*, 1991).

Martin *et al.* (1985) reportaron que *Scenedesmus sp.* cultivada en agua enriquecida con extractos de cerdaza, llega a remover cerca del 98% del amonio presente en ocho días y que la mayor remoción de la fracción nitrogenada (72%) se da en los primeros días. Esto es corroborado por Pouliot *et al.* (1989) y por De la Noüe y Basseres (1989), quienes también reportaron remociones de la fracción nitrogenada cercanas al 99%, aunque formularon la hipótesis de que una fracción del amonio probablemente se pierde en forma gaseosa.

Pouliot *et al.* (1989) mencionaron que esta pérdida de amonio se debe en parte al sistema de aireación de los cultivos, ya que encontraron pérdidas cercanas al 12% de NH_3 por día, solamente aireando y agitando los medios de cultivo sin microalgas. Esto respaldaría lo encontrado por Martin *et al.* (1985) quienes reportaron una remoción de $280 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ de N-NH_4^+ y sólo un aumento de $143 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ del nitrógeno proteínico de las microalgas.

Esto sugiere que una parte del nitrógeno removido aparentemente por vía biológica se está perdiendo por otros procesos y que las microalgas posiblemente tengan un doble papel en la remoción de nitrógeno durante el tratamiento de aguas residuales.

En un estudio previo, llevado a cabo en el laboratorio de Acuicultura del CICESE (Soto-Sainz, 1993), se determinó que *Scenedesmus sp.* puede remover diariamente una cantidad de nutrientes aceptable para los fines de un sistema terciario de aguas residuales. Además, se observó que la cantidad de nitrógeno removido del medio de cultivo era superior al total de nitrógeno utilizado para la síntesis de proteínas microalgales. Por otro lado, asociado con los altos valores de pH alcanzados en estos cultivos se calculó que, entre el 30 y el 50% del amonio se encontraba en su estado gaseoso. Por este motivo, se puede pensar que el pH juega un papel importante en la remoción de productos nitrogenados y posiblemente también en la formación de sales insolubles de fósforo. El estudio de este proceso constituye el objetivo del presente trabajo.

I.1. Hipótesis

Los cambios de pH debidos a la actividad fotosintética de las microalgas que se utilizan para el tratamiento terciario de aguas residuales, favorecen la disminución de los compuestos nitrogenados y fosforados, superior a la remoción explicada por la incorporación de esos compuestos en la biomasa de los microorganismos presentes en el agua.

I.2. Objetivos

General:

Determinar la función de las microalgas en el tratamiento terciario de aguas residuales.

Particulares:

- * Seleccionar dos cepas de microalgas adecuadas para el tratamiento de aguas residuales.
- * Determinar la cantidad de nitrógeno y de fósforo disuelto (en sus diferentes formas) y del nitrógeno particulado (determinado como cantidad de proteínas entre 6.25), presente en los cultivos, a diferentes tiempos de incubación.
- * Determinar los cambios de pH en el tiempo y los porcentajes de las diferentes formas de nitrógeno y fósforo en cultivos de microalgas.
- * Calcular los porcentajes de remoción y de desaparición de nitrógeno y de fosfatos reactivos, debidos a las microalgas y a los cambios de pH.
- * Averiguar la función del pH sobre la sobrevivencia de la enterobacteria *Escherichia coli*, en el tratamiento de aguas residuales con microalgas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Selección de especies

Las microalgas utilizadas en este trabajo son especies que, por sus características de crecimiento rápido y fácil adaptación a las condiciones de cultivo en aguas con alta concentración de nutrientes, presentan interés para el tratamiento de aguas residuales. Todas ellas están depositadas en la colección de microalgas de la División de Oceanología del C.I.C.E.S.E, en donde se recaba toda la información para cada una de las cepas por los varios usuarios de la colección (Trujillo-Valle, 1993).

Se utilizaron dos cepas de *Chlorella*, aisladas localmente de suelos agrícolas (con claves CL-X-1 y CL-?), y otra de posible interés biotecnológico (*Chlorella zopfingiensis* con clave CL-Z-1). La mayoría de las especies de este género se caracteriza por presentar buenas tasas de crecimiento (Voltolina *et al.*, 1991) y por tener altas tasas de remoción de nitrógeno (De la Noüe y Basseres, 1989), lo cual explica su utilización para el tratamiento de aguas residuales.

Se utilizaron también dos cepas de *Scenedesmus* (con claves SC-O-1 y SC-X-2), ambas aisladas localmente de ambientes hiper-eutróficos. Este género de microalga tiene la capacidad de reducir el nitrato y el nitrito, aún en presencia de amonio, además presenta tolerancia a amplios intervalos de pH y de salinidad, características por las cuales se utilizan muy frecuentemente en el tratamiento de aguas residuales (Soeder y Hegewald, 1988).

Para seleccionar la especie con el patrón de respuesta esperado, se llevaron a cabo por triplicado ensayos de crecimiento en cultivos estáticos de las cinco cepas, en matraces Erlenmeyer de 125 ml y recipientes de 1000 ml, con 75 ml y 800 ml de medio de agua residual sintética (ARS), respectivamente (tabla I). Este medio de cultivo tiene una composición similar, en lo que se refiere a los compuestos de nitrógeno, fósforo y silicio

(Soto-Sainz, 1993), a la del agua residual de la principal planta de tratamiento de la ciudad de Ensenada, B.C. de acuerdo a determinaciones realizadas durante un ciclo anual. Los metales traza y las vitaminas son los del medio "P" de Guillard y Ryther (1962).

Tabla I. Composición del medio de cultivo de agua residual sintética (ARS) (Tomado de Soto-Sainz, 1993)

CONSTITUYENTES	MEDIO ARS			
	mmol l ⁻¹	mg l ⁻¹	μmol l ⁻¹	μg l ⁻¹
NUTRIENTES MAYORES				
N-NO ₃ ⁻	0.845	11.83		
N-NH ₄ ⁺	2.845	39.83		
P-PO ₄ ⁻³	0.144	4.46		
Si	0.530	14.93		
METALES TRAZA				
EDTA férrico			0.230	
Sulfato cúprico (Cu)			0.076	
Sulfato de zinc (Zn)			0.153	
Cloruro de cobalto (Co)			0.085	
Cloruro manganoso (Mn)			1.830	
Molibdato de sodio (Mo)			0.052	
VITAMINAS				
Biotina				1
Cianocobalamina (B ₁₂)				1
Tiamina clorhídrica (B ₁)				200

Los cultivos se mantuvieron en una cámara climática con un ciclo de luz-obscuridad de 14/10 horas, a temperaturas de 25.5 y 17 °C, respectivamente, que son las condiciones promedio diarias durante el verano, en la ciudad de Ensenada, B.C. La iluminación fue

provista por cuatro lámparas de luz de día de 4 pies y de 40 Watts cada una, con un flujo fotónico de aproximadamente 0.22×10^{17} Q/s/cm² en la superficie del cultivo.

El pH se evaluó por medio de un potenciómetro Orion modelo SA 230, al inicio y al final de cada cambio de régimen lumínico y a un tiempo intermedio. La concentración de la biomasa celular se evaluó por vía gravimétrica (Sorokin, 1973) y por mediciones de densidad óptica a 550 nm, para evitar los picos de absorción de las clorofilas, con un espectrofotómetro Hach DR/2000.

Los criterios de evaluación y de selección de especies fueron: la comparación de la biomasa producida, el tiempo necesario para alcanzarla, las variaciones de pH y la resistencia de cada cepa a este factor.

II.2. Cultivos semicontínuos de la especie seleccionada.

Una vez seleccionadas las especies de microalgas con la mejor producción de biomasa, se procedió a cultivarlas con la técnica semicontínua (Fogg y Thake, 1987), en recipientes de 3000 ml, con un volumen de cultivo de 2800 ml, estos ensayos se realizaron por triplicado y el medio utilizado fue el de ARS. Se usaron diferentes tasas de dilución diaria (30, 40 y 50 %), con el fin de determinar en cual de éstas permite la estabilización del cultivo, la mayor producción de biomasa y la mejor remoción de nutrientes. Con el fin de evitar la medición diaria de producción de biomasa en forma directa, se realizaron curvas de calibración entre la densidad óptica y la cantidad de biomasa presente en el cultivo (Sorokin, 1973) con los datos obtenidos en los ensayos anteriores.

Con el fin de cuantificar la remoción real de nutrientes, las concentraciones de amonio, nitrato, nitrito y fósforo del agua residual en el cultivo semicontínuo se evaluaron cada 12 horas (al final de cada ciclo de luz), siguiendo los métodos especificados en el manual del espectrofotómetro Hach DR/2000 (Hach, 1992). Las pérdidas de amonio en forma gaseosa fueron cuantificadas haciendo burbujear la manguera de desfogue del aire del sistema de cultivo en un recipiente con agua destilada y acidificada (pH \approx 2.0), provocando así la reversión a la forma iónica del NH₃ en dicha solución. Para evaluar el funcionamiento

de la trampa de amonio, se realizaron una serie de ensayos en donde al recipiente de cultivo se agregaba una solución conocida de nitrato de amonio en agua de la ciudad (cultivo simulado), los valores de pH eran ajustados agregando una cantidad adecuada de buffer, con el fin de mantenerlos aproximadamente constante a 8.5 y 9.5 durante el ciclo de cultivo, siendo estos valores similares a los extremos esperados en los cultivos con microalgas (Soto-Sainz, 1993). Cada 4 horas durante este ciclo de cultivo, se determinó la concentración de amonio en los cultivos y el secuestrado por la trampa.

El fósforo total se determinó después de una digestión ácida, con persulfato de potasio, siguiendo la metodología descrita en Hach (1992).

La composición proximal de las células se determinó en muestras tomadas, por triplicado, antes de la dilución de los cultivos en por lo menos tres fechas de muestreo, utilizando los siguientes métodos:

Proteínas: con el reactivo de Folin Ciocalteu, con la metodología de Lowry *et al.* (1951), modificada por Malara y Charra (1972 a) y por Färber Lorda (1986), usando la modalidad de extracción propuesta por Dorsey *et al.* (1978).

Lípidos: la extracción se realizó por medio de una mezcla cloroformo-metanol-agua, de acuerdo a la técnica de Bligh y Dyer (1959) modificada por Chiaverini (1972). La determinación se efectuó según la metodología descrita por Pande *et al.* (1963).

Carbohidratos: la extracción se efectuó con ácido sulfúrico de acuerdo a la metodología descrita por Whyte (1987) y la determinación con la técnica de Dubois *et al.* (1956) según Malara y Charra (1972 b).

Peso seco y contenido de cenizas: se determinaron siguiendo la metodología propuesta por Sorokin (1973).

II.3. Cultivos mixtos con *Escherichia coli*.

La cepa de bacterias coliformes *Escherichia coli* ATCC utilizada en este trabajo fue proporcionada por el grupo de Biotecnología marina del CICESE. La cepa se mantuvo en un medio de caldo lactosado hasta el momento de su utilización. Un día antes de utilizar la bacteria, esta fue inoculada en medio fresco a 35°C, esto con el fin de mantener una cierta concentración de colonias de bacterias viables disponibles para inocular en las siguientes series de experimentos de cultivo.

Para comprobar el efecto de los diferentes valores de pH, se utilizaron nueve recipientes con 800 ml de medio fresco de ARS (sin microalgas), enriquecido con lactosa (10% de la concentración normal de un caldo de cultivo original), esto con el fin de asegurar una concentración de sustrato orgánico adecuada para las bacterias. Los valores de pH ensayados fueron 7.5, 8.5 y 9.5 (tres recipientes para cada valor de pH), mantenidos con cantidades adecuadas de buffer para mantener el pH aproximadamente constante durante los experimentos.

Para comprobar el efecto de la microalga en el crecimiento de la enterobacteria *Escherichia coli*, se realizaron dos tipos de ensayos: el primero fue similar al que se utilizó para evaluar el efecto de los valores de pH, sólo que en este caso el medio utilizado se obtuvo al filtrar cultivos semicontínuos de cada una de las microalgas (también por triplicado), enriquecido y con pH modificado y estabilizado, como en los ensayos anteriores. El siguiente ensayo se realizó directamente en los cultivos semicontínuos de *Scenedesmus obliquus* y *Scenedesmus sp.* (también por triplicado), con el fin de comprobar si las microalgas sintetizan algún tipo de sustancia que inhiba el crecimiento de la enterobacterias. En este caso el medio de cultivo también se enriqueció con lactosa, pero sin ajustar los valores de pH.

La concentración de la enterobacteria *Escherichia coli* se cuantificó antes y después del inóculo y al final de cada ciclo de luz y oscuridad. En el caso de los controles (medio fresco y usado, sin microalgas y con diferentes valores de pH) el medio se renovó al inicio

de cada experimento. En el caso de los cultivos con microalgas, éstos se mantuvieron con la técnica semicontinua dejando pasar 24 horas entre cada ensayo. La cuantificación de colonias se realizó a través del método indirecto de cuenta de unidades viables con la ayuda de un contador de colonias de campo oscuro, mediante diluciones de la muestra original hasta 10^{-6} . Se tomaron submuestras, se sembraron en cajas petri con medio EMB y se incubaron a 35°C durante 24 hrs.

III. RESULTADOS

III.1. Selección de especies

Las cinco cepas se cultivaron inicialmente en matraces Erlenmeyer de 150 ml, pero al observarse que algunas cepas, por ser células grandes y pesadas, tendían a sedimentarse. Se procedió a cambiar el recipiente y aumentar el volumen de cultivo a 800 ml, que junto con el burbujeo continuo de aire no enriquecido con CO₂, permitió minimizar el problema de la sedimentación de las células. El incremento en el volumen de cultivo permitió además la toma de muestras, para realizar las relaciones de biomasa (peso seco) y densidad óptica (absorbancia).

De las cinco especies de microalgas probadas sólo la cepa CL-X-1 no pudo ser cultivada, debido a que presentaba una excesiva sedimentación y agregación.

Con el fin de determinar alguna posible diferencia en el crecimiento de las microalgas y en vista de que los datos no cumplían con las hipótesis de normalidad y de homoscedasticidad, se realizó un análisis de varianza no paramétrico de una vía (Kruskal-Wallis) (Sokal y Rohlf, 1969) para comparar la biomasa producida con cada cepa en un igual número de días. Examinando las curvas de crecimiento se seleccionaron para esta finalidad los datos de peso seco (mg·ml⁻¹) del noveno día. Al aplicar el análisis, se observó que no había diferencias estadísticamente significativas (Estatígrafo de Kruskal-Wallis 4.44 y P=0.2181) entre las microalgas utilizadas.

Otro factor para poder seleccionar las microalgas utilizadas en este trabajo fue el tiempo que estas tardaban en producir 1 mg de biomasa celular por mililitro, ya que se suponía que la producción de biomasa debe mantener alguna relación con la remoción de nutrientes del medio de cultivo. La cepa CL-Z-1 alcanzó más rápidamente (7 días) esta concentración de biomasa (Fig. 1), el coeficiente de determinación entre peso seco y densidad óptica resultó bajo ($r^2 = 86.34$). Por otro lado, aunque la cepa de SC-X-2 tardó ocho días en alcanzar dicha concentración de biomasa (Fig. 2), el coeficiente de determinación entre densidad óptica y peso seco fue mayor que en el caso anterior

($r^2 = 97.60$). A esta microalga le siguió la cepa de SC-O-1, la cual alcanzó la misma cantidad de biomasa producida un día después que SC-X-2 (Fig. 3). Además, ésta mostró un mejor coeficiente de determinación ($r^2 = 97.23$) entre peso seco y densidad óptica que la cepa de CL-Z-1. Por último, la microalga que tardó más en alcanzar el valor predeterminado de biomasa fue la cepa de CL-?, que alcanzó dicha concentración hasta el décimo día de cultivo (Fig. 4), y presentó además un coeficiente de determinación intermedio ($r^2 = 92.34$) entre el valor de CL-Z-1 y las dos cepas de *Scenedesmus*. Debido a que las cepas de *Scenedesmus* presentaron los mejores coeficientes de determinación y alcanzaron más rápido la producción de 1 mg de biomasa, éstas fueron las seleccionadas para este trabajo. Sin embargo, la cepa de CL-Z-1, una vez que se pueda diseñar una técnica adecuada de cultivo, pudiera tener potencial para el tratamiento terciario de aguas residuales.

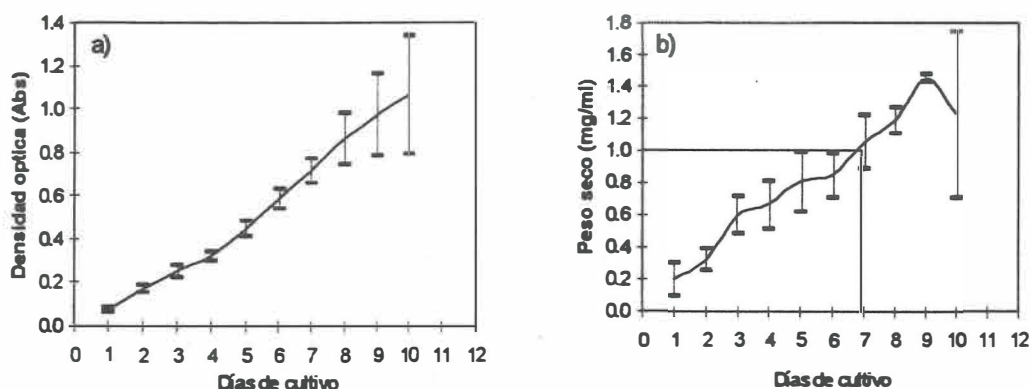


Figura 1.- Valores promedio diarios y desviación estándar de la biomasa de *Chlorella zopfingensis* (CL-Z-1), cultivada en medio de agua residual sintética (ARS), en unidades de densidad óptica (a) y de peso seco ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) (b).

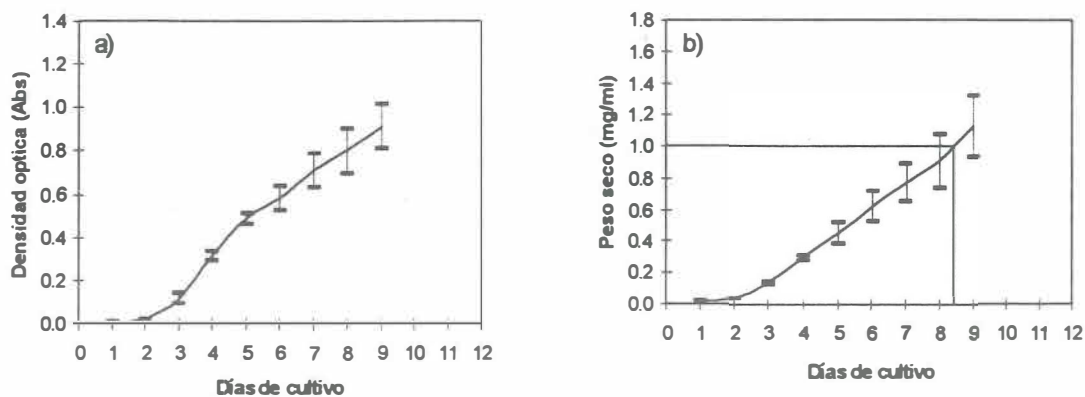


Figura 2.- Valores promedio diarios y desviación estándar de la biomasa de *Scenedesmus sp.* (SC-X-2), cultivada en medio de agua residual sintética (ARS), en unidades de densidad óptica (a) y de peso seco ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) (b).

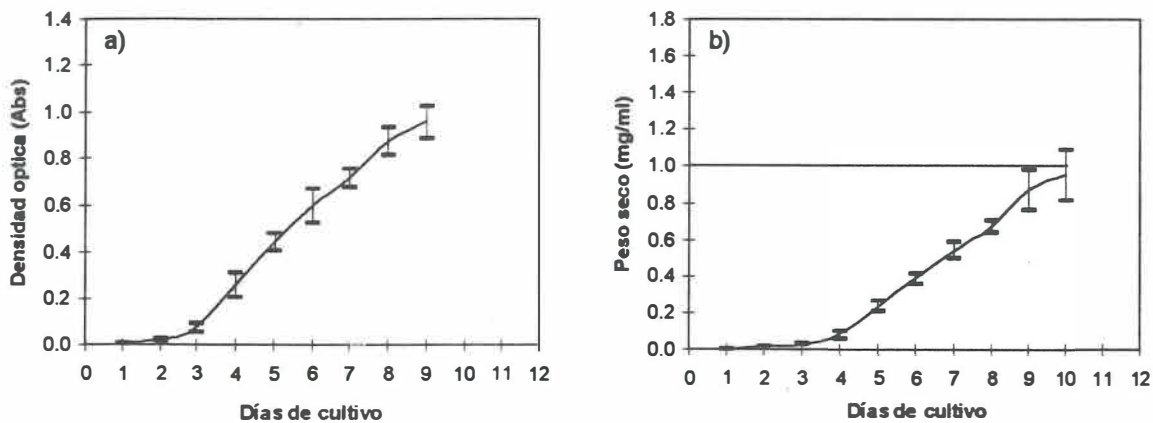


Figura 3.- Valores promedio diarios y desviación estándar de la biomasa de *Scenedesmus obliquus* (SC-O-1), cultivada en medio de agua residual sintética (ARS), en unidades de densidad óptica (a) y de peso seco ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) (b).

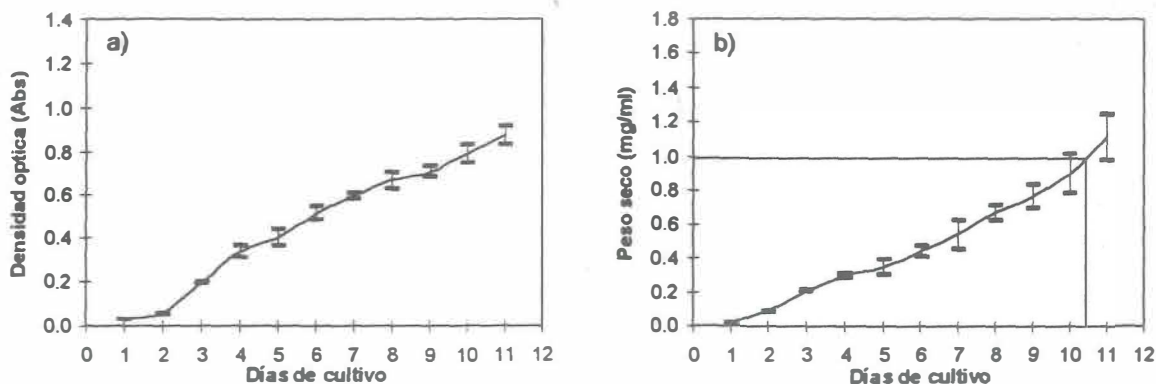


Figura 4.- Valores promedio diarios y desviación estándar de la biomasa de *Chlorella sp.* (CL-?), cultivada en medio de agua residual sintética (ARS), en unidades de densidad óptica (a) y de peso seco ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) (b).

III.2. Cuantificación de la pérdida de amonio en forma gaseosa en situación simulada de cultivo

En los ensayos para comprobar la eficiencia de la trampa de amonio se encontró que para el ensayo con valor de pH 8.5, las concentraciones de amonio en los recipientes de cultivo y en la trampa sumaron entre el 95 y el 100 % del valor inicial. Sólo el 11 % correspondió a la trampa (tabla II). Con el ensayo de valor de pH de 9.5, la concentración de amonio del recipiente original fue ligeramente inferior al inicial, aunque se notó un incremento constante del amonio presente en la trampa, de forma tal que a las 24 horas el total de iones amonio fue poco más de 14 % superior al inicial, con aproximadamente el 16.5 % presente en la trampa (tabla III).

Tabla II.- Valores promedio y desviación estándar de la concentración de amonio ($\text{mg N-NH}_4^+\bullet\text{l}^{-1}$) presente en el recipiente de cultivo simulado (sin microalgas) y en la trampa. Concentración total y % de amonio explicado y presente en la trampa, con un pH de 8.5 en el medio de cultivo.

Hora	Medio	Trampa	Total	% Explicado	% en Trampa
0:05	36.75 (3.50)	0.087 (0.07)	36.837	100.00	0.23
4:30	35.08 (2.77)	0.797 (0.61)	35.877	97.40	2.16
8:15	34.00 (3.75)	1.140 (0.24)	35.140	95.40	3.09
12:00	33.50 (2.78)	1.450 (0.08)	34.950	94.88	3.94
16:10	33.75 (2.25)	2.260 (0.26)	36.010	97.75	6.13
20:10	33.58 (3.86)	2.764 (0.11)	36.344	98.66	7.50
24:20	33.25 (2.30)	4.160 (0.28)	37.410	100.00	11.29

Tabla III.- Valores promedio y desviación estándar de la concentración de amonio ($\text{mg N-NH}_4^+\bullet\text{l}^{-1}$) presente en el recipiente de cultivo simulado (sin microalgas) y en la trampa, concentración total y % de amonio explicado y del presente en la trampa, con un pH de 9.5 del medio de cultivo.

Hora	Medio	Trampa	Total	% Explicado	% en Trampa
0:10	40.92 (1.38)	0.10 (0.05)	41.02	100.00	0.24
4:00	40.92 (1.18)	1.02 (0.68)	41.94	102.24	2.49
8:00	40.83 (0.52)	2.75 (0.25)	43.58	106.24	6.70
12:00	38.08 (0.95)	-	-	-	-
16:00	40.25 (1.52)	4.50 (0.00)	44.75	109.09	10.97
20:00	39.33 (0.63)	4.67 (0.29)	44.00	107.26	11.38
24:00	40.17 (1.01)	6.75 (0.25)	46.92	114.38	16.46

En vista de los resultados obtenidos en los ensayos anteriores, se decidió repetir los ensayos, solo que en esta ocasión se utilizó la formulación completa del medio de ARS, para los mismos dos valores de pH. además de que, por problemas prácticos, se redujo la concentración de nitratos. En ambos casos, nuevamente, las concentraciones totales de amonio resultaron superiores a la del valor inicial, 18 % para las dos condiciones de pH. Como en el caso anterior, con pH 8.5 la concentración final en la trampa fue un 12 % del total inicial, mientras que, en el valor de pH más alto (9.5) fue de un 30 % del amonio presente inicialmente en el medio (tablas IV y V). Con un pH de 8.5 la concentración de N-NH_4^+ en el recipiente de cultivo aumentó un poco más de 3 $\text{mg N-NH}_4^+\bullet\text{l}^{-1}$ en las primeras 4

horas y se mantuvo constante durante las siguientes 20 horas del experimento. Mientras que, a un pH de 9.5 el amonio disminuyó en forma regular en el recipiente de cultivo y aumentó en la trampa. En ambos casos, el total de iones NH_4^+ fue consistentemente superior al inicial y fue aumentando, aunque no en forma regular, durante todo el experimento.

Tabla IV.- Valores promedio y desviación estándar de la concentración de amonio ($\text{mg N-NH}_4^+ \cdot \text{l}^{-1}$), con la formulación completa del medio de cultivo, presente en el recipiente de cultivo simulado (sin microalgas) y en la trampa, concentración total y % del amonio explicado y del presente en la trampa, con un pH de 8.5 del medio de cultivo.

Hora	Medio	Trampa	Total	% Explicado	% en Trampa
0:10	39.25 (0.90)	0.24 (0.10)	39.487	100.00	0.60
3:55	42.58 (0.72)	0.86 (0.36)	43.447	110.03	2.19
8:07	43.17 (0.38)	2.72 (1.21)	45.883	116.20	6.88
12:00	43.33 (0.38)	2.17 (0.57)	45.500	115.23	5.49
16:00	43.00 (0.90)	4.33 (1.37)	47.333	119.87	10.97
20:00	42.42 (0.38)	4.67 (0.80)	47.083	119.24	11.82
24:00	42.00 (0.25)	4.83 (0.72)	46.833	118.60	12.24

Tabla V.- Valores promedio y desviación estándar de la concentración de amonio ($\text{mg N-NH}_4^+ \cdot \text{l}^{-1}$), con la formulación completa del medio de cultivo, presente en el recipiente de cultivo simulado (sin microalgas) y en la trampa, concentración total y % del amonio explicado y del presente en la trampa, con un pH de 9.5 del medio de cultivo.

Hora	Medio	Trampa	Total	% Explicado	% en Trampa
0:10	43.42 (1.26)	0.53 (0.25)	43.943	100.00	1.20
4:00	42.83 (0.63)	2.76 (0.35)	45.597	103.76	6.29
8:00	42.75 (0.75)	4.72 (0.46)	47.467	108.02	10.73
12:00	41.17 (1.66)	6.58 (0.38)	47.750	108.66	14.98
16:00	39.92 (2.79)	8.83 (1.44)	48.750	110.94	20.10
20:00	40.42 (0.52)	11.17 (1.81)	51.583	117.39	25.41
24:00	39.00 (1.29)	12.92 (2.04)	51.917	118.15	29.39

Como en los ensayos anteriores se siguió observando una sobreconcentración de amonio, se decidió volver a realizar ambos ensayos, sólo que en este caso se determinó la concentración de amonio y nitratos en el sistema de cultivo y en la trampa. En ambos ensayos de pH, se encontró que durante las 24 horas de incubación se perdió cerca del 35 %

del nitrato total, siendo éste entre 0.6 y 1 mg $\text{N-NO}_3^- \cdot \text{l}^{-1}$, y en ambos casos la concentración mínima de nitratos llegó a cerca de 1.7 mg $\text{N-NO}_3^- \cdot \text{l}^{-1}$. En lo que concierne a los valores de concentración de amonio, se encontró que para ambos ensayos de pH, las concentraciones de este ion fueron superiores a los iniciales, siendo para el ensayo de pH 8.5 de tan solo 110 % y para el ensayo de pH 9.5 este fue de 136 % (tablas VI y VII).

Tabla VI.- Valores promedio y desviación estándar de la concentración de amonio (N-NH_4^+) y nitrato (N-NO_3^-), en $\text{mg N} \cdot \text{l}^{-1}$, a un pH de 8.5, con la formulación completa del medio de cultivo durante un ciclo de luz-obscuridad, se muestran las concentraciones del cultivo simulado (sin microalgas), de la trampa, las concentraciones totales, los porcentajes totales explicados y los porcentajes presentes en la trampa.

Hora	Medio		Trampa		Total		% Explicado		% en Trampa	
	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃ ⁻
0:10	39.83 (0.38)	1.87 (0.21)	0.12 (0.38)	0.83 (0.06)	39.95	2.70	100.00	100.00	0.30	30.74
4:00	40.92 (1.63)	1.63 (0.21)	0.93 (0.17)	0.60 (0.10)	41.85	2.23	104.76	82.59	2.33	22.22
8:00	41.00 (1.39)	1.37 (0.31)	1.30 (0.29)		42.30	-	105.88	-	3.25	-
12:00	40.83 (0.52)	1.73 (0.25)	2.12 (0.08)	0.70 (0.10)	42.95	2.43	107.51	90.00	5.31	25.93
16:00	39.83 (0.80)	1.40 (0.10)	3.10 (0.22)	0.43 (0.15)	42.93	1.83	107.46	67.78	7.76	15.93
20:00	39.83 (1.01)	1.00 (0.17)	3.95 (0.13)		43.78	-	109.59	-	9.89	-
24:00	38.83 (1.38)	1.33 (0.15)	4.25 (0.30)	0.40 (0.10)	43.08	1.73	107.84	64.07	10.64	14.82

Tabla VII.- Valores promedio y desviación estándar de la concentración de amonio (N-NH_4^+) y nitrato (N-NO_3^-), en $\text{mg N} \cdot \text{l}^{-1}$, a un pH de 9.5, con la formulación completa del medio de cultivo durante un ciclo de luz-obscuridad, se muestran las concentraciones del cultivo simulado (sin microalgas), de la trampa, las concentraciones totales, los porcentajes totales explicados y los porcentajes presentes en la trampa.

Hora	Medio		Trampa		Total		% Explicado		% en Trampa	
	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃ ⁻
0:15	40.92 (1.01)	1.73 (0.12)	0.51 (0.13)	0.60 (0.10)	41.43	2.32	100.00	100.00	1.23	25.86
4:00	43.34 (1.18)	1.40 (0.20)	1.75 (0.12)	-	45.09	-	108.83	-	4.22	-
8:00	41.08 (0.29)	1.20 (0.00)	4.50 (0.13)	0.33 (0.06)	45.58	1.53	110.02	65.95	10.86	14.22
12:00	40.92 (2.47)	1.07 (0.06)	7.90 (0.57)	-	48.82	-	117.84	-	19.07	-
16:00	39.67 (0.88)	1.13 (0.06)	11.08 (0.38)	0.50 (0.10)	50.75	1.63	122.50	70.26	26.74	21.55
20:00	39.42 (0.80)	1.50 (0.30)	13.25 (0.90)	-	52.67	-	134.37	-	31.98	-
24:00	40.08 (1.67)	1.17 (0.06)	16.00 (0.25)	0.53 (0.06)	56.08	1.70	135.36	73.28	38.62	22.84

III.3. Cultivos semicontínuos de las especies seleccionadas.

III.3.1. *Scenedesmus obliquus* (SC-O-1).

La gráfica de las lecturas de densidad óptica, antes y después de la dilución, de los cultivos de SC-O-1 (fig. 5), indica que los cultivos se mantuvieron estables con una tasa de dilución del 30 %, y que la concentración de la biomasa presentaba una fuerte tendencia a disminuir con el tiempo con la tasa de dilución del 40 %.

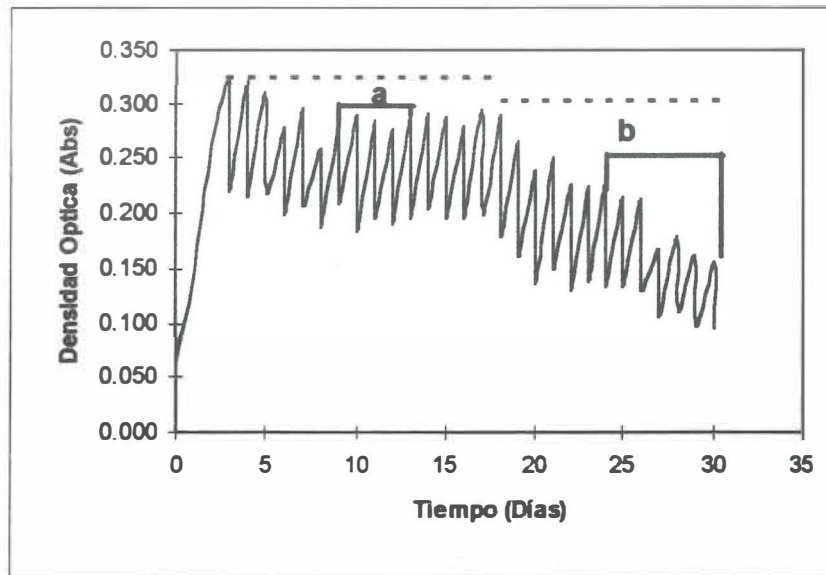


Figura 5.- Valores promedio de la densidad óptica, antes y después de diluir, de cultivos semicontínuos de *Scenedesmus obliquus* (SC-O-1), en medio de agua residual sintética (ARS), con ciclos de luz obscuridad y bajo dos factores de dilución 30 (a) y 40% (b). — los días de toma de muestras y --- los días que duró la dilución.

Los valores de pH variaron de acuerdo al comportamiento esperado: ya que a lo largo de la fase de luz aumentaron progresivamente desde 8.2 ± 0.2 hasta 10.10 ± 0.2 para el factor de dilución de 30 %. En el caso del factor de dilución de 40%, el pH se incrementó desde 7.6 ± 0.1 a 8.9 ± 0.2 , hasta el inicio de la fase de obscuridad, cuando revirtió su tendencia descendiendo a valores similares a los del inicio de la fase de luz (fig. 6).

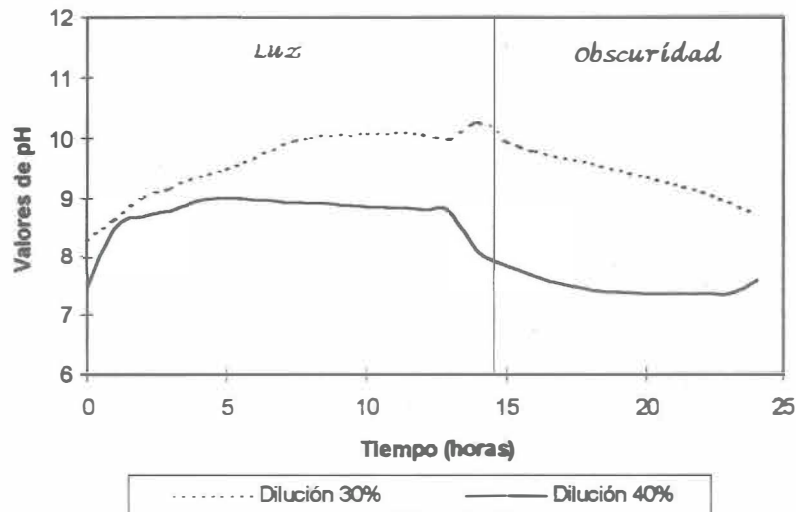


Figura 6.- Valores de pH en cultivos semicontínuos de *Scenedesmus obliquus* (SC-O-1), en medio de agua residual sintética (ARS), con ciclos de luz oscuridad y bajo dos factores de dilución (30 y 40 %).

III.3.2. *Scenedesmus* sp. (SC-X-2).

Aunque con algunas irregularidades, los cultivos se mantuvieron estables con los tres factores de dilución (30, 40 y 50%) ensayados (fig. 7). En vista de las irregularidades mencionadas, la estabilidad de los cultivos se comprobó mediante pruebas de significancia de la pendiente $\beta=0$, que se realizaron con los valores promedio de la densidad óptica (Abs.) (Daniel, 1977). Para las diluciones de 30, 40 y 50% los valores de "F" observados (0.00895, 0.00057 y 0.04428, respectivamente) fueron menores de los tabulados (5.19 para los tres casos), que indica que la pendiente no fue significativamente diferente de cero con respecto al tiempo.

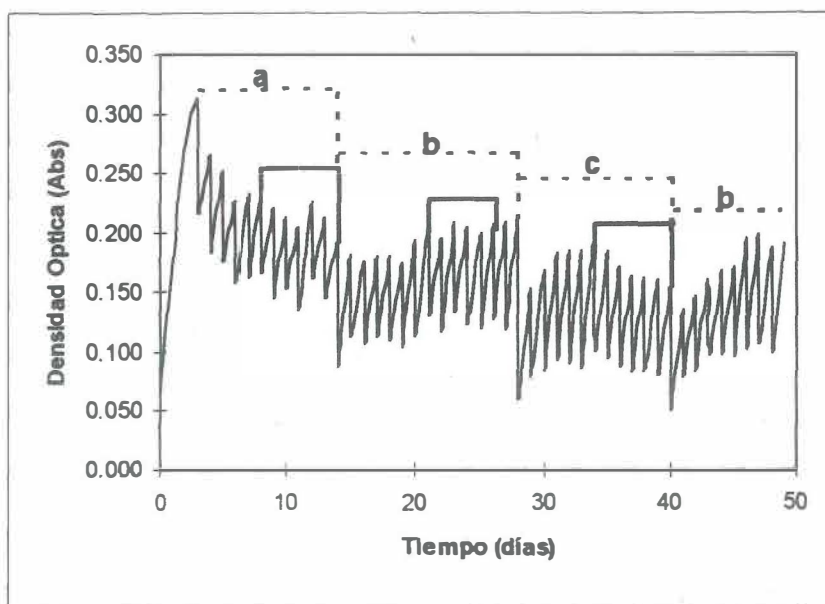


Figura 7.- Valores promedio de la densidad óptica, antes y después de diluir, de cultivos semicontínuos de *Scenedesmus sp.* (SC-X-2), en medio de agua residual sintética (ARS), con ciclos de luz oscuridad y bajo tres factores de dilución 30 (a), 40 (b) y 50%(c), — los días de toma de muestras y - - - los días que duró la dilución.

La variación del pH fue similar a la de la microalga anterior. Para el caso de la dilución de 30%, los valores iniciales de pH oscilaron alrededor de 8.1 ± 0.2 y aumentaron rápidamente, alcanzando su máximo, de 9.25 ± 0.2 , aproximadamente dos horas después del inicio de la fase de luz. Posteriormente el pH se mantuvo cerca de esos valores hasta el término de la fase de luz, cuando el valor medio fue de 9.1 ± 0.1 . Durante la fase de oscuridad el pH fue decreciendo lentamente hasta alcanzar valores de 7.8 ± 0.2 al final de esa fase. Los valores de pH observados en la dilución del 40 % fueron 7.4 ± 0.2 al inicio de la fase de luz, que se incrementaron hasta 9.2 ± 0.2 al final de esa fase, y disminuyeron a valores de 8.3 ± 0.2 al tiempo del inicio del nuevo ciclo (fig. 8). En el caso de la dilución de 50 % se encontraron los valores más bajos de todas las pruebas. Al inicio de la fase de luz el pH registraba valores de 7.4 ± 0.1 , al final del ciclo de luz fue de 8.6 ± 0.2 y por último al final del ciclo de oscuridad fue de 7.9 ± 0.2 (fig. 8).

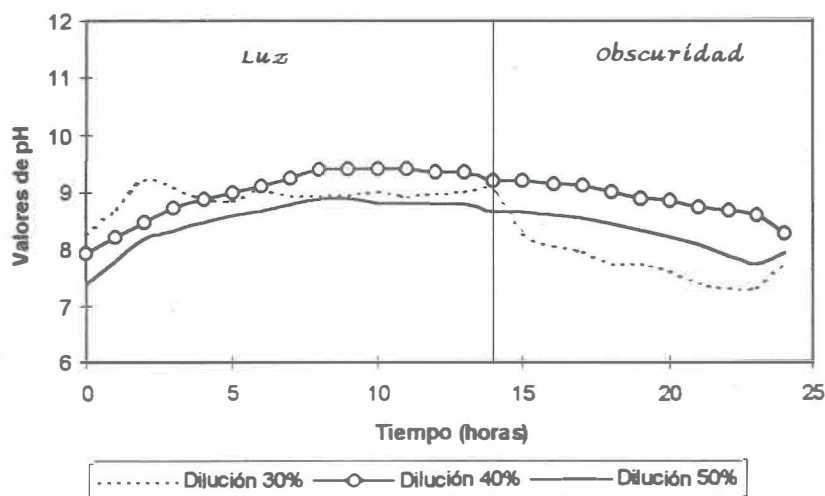


Figura 8.- Valores de pH en cultivos semicontínuos de *Scenedesmus sp.* (SC-X-2), en medio de agua residual sintética (ARS), con ciclos de luz oscuridad y bajo tres factores de dilución (30, 40 y 50%).

III.4. Determinación de macronutrientes

III.4.1. *Scenedesmus obliquus* (SC-O-1)

III.4.1.1. Amonio

Los valores promedio de amonio calculados para los cinco días de muestreo en la dilución del 30 %, indican que, al final del periodo de iluminación, la concentración de nitrógeno amoniacal en el medio de cultivo disminuyó aproximadamente $4.5 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{l}^{-1}$ y que, durante la fase nocturna, hubo una disminución adicional de poco más de $1.5 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{l}^{-1}$. Por otro lado, el amonio captado por la trampa fue superior al que desapareció del recipiente de cultivo. De forma tal que el balance de amonio resultó positivo lo cual indica que, durante los ciclos de luz-oscuridad considerados la función de las microalgas no fue la de asimilación del amonio en solución, sino la de causar su liberación a la atmósfera en forma gaseosa y en alguna manera de enriquecer el medio con cantidades adicionales de

amonio. La cantidad de amonio liberada como NH_3 fue en promedio de $5.12 \text{ N-NH}_4^+ \cdot \text{l}^{-1}$ durante el día y de poco más de $1.5 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{l}^{-1}$ en la noche, (tabla VIII a).

Con la dilución del 40%, el balance del amonio resultó negativo, demostrando una utilización global de cerca de $1 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{l}^{-1}$, ligeramente más alta en la luz que en la obscuridad. La cantidad de amonio en la trampa fue superior a la asimilada por las microalgas en poco más de tres veces. Con captación máxima durante el periodo de luz y mínima en la obscuridad durante la cual, se notó, en varias ocasiones, una disminución de la concentración de amonio con respecto al valor medido después de la fase luminosa (tabla VIII b).

Tabla VIII.- Valores de concentración de amonio en $\text{mg N-NH}_4^+ \cdot \text{l}^{-1}$: inicial (I), final periodo de luz (FPL), final en trampa periodo de luz (TPL), explicada periodo de luz (ΣPL), asimilación periodo de luz (ΔPL), final periodo de obscuridad (FPO), total en trampa al final del periodo de obscuridad (TPO), explicada periodo de obscuridad (ΣPO), asimilación periodo de obscuridad (ΔPO), y diferencia entre los valores iniciales y los medidos al final del ciclo de luz-obscuridad (Δ), en los recipientes con cultivos semicontinuos de *Scenedesmus obliquus* (SC-O-1), con diluciones diarias del 30 (a) y del 40 % (b).

a)

Día	I	FPL	TPL	ΣPL	ΔPL	FPO	TPO	ΣPO	ΔPO	Δ
1	27.25 (0.87)	22.50 (0.66)	4.83 (0.80)	27.33	-	21.58 (0.52)	5.67 (0.52)	27.25	-	5.67
2	27.12 (0.36)	23.00 (2.84)	4.75 (1.39)	27.75	-	21.42 (1.04)	6.42 (0.14)	27.84	-	5.70
3	27.01 (0.72)	21.92 (0.80)	5.25 (0.43)	27.17	-	20.17 (0.95)	6.92 (0.38)	27.09	-	6.84
4	26.14 (0.66)	23.25 (0.66)	6.08 (0.52)	29.33	-	20.42 (0.29)	7.08 (0.29)	27.50	-	5.72
5	26.31 (0.20)	20.83 (0.14)	4.67 (0.58)	25.50	0.81	19.67 (0.14)	7.17 (0.52)	26.84	-	6.64
X	26.76 (0.51)	22.30 (0.97)	5.12 (0.59)	27.42 (1.37)	-	20.65 (0.82)	6.65 (0.62)	27.30 (0.38)	-	6.11 (0.52)

b)

Día	I	FPL	TPL	ΣPL	ΔPL	FPO	TPO	ΣPO	ΔPO	Δ
1	29.83 (1.38)	25.75 (0.25)	4.25 (0.25)	30.00	-	26.25 (0.50)	6.42 (0.14)	32.67	-	3.58
2	31.83 (0.29)	26.83 (0.52)	3.58 (0.29)	30.41	1.42	25.75 (0.00)	3.75 (0.00)	29.50	0.91	6.08
3	31.53 (0.00)	26.83 (1.15)	3.00 (0.66)	29.83	1.70	22.75 (0.25)	2.50 (0.25)	25.25	4.58	8.78
4	29.77 (0.15)	29.08 (0.29)	3.17 (0.29)	32.25	-	28.42 (0.29)	2.83 (0.14)	31.25	1.00	1.35
5	33.10 (0.17)	28.75 (0.43)	2.75 (0.25)	31.50	1.60	29.83 (0.76)	2.92 (0.52)	32.75	-	3.27
6	33.94 (0.45)	27.92 (1.13)	4.42 (2.67)	32.34	1.60	29.83 (0.38)	3.25 (0.00)	33.08	-	4.11
X	31.67 (1.69)	27.53 (1.28)	3.53 (0.68)	31.06 (1.12)	1.05 (0.82)	27.14 (2.76)	3.61 (1.44)	30.75 (3.01)	1.08 (1.78)	4.52 (2.35)

III.4.1.2. Nitratos

La concentración de nitratos presentó una disminución, durante el periodo de iluminación, de 3.64 mg N-NO₃⁻•l⁻¹ para la dilución del 30% y de 4.11 mg N-NO₃⁻•l⁻¹ para la dilución del 40%. En 24 horas se observó en promedio una asimilación de 2.63 y 3.79 mg N-NO₃⁻•l⁻¹ (tabla IX), con los factores de dilución de 30 y 40 %, respectivamente. Otro comportamiento relevante, es la renovación de este ión durante el periodo de oscuridad, ya que su concentración fue superior a la medida al final de la fase de luz, con una diferencia media de -0.36 y -0.28 mg•l⁻¹ de N-NO₃, para las diluciones del 30 y del 40%, respectivamente. Sin embargo, falta comprobar si esta utilización aparente es real y si la cantidad de N faltante corresponde a la asimilada por la microalga, o fue reducida a amonio y se perdió en forma gaseosa, como se observó en las pruebas de cuantificación de amonio en situación simulada de cultivo (tabla VIII).

Tabla IX.- Valores de concentración de nitratos en mg N-NO₃⁻•l⁻¹: inicial (I), final periodo de luz (FPL), desaparición al final del periodo de luz (Δ PL), final periodo de oscuridad (FPO), desaparición al final del periodo de oscuridad (Δ PO), y diferencia entre el inicio y final de los periodos de luz y oscuridad en los recipientes de cultivo (Δ), durante los cultivos semicontinuos de *Scenedesmus obliquus* (SC-O-1), con diluciones diarias de 30 (a) y 40% (b).

a)

Día	I	FPL	Δ PL	FPO	Δ PO	Δ
1	-	1.40 (0.17)	-	2.27 (1.01)	-	-
2	5.17 (0.70)	1.37 (0.12)	3.80	1.93 (0.35)	-0.56	3.24
3	4.94 (0.24)	1.13 (0.21)	3.81	2.33 (0.23)	-1.20	2.61
4	5.22 (0.16)	1.67 (0.12)	3.55	1.47 (0.06)	0.20	3.75
5	4.61 (0.04)	1.20 (0.10)	3.41	1.07 (0.21)	0.13	3.54
X	4.99 (0.28)	1.35 (0.21)	3.64 (0.20)	1.81 (0.54)	-0.36 (0.66)	2.63 (1.37)

Tabla IX.- Continuación.

b)

Día	I	FPL	Δ PL	FPO	Δ PO	Δ
1	-	1.20 (0.20)	-	1.27 (0.06)	-0.07	-
2	5.61 (0.03)	1.47 (0.32)	4.14	1.63 (0.15)	-0.16	3.98
3	5.82 (0.09)	1.57 (0.15)	4.25	1.73 (0.42)	-0.16	4.09
4	5.88 (0.25)	1.87 (0.29)	4.01	2.13 (0.12)	-0.26	3.75
5	6.12 (0.07)	2.00 (0.17)	4.12	2.33 (0.32)	-0.33	3.79
5	6.23 (0.19)	2.20 (0.36)	4.03	2.90 (0.44)	-0.70	3.33
X	5.93 (0.25)	1.72 (0.37)	4.11 (0.10)	2.00 (0.58)	-0.28 (0.22)	3.79 (0.29)

III.4.1.3. Nitritos

En la tabla X se observa que la concentración de nitritos en los cultivos semicontínuos de SC-O-1, con los dos factores de dilución probados, fue baja. Aunque estos compuestos no son parte de la formulación original del medio, estuvieron constantemente presentes en el sistema de cultivo. Por ser los nitritos una forma de transición en los procesos de transformación de los nitratos a amonio y viceversa, su presencia es una prueba indirecta de la ocurrencia de uno o de ambos procesos en los cultivos.

Tabla X.- Valores de concentración de nitritos en $\text{mg N-NO}_2 \cdot \text{l}^{-1}$: final periodo de luz (FPL) y final periodo de oscuridad (FPO), en cultivos semicontínuos de *Scenedesmus obliquus* (SC-O-1), con diluciones diarias de 30 y 40%.

Día	FPL		FPO	
	30 %		40%	
1	0.015 (0.0030)	0.012 (0.0015)	0.022 (0.0006)	0.013 (0.0010)
2	0.013 (0.0006)	0.016 (0.0006)	0.020 (0.0012)	0.014 (0.0021)
3	0.013 (0.0006)	0.018 (0.0017)	0.014 (0.0012)	0.012 (0.0025)
4	0.019 (0.0025)	0.013 (0.0017)	0.015 (0.0017)	0.015 (0.0020)
5	0.016 (0.0030)	0.016 (0.0026)	0.012 (0.0017)	0.014 (0.0035)
6			0.016 (0.0012)	0.012 (0.0006)
X	0.015 (0.0022)	0.015 (0.0022)	0.016 (0.0035)	0.013 (0.0011)

III.4.1.4. Fosfatos

Las concentraciones promedio de los fosfatos reactivos al final del ciclo de luz fueron 0.41 y 4.37 mg P-PO₄⁻³•l⁻¹ para las diluciones del 30 % y del 40 %, respectivamente. En la obscuridad aumentaron cerca de 1.02 y 0.27 mg P-PO₄⁻³•l⁻¹. La diferencia promedio entre la concentración inicial y la medida al final del ciclo de luz fue de 2.03 y 0.20 mg P-PO₄⁻³•l⁻¹, para cada dilución, respectivamente (tabla XI), por lo cual se puede inferir que existe una asimilación real, condicionada a la presencia de una fuente de energía lumínica. Mientras que, el aumento nocturno de fósforo probablemente se debió a la lisis celular o a la eliminación de reservas ya que la hipótesis de una precipitación de fosfatos insolubles durante el día y su solubilización nocturna por cambios de pH, no pudo ser comprobada. Los análisis de determinación de fósforo total e hidrolizable, corregidos por el contenido de fósforo reactivo, dieron por lo general lecturas cercanas a cero, demostrando que estos procesos, cuando existen, son el resultado de variaciones de pH más importantes o más estables de las medidas en nuestros ensayos, aunque hay que considerar la posibilidad de adhesión de fosfatos insolubles a las células y/o a las paredes del recipiente y la consiguiente imposibilidad de detectarlos en el medio de cultivo.

Tabla XI.- Valores de concentración de fosfatos reactivos en mg P-PO₄⁻³•l⁻¹: inicial (I), final periodo de luz (FPL), asimilación final periodo luz (ΔPL), final periodo de obscuridad (FPO), asimilación final periodo de obscuridad (ΔPO) y diferencia entre el inicio y el final de los periodos de luz y obscuridad en los recipientes de cultivo (Δ), en cultivos semicontínuos de *Scenedesmus obliquus* (SC-O-1), con diluciones diarias de 30 (a) y 40% (b).

a)

Día	I	FPL	ΔPL	FPO	ΔPO	Δ
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	1.76 (0.23)	-	-
3	2.58 (0.16)	0.42 (0.05)	2.16	1.46 (0.05)	-1.04	1.12
4	2.37 (0.04)	0.38 (0.03)	1.99	1.44 (0.71)	-1.06	0.93
5	2.35 (0.49)	0.42 (0.19)	1.93	1.04 (0.23)	-0.62	1.31
X	2.43 (0.13)	0.41 (0.02)	2.03 (0.12)	1.43 (0.30)	-0.91 (0.25)	1.12 (0.19)

Tabla XI. - Continuación.

b)

Día	I	FPL	Δ PL	FPO	Δ PO	Δ
1	3.58 (0.26)	-	-	5.00 (0.18)	-	-1.42
2	4.78 (0.10)	4.21 (1.66)	0.57	3.04 (0.53)	1.17	1.74
3	3.62 (0.31)	3.67 (0.25)	-0.05	5.23 (1.30)	-1.56	-1.61
4	4.92 (0.77)	4.60 (0.61)	0.32	4.63 (0.46)	-0.03	0.29
5	4.56 (0.27)	4.68 (0.30)	-0.12	5.38 (0.49)	-0.70	-0.82
6	5.00 (0.29)	4.70 (0.33)	0.30	4.55 (0.28)	0.15	0.45
X	4.41 (0.65)	4.37 (0.44)	0.20 (0.29)	4.64 (0.85)	-0.19 (1.02)	-0.23 (1.29)

III.4.2. *Scenedesmus* sp. (SC-X-2)

III.4.2.1. Amonio

La concentración de amonio en los cultivos de SC-X-2, bajo los tres factores de dilución probados (30, 40 y 50%), disminuyó con el tiempo en los recipientes de cultivo y aumentó en las trampas (tabla XII). Se observó nuevamente que los valores de asimilación por parte de las microalgas eran bajos o nulos (tabla XII) y que la única forma en que éstas contribuían a la disminución de la concentración era en la liberación de amonio, debida al aumento de los valores de pH, que a su vez provocaba una mayor transformación de este ión a la forma gaseosa (amoniaco). La pérdida total de $N-NH_4^+$ registrada en las trampas fue de 4.07, 7.88 y 6.40 mg $N-NH_4 \cdot l^{-1}$ para las diluciones del 30, 40 y 50 %, respectivamente (tabla XII).

Tabla XII.- Valores de concentración de amonio en $\text{mg N-NH}_4^+\cdot\text{l}^{-1}$: inicial (I), final periodo de luz (FPL), final en trampa periodo de luz (TPL), explicada periodo de luz (ΣPL), asimilación periodo de luz (ΔPL), final periodo de obscuridad (FPO), final en trampa periodo de obscuridad (TPO), explicada periodo de obscuridad (ΣPO), asimilación periodo de obscuridad (ΔPO), y diferencia entre los periodos de luz y obscuridad en los recipientes de cultivo (Δ), en cultivos semicontínuos de *Scenedesmus* sp.(SC-X-2), con diluciones diarias de cultivo de 30 (a), 40 (b) y 50% (c).

a)

Día	I	FPL	TPL	ΣPL	ΔPL	FPO	TPO	ΣPO	ΔPO	Δ
1	31.83 (1.63)	27.58 (0.88)	3.67 (0.14)	31.25	0.58	27.50 (1.25)	4.17 (0.29)	31.67	0.16	4.33
2	31.24 (0.87)	27.58 (1.42)	4.67 (0.58)	32.25	-1.01	27.25 (1.32)	3.50 (0.00)	30.75	0.49	3.99
3	31.07 (0.92)	28.33 (0.72)	3.50 (1.56)	31.83	-0.76	28.83 (0.76)	3.00 (1.32)	31.83	-0.76	2.24
4	32.17 (0.53)	28.50 (0.75)	4.25 (0.43)	32.75	-0.58	27.00 (1.56)	4.83 (0.14)	31.83	0.34	5.17
5	30.89 (1.09)	28.50 (0.50)	4.08 (0.29)	32.58	-1.69	26.67 (1.13)	4.83 (0.14)	31.50	-0.61	4.22
X	31.44 (0.54)	28.10 (0.48)	4.03 (0.47)	32.13 (0.61)	-	27.45 (0.83)	4.07 (0.81)	31.52 (0.45)	-	3.99 (0.96)

b)

Día	I	FPL	TPL	ΣPL	ΔPL	FPO	TPO	ΣPO	ΔPO	Δ
1	37.83 (2.75)	30.08 (1.23)	5.75 (0.35)	35.83	2.00	31.00 (2.14)	6.83 (3.54)	37.83	0.00	6.83
2	34.63 (1.26)	30.17 (1.38)	6.33 (0.14)	36.50	-1.87	30.08 (0.80)	7.92 (0.14)	38.00	-3.37	4.55
3	34.09 (0.47)	30.42 (0.95)	5.25 (0.25)	35.67	-1.58	31.83 (0.95)	8.08 (0.63)	39.91	-5.82	2.26
4	35.12 (0.56)	30.83 (0.76)	7.67 (0.76)	38.50	-3.38	30.92 (1.42)	8.67 (0.76)	39.59	-4.47	4.20
5	34.58 (0.84)	30.25 (0.25)	7.00 (0.25)	37.25	-2.67	30.33 (0.52)	7.92 (0.14)	38.25	-3.67	4.25
X	35.25 (1.49)	30.35 (0.30)	6.40 (0.96)	36.75 (1.16)	-	30.83 (0.68)	7.88 (0.66)	38.72 (0.96)	-	4.41 (1.45)

c)

Día	I	FPL	TPL	ΣPL	ΔPL	FPO	TPO	ΣPO	ΔPO	Δ
1	45.83 (3.41)	37.33 (0.38)	6.83 (0.38)	44.16	1.67	36.58 (0.52)	8.25 (0.25)	44.83	1.00	9.25
2	38.21 (0.26)	34.83 (1.13)	6.50 (1.75)	41.33	-3.12	34.33 (0.80)	5.83 (0.52)	40.16	-1.95	3.88
3	37.08 (0.40)	33.25 (0.50)	5.17 (0.88)	38.42	-1.34	33.58 (2.13)	5.50 (0.00)	39.08	-2.00	3.50
4	36.71 (1.06)	31.33 (0.38)	5.58 (0.29)	36.91	-0.20	32.67 (2.24)	6.67 (0.38)	38.34	-2.63	4.04
5	36.25 (1.12)	40.83 (0.38)	5.00 (0.00)	45.83	-9.58	40.58 (0.14)	5.75 (0.25)	46.33	-10.98	-4.33
X	38.82 (3.99)	35.52 (3.70)	5.82 (0.81)	41.33 (3.75)	-	35.55 (3.16)	6.40 (1.12)	41.95 (3.38)	-	3.26 (4.35)

Como en el caso anterior, el balance de nitrógeno resultó positivo, lo que demuestra la existencia de procesos de denitrificación o de amonificación en los cultivos.

III.4.2.2. Nitratos

Al igual que con la microalga anterior, los valores de la concentración de nitratos en los cultivos semicontínuos de SC-X-2 (tabla XIII) disminuyeron durante el periodo de luz. El aumento observado al final del periodo de oscuridad con SC-O-1, fue menos marcado con esta especie. La asimilación del ión nitrato por parte de la microalga durante el periodo de luz, fue de 2.88, 4.43 y 4.05 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ para los factores de dilución de 30, 40 y 50%, respectivamente. Durante el periodo de oscuridad, sólo en la dilución del 30% hubo asimilación mientras que, las otras diluciones presentaron valores muy bajos o nulos (tabla XIII). La cantidad de nitrato removido o ausente del sistema de cultivo fue mayor para la dilución del 40%, de 4.35 $\text{mg N-NO}_3^- \cdot \text{l}^{-1}$, seguida de la del 50% que fue de 4.11 $\text{mg N-NO}_3^- \cdot \text{l}^{-1}$ y por último la de 30% que resultó de 3.05 $\text{mg N-NO}_3^- \cdot \text{l}^{-1}$ (tabla XIII), todas superiores a los valores que se obtuvieron con *Scenedesmus obliquus*.

Tabla XIII.- Valores de concentración de nitratos en $\text{mg N-NO}_3^- \cdot \text{l}^{-1}$: inicial (I), final periodo de luz (FPL), desaparición final periodo de luz (ΔPL), final periodo de oscuridad (FPO), desaparición final periodo de oscuridad (ΔPO), y diferencia entre el inicio y el final de los periodos de luz y oscuridad en los recipientes de cultivo (Δ), durante los cultivos semicontínuos de *Scenedesmus* sp. (SC-X-2), con diluciones diarias de 30 (a), 40% (b) y 50% (c).

a)

Día	I	FPL	ΔPL	FPO	ΔPO	Δ
1	-	1.27 (0.15)	-	1.17 (0.12)	0.10	-
2	4.40 (0.08)	1.53 (0.06)	2.87	1.23 (0.06)	0.30	3.17
3	4.45 (0.04)	1.40 (0.26)	3.05	1.47 (0.12)	-0.07	2.98
4	4.61 (0.08)	1.57 (0.42)	3.04	1.27 (0.06)	0.30	3.34
5	4.47 (0.04)	1.90 (0.10)	2.57	1.77 (0.40)	0.13	2.70
X	4.48 (0.09)	1.53 (0.24)	2.88 (0.22)	1.38 (0.24)	0.21 (0.11)	3.05 (0.27)

Tabla XIII. Continuación.

b)

Día	I	FPL	Δ PL	FPO	Δ PO	Δ
1	-	1.33 (0.12)	-	1.17 (0.06)	0.16	-
2	5.55 (0.03)	1.07 (0.06)	4.48	1.17 (0.06)	-0.10	4.38
3	5.55 (0.03)	1.10 (0.00)	4.45	1.27 (0.06)	-0.17	4.28
4	5.61 (0.03)	1.10 (0.17)	4.51	1.17 (0.12)	-0.07	4.44
5	5.55 (0.07)	1.27 (0.06)	4.28	1.27 (0.06)	0.00	4.28
X	5.57 (0.03)	1.15 (0.12)	4.43 (0.10)	1.19 (0.05)	-0.04 (0.13)	4.35 (0.08)

c)

Día	I	FPL	Δ PL	FPO	Δ PO	Δ
1	-	1.43 (0.057)	-	1.47 (.15)	-0.04	-
2	5.72 (0.09)	1.73 (0.06)	3.99	1.90 (0.10)	-0.17	3.82
3	5.98 (0.06)	1.70 (0.00)	4.28	1.63 (0.21)	0.07	4.35
4	5.82 (0.12)	1.70 (0.10)	4.12	1.53 (0.15)	0.02	4.29
5	5.76 (0.09)	1.97 (0.21)	3.79	1.77 (0.06)	0.20	3.99
X	5.82 (0.11)	1.71 (0.19)	4.05 (0.21)	1.66 (0.18)	-0.02 (0.14)	4.11 (0.25)

III.4.2.3. Nitritos

Los valores de la concentración de los nitritos en cultivos semicontínuos de SC-X-2, para los tres factores de dilución, no resultaron muy altos. Aunque estos compuestos están ausentes en la formulación original del medio de cultivo, se encontraron constantemente presentes en el sistema de cultivo. Como con la microalga anterior se puede considerar que su presencia, aunque en concentraciones muy bajas, indica la ocurrencia de procesos de nitrificación o de denitrificación o de ambos.

Tabla XIV.- Valores de concentración de nitritos en $\text{mg N-NO}_2^- \cdot \text{l}^{-1}$: final periodo de luz (FPL) y final periodo de obscuridad (FPO), en cultivos semicontínuos de *Scenedesmus sp.*(SC-X-2), con diluciones diarias de 30, 40% y 50%.

Día	30%		40%		50%	
	FPL	FPO	FPL	FPO	FPL	FPO
1	0.036 (0.0000)	0.029 (0.0021)	0.063 (0.0843)	0.012 (0.0006)	0.023 (0.0012)	0.024 (0.0072)
2	0.037 (0.0010)	0.029 (0.0015)	0.011 (0.0010)	0.011 (0.0015)	0.029 (0.0023)	0.021 (0.0025)
3	0.035 (0.0006)	0.031 (0.0015)	0.013 (0.0012)	0.010 (0.0010)	0.031 (0.0021)	0.031 (0.0017)
4	0.036 (0.0015)	0.039 (0.0015)	0.011 (0.0006)	0.011 (0.0012)	0.023 (0.0031)	0.015 (0.0051)
5	0.040 (0.0012)	0.040 (0.0017)	0.012 (0.0012)	0.012 (0.0012)	0.031 (0.0010)	0.028 (0.0015)
X	0.037 (0.0018)	0.034 (0.0054)	0.022 (0.0229)	0.012 (0.0008)	0.027 (0.0041)	0.024 (0.0062)

III.4.2.4. Fosfatos

Los valores de la concentración promedio de los fosfatos reactivos al final del periodo de luz fueron de 3.26, 2.15 y 3.03 $\text{mg P-PO}_4^{3-} \cdot \text{l}^{-1}$ para las diluciones del 30, 40 y 50%, respectivamente. En la obscuridad disminuyeron cerca de 0.58, 0.26 y 0.48 $\text{mg P-PO}_4^{3-} \cdot \text{l}^{-1}$. Las diferencias promedio entre la concentración inicial y la medida al final del ciclo de luz fueron de 0.03, 0.79 y 0.30 $\text{mg P-PO}_4^{3-} \cdot \text{l}^{-1}$ (tabla XV). Estas diferencias indican que la asimilación de fósforo es limitada y que sucede en presencia de una fuente de energía lumínica. Al igual que con la anterior especie de microalga, el aumento nocturno de la concentración de fósforo puede ser debida a lisis celular o a la eliminación de reservas, ya que no se pudo comprobar la hipótesis de una precipitación de fosfatos insolubles durante el día y de su solubilización nocturna que se pudieran dar debido a los cambios de pH señalados con anterioridad. En este caso también, los análisis de fósforo total e hidrolizable, corregidos por el contenido de fósforo reactivo, registraron valores cercanos a cero, demostrando que estos procesos, cuando existen, son el resultado de variaciones de pH.

Tabla XV.- Valores de concentración de fosfatos en $\text{mg P-PO}_4^{3-}\cdot\text{l}^{-1}$: inicial (I), final periodo de luz (FPL), asimilación final periodo luz (ΔPL), final periodo de oscuridad (FPO), asimilación final periodo de oscuridad (ΔPO) y diferencia entre los periodos de luz y oscuridad en los recipientes de cultivo (Δ), en cultivos semicontínuos de *Scenedesmus* sp. (SC-X-2), con diluciones diarias de 30 (a), 40% (b) y 50% (c).

a)						
Día	I	FPL	ΔPL	FPO	ΔPO	Δ
1	5.53 (0.16)	3.22 (0.32)	2.31	2.88 (0.24)	0.34	2.65
2	3.36 (0.16)	3.37 (0.42)	0.00	3.40 (0.26)	-0.03	-0.04
3	3.72 (0.18)	3.58 (0.49)	0.14	2.82 (0.10)	0.76	0.90
4	3.32 (0.07)	2.97 (0.15)	0.35	2.07 (0.10)	0.90	1.25
5	2.79 (0.07)	3.15 (0.69)	-0.36	2.20 (0.13)	0.95	0.59
X	3.75 (1.05)	3.26 (0.23)	-	2.67 (0.54)	0.58 (0.37)	-
b)						
Día	I	FPL	ΔPL	FPO	ΔPO	Δ
1	4.62 (3.05)	2.12 (0.67)	2.50	2.13 (0.29)	-0.01	2.49
2	3.09 (0.17)	1.88 (0.25)	1.21	1.85 (0.05)	0.03	1.24
3	2.92 (0.03)	2.75 (0.56)	0.17	1.72 (0.10)	1.03	1.20
4	2.84 (0.06)	1.70 (0.17)	1.14	1.82 (0.06)	-0.12	1.02
5	2.90 (0.03)	2.28 (1.10)	0.62	1.93 (0.36)	0.35	0.97
X	3.27 (0.76)	2.15 (0.40)	1.13 (0.88)	1.89 (0.15)	0.26 (0.47)	1.38 (0.63)
c)						
Día	I	FPL	ΔPL	FPO	ΔPO	Δ
1	5.90 (1.07)	3.17 (1.09)	2.73	2.20 (0.25)	0.97	3.70
2	3.13 (0.15)	2.92 (0.03)	0.21	2.60 (0.05)	0.32	0.53
3	3.36 (0.03)	3.22 (0.10)	0.14	2.82 (0.25)	0.40	0.54
4	3.49 (0.15)	2.52 (0.24)	0.97	2.32 (0.20)	0.20	1.17
5	3.20 (0.12)	3.33 (0.28)	-0.13	2.80 (0.10)	0.53	0.40
X	3.82 (1.17)	3.03 (0.32)	0.78 (1.16)	2.55 (0.28)	0.48 (0.30)	1.27 (1.39)

III.5. Composición de las microalgas

III.5.1. *Scenedesmus obliquus* (SC-O-1)

III.5.1.1. Proteínas

El valor promedio de producción de proteína en los cultivos de SC-O-1, a una dilución del 30 % durante el periodo de luz fue de $22.74 \text{ mg Prot.} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, y sólo se registró una producción de $2.18 \text{ mg Prot.} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ durante el periodo de oscuridad. La cantidad de proteína producida durante las 24 horas fue de $24.93 \text{ mg Prot.} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, equivalente a cerca de 3.99 miligramos de nitrógeno proteínico ($\text{Prot}/6.25$) por litro (tabla XVI). En el caso del factor de dilución del 40% se observaron valores menores, con una producción de $17.06 \text{ mg Prot.} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ durante el periodo de luz. Mientras que, durante el periodo de oscuridad se observó un decremento en la concentración de proteínas resultando al final del ambos periodos sólo una producción de $14.54 \text{ mg Prot.} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, que equivale a 2.33 miligramos de nitrógeno proteínico por litro (tabla XVI).

Tabla XVI.- Valores de concentración de proteínas, en $\text{mg Prot} \cdot \text{l}^{-1}$, inicial (I), periodo de luz (PL), producción durante el periodo de luz (ΔPL), final del periodo de oscuridad (PO), producción durante el periodo de oscuridad (ΔPO), total producido en ambos periodos (PP), y nitrógeno proteínico calculado, en $\text{mg N} \cdot \text{l}^{-1}$ (NPC), en cultivos semicontínuos de *Scenedesmus obliquus* (SC-O-1), con diluciones diarias de 30 (a) y 40% (b).

a)

Día	I	PL	ΔPL	PO	ΔPO	PP	NPC
1	49.99	71.27 (4.29)	21.28	73.36 (2.26)	2.09	23.37	3.74
2	51.35	70.34 (8.85)	18.99	71.73 (8.57)	1.39	20.38	3.26
3	50.21	75.91 (0.00)	25.70	76.37 (9.07)	0.46	26.16	4.19
4	53.46	77.18 (1.98)	23.72	79.74 (5.02)	2.56	26.28	4.20
5	55.82	79.85 (4.87)	24.03	84.26 (2.51)	4.41	28.44	4.55
X	52.16 (2.46)	74.91 (4.02)	22.74 (2.63)	77.09 (5.03)	2.18 (1.48)	24.93 (3.11)	3.99 (0.50)

Tabla XVI. Continuación.

b)

Día	I	PL	Δ PL	PO	Δ PO	PP	NPC
1	37.88	53.88 (7.14)	16.00	54.34 (7.58)	0.46	16.46	2.63
2	32.60	44.24 (2.74)	11.64	42.28 (7.48)	-1.96	9.68	1.55
3	25.37	42.91 (0.87)	17.54	-	-	-	-
4	48.54	47.55 (2.16)	-0.99	46.57 (1.64)	0.98	-1.97	-
5	27.94	50.98 (4.63)	23.04	45.41 (2.10)	5.57	17.47	2.80
X	34.46 (9.20)	47.91 (4.57)	17.06 (4.71)	47.15 (5.12)	-	14.54 (4.24)	2.33 (0.68)

III.5.1.2.- Carbohidratos.

En la tabla XVII se observan los valores de concentraciones de carbohidratos en los cultivos semicontínuos de SC-O-1. La mayor producción de carbohidratos, fue de 9.54 mg Carb. \bullet l⁻¹, durante el periodo de luz. Sin embargo, durante el periodo de obscuridad, la concentración decreció a un total de 6.99 mg Carb. \bullet l⁻¹, durante ambos periodos en la dilución del 30%. En cuanto a la dilución de 40%, se observaron valores menores con sólo 5.85 mg Carb. \bullet l⁻¹ durante el periodo de luz. Durante el periodo de obscuridad, al igual que con la dilución anterior, se registró un decremento en la concentración de carbohidratos, con sólo 4.03 mg Carb. \bullet l⁻¹ como producción final de carbohidratos al término de ambos periodos (tabla XVII).

Tabla XVII.- Valores de concentración de carbohidratos en mg Carb. \bullet l⁻¹, inicial (I), periodo de luz (PL), producción durante el periodo de luz (Δ PL), final del periodo de obscuridad (PO), producción durante el periodo de obscuridad (Δ PO) y total producida en ambos periodos (PP), en cultivos semicontínuos de *Scenedesmus obliquus* (SC-O-1), con diluciones diarias de 30 (a) y 40% (b).

a)

Día	I	PL	Δ PL	PO	Δ PO	PP
1	13.46	20.03 (0.80)	6.57	20.32 (0.41)	0.29	6.86
2	14.22	20.43 (1.22)	6.21	18.81 (1.40)	-1.62	4.59
3	13.17	21.28 (3.22)	8.11	18.72 (0.78)	-2.56	5.55
4	13.10	27.62 (1.68)	14.52	22.36 (1.81)	-5.26	9.26
5	15.65	27.93 (4.05)	12.28	24.34 (3.38)	-3.59	8.69
X	13.92 (1.06)	23.45 (3.96)	9.54 (3.68)	20.91 (2.41)	-	6.99 (1.99)

Tabla XVII.- Continuación.

b)

Día	I	PL	Δ PL	PO	Δ PO	PP
1	11.01	16.18 (0.64)	5.17	13.83 (1.34)	-2.35	2.82
2	8.30	15.31 (0.73)	7.01	14.52 (2.01)	-0.79	6.22
3	8.71	13.62 (0.56)	4.91		-	
4	12.24	16.12 (2.16)	3.88	13.06 (2.87)	-3.06	0.82
5	7.84	16.13 (1.93)	8.29	14.10 (2.80)	-2.03	6.26
X	9.62 (1.91)	15.47 (1.09)	5.85 (1.77)	13.87 (0.61)	-	4.03 (2.68)

III.5.1.3. Lípidos

En el caso del factor de dilución del 30 % encontramos valores de producción de lípidos al final del periodo de luz de $9.28 \text{ mg Líp} \cdot \text{l}^{-1}$, sin embargo, la producción real de lípidos durante ambos periodos fue de $7.35 \text{ mg Líp} \cdot \text{l}^{-1}$ (tabla XVIII). Para la dilución de el 40% se encontró una producción de $7.54 \text{ mg Líp} \cdot \text{l}^{-1}$ y al final de ambos periodos la producción de lípidos fue de $5.90 \text{ mg Líp} \cdot \text{l}^{-1}$ (tabla XVIII). La tendencia de los valores de concentración obtenidos en este componente bioquímico fue similar a la de los dos anteriores. Con valores mayores para el factor de dilución del 30 % con respecto a los observados en el factor de dilución del 40 %. Como para los carbohidratos las concentraciones de estos componentes bioquímicos decrecen durante el periodo de obscuridad, lo cual es de esperar ya que durante la noche no hay fotosíntesis y por eso la microalga hace uso de sus reservas.

Tabla XVIII.- Valores de concentración de lípidos, en mg Lip.·l⁻¹, inicial (I), del periodo de luz (PL), producción durante el periodo de luz (Δ PL), final del periodo de oscuridad (PO), producción durante el periodo de oscuridad (Δ PO) y total producido en ambos periodos (PP), en cultivos semicontínuos de *Scenedesmus obliquus* (SC-O-1), con diluciones diarias de 30 (a) y 40% (b).

a)

Día	I	PL	Δ PL	PO	Δ PO	PP
1	15.22	24.45 (1.52)	9.23	22.43 (3.71)	-2.02	7.21
2	15.70	24.11 (1.45)	8.41	23.29 (1.09)	-0.82	7.59
3	16.30	26.14 (4.78)	9.84	21.29 (1.12)	-4.85	4.99
4	14.90	25.03 (1.16)	10.13	25.51 (0.22)	0.48	10.61
5	17.86	26.66 (1.30)	8.80	24.21 (1.03)	-2.45	6.35
X	16.00 (1.17)	25.27 (1.09)	9.28 (0.71)	23.34 (1.62)	-	7.35 (2.08)

b)

Día	I	PL	Δ PL	PO	Δ PO	PP
1	15.58	21.44 (3.58)	5.86	20.02 (0.80)	-1.42	4.44
2	12.01	18.96 (1.99)	6.95	18.98 (1.12)	0.02	6.97
3	11.39	19.87 (2.15)	8.48		-	
4	17.70	16.74 (0.14)	-0.96	15.87 (0.00)	-0.87	-
5	9.52	18.40 (2.15)	8.88	15.80 (1.12)	-2.60	6.28
X	13.24 (3.32)	19.08 (1.74)	7.54 (1.40)	17.66 (2.15)	-	5.90 (1.31)

III.5.2. *Scenedesmus* sp. (SC-X-2)

III.5.2.1. Proteínas

Los valores de concentración de proteína en los cultivos semicontínuos de SC-X-2, con el factor de dilución del 30% fueron los más bajos: durante el periodo de luz se obtuvo una producción de 14.44 mg Prot.·l⁻¹, en esta dilución se observó también producción de proteínas durante el periodo de oscuridad, que fue de 4.21 mg Prot.·l⁻¹. Al final de los dos periodos la producción total fue de 17.69 mg Prot.·l⁻¹, equivalente a 2.83 mg de nitrógeno

proteínico producido (tabla XIX). En el caso de la dilución del 40%, se observó una producción de 21.20 mg Prot. \bullet l⁻¹ durante el periodo de luz, prácticamente igual a la producción final de ambos periodos, que resultó equivalente a 3.37 miligramos de nitrógeno proteínico (tabla XIX). El cultivo con un factor de dilución del 50% presentó un comportamiento similar al de la dilución anterior. Con un valor de producción de 21.56 mg Prot. \bullet l⁻¹ al final del periodo de luz. Sin embargo al final del ciclo de cultivo la producción disminuyó a 18.55 mg Prot. \bullet l⁻¹, equivalente a cerca de 3.00 miligramos de nitrógeno proteínico (tabla XIX).

Tabla XIX.- Valores de concentración de proteínas, en mg Prot. \bullet l⁻¹, inicial (I), periodo de luz (PL), producción durante el periodo de luz (Δ PL), final del periodo de oscuridad (PO), producción durante el periodo de oscuridad (Δ PO), total producida en ambos periodos (PP), y nitrógeno proteínico calculado, en mg N \bullet l⁻¹ (NPC), en cultivos semicontínuos de *Scenedesmus sp.* (SC-X-2), con diluciones diarias de 30 (a), 40% (b) y 50% (c).

a)							
Día	I	PL	Δ PL	PO	Δ PO	PP	NPC
1	47.41	62.56 (3.09)	15.15	65.81 (3.16)	3.25	18.40	2.94
2	46.07	61.02 (4.00)	14.95	66.94 (3.03)	5.92	20.87	3.34
3	46.86	59.75 (1.45)	12.89	63.46 (3.94)	3.71	16.60	2.66
4	44.42	58.83 (0.40)	14.41	58.25 (13.28)	-0.58	13.83	2.21
5	40.77	55.58 (1.61)	14.81	59.52 (6.24)	3.94	18.75	3.00
X	45.11 (2.67)	59.54 (2.62)	14.44 (0.91)	62.79 (3.81)	4.21 (1.18)	17.69 (2.64)	2.83 (0.42)

b)							
Día	I	PL	Δ PL	PO	Δ PO	PP	NPC
1	32.14	52.73 (0.44)	20.59	54.13 (1.02)	1.40	21.99	3.52
2	32.48	53.31 (1.93)	20.83	52.82 (1.74)	-0.49	20.34	3.25
3	31.69	50.07 (5.94)	18.38	50.12 (2.76)	0.05	18.43	2.95
4	30.07	49.92 (3.62)	19.85	49.44 (5.07)	-0.48	19.37	3.10
5	29.66	56.01 (5.33)	26.35	54.85 (2.05)	-1.16	25.19	4.03
X	31.21 (1.27)	52.40 (2.53)	21.20 (3.03)	52.27 (2.40)	-	21.06 (2.66)	3.37 (0.42)

Tabla XIX. Continuación.

c)

Día	I	PL	Δ PL	PO	Δ PO	PP	NPC
1	26.37	41.87 (4.12)	15.50	35.84 (2.32)	-6.03	9.47	1.52
2	17.92	41.87 (3.03)	23.95	41.78 (3.30)	-0.09	23.86	3.82
3	20.89	37.74 (2.13)	16.85	38.43 (4.10)	0.69	17.54	2.81
4	19.22	51.98 (16.04)	32.76	42.88 (1.51)	-9.10	23.66	3.79
5	21.44	40.17 (3.01)	18.73	39.36 (0.49)	-0.81	18.22	2.92
X	21.17 (3.20)	42.73 (5.44)	21.56 (7.04)	39.66 (2.79)	-	18.55 (5.87)	2.97 (0.94)

III.5.2.2. Carbohidratos

Los valores de concentración de carbohidratos de SC-X-2 en cultivos semicontínuos bajo los tres factores de dilución, presentaron la misma tendencia con respecto a la anterior microalga. Los carbohidratos producidos al final del periodo de luz fueron 8.17, 10.14 y 8.84 mg Carb. \bullet l⁻¹, para las diluciones del 30, 40 y 50%, respectivamente. Durante el periodo de obscuridad sólo se observó producción de carbohidratos para la dilución del 30%, que aumentaron a 10.10 mg Carb. \bullet l⁻¹, mientras que para las otras dos diluciones las concentraciones de carbohidratos decrecieron al final del periodo de obscuridad, a valores de 6.40 y 7.10 mg Carb. \bullet l⁻¹, para el 40 y 50% de dilución, respectivamente (tabla XX).

Tabla XX.- Valores de concentración de carbohidratos en $\text{mg Carb} \cdot \text{l}^{-1}$, inicial (I), periodo de luz (PL), producción durante el periodo de luz (ΔPL), final del periodo de oscuridad (PO), producción durante el periodo de oscuridad (ΔPO) y total producida en ambos periodos (PP), en cultivos semicontínuos de *Scenedesmus* sp. (SC-X-2), con diluciones diarias de 30 (a), 40% (b) y 50% (c).

a)

Día	I	PL	ΔPL	PO	ΔPO	PP
1	17.73	24.96 (3.45)	7.23	24.22 (1.45)	-0.74	6.49
2	16.95	32.76 (16.76)	15.81	30.71 (5.55)	-2.59	13.76
3	21.50	24.29 (2.38)	2.99	25.07 (3.03)	0.58	3.57
4	17.55	28.84 (2.80)	11.29	33.31 (4.59)	4.47	15.76
5	23.32	26.86 (4.44)	3.54	34.23 (7.09)	7.37	10.91
X	19.39 (2.79)	27.54 (3.41)	8.17 (5.41)	29.10 (4.29)	-	10.10 (5.04)

b)

Día	I	PL	ΔPL	PO	ΔPO	PP
1	9.57	15.52 (0.97)	5.95	14.41 (1.65)	-1.11	4.34
2	8.65	19.51 (1.44)	10.86	15.39 (4.88)	-4.12	6.74
3	9.23	20.44 (2.40)	11.21	16.77 (0.82)	-3.67	7.54
4	10.06	22.77 (1.15)	12.71	16.99 (1.24)	-5.78	6.93
5	10.19	20.17 (1.08)	9.98	16.12 (1.08)	-4.05	5.93
X	9.54 (0.63)	19.68 (2.63)	10.14 (2.54)	15.93 (1.05)	-	6.40 (1.04)

c)

Día	I	PL	ΔPL	PO	ΔPO	PP
1	6.42	13.79 (0.71)	7.37	11.86 (2.61)	-1.93	5.44
2	5.93	14.11 (0.45)	8.18	11.98 (0.47)	-2.13	6.05
3	5.99	13.04 (0.77)	7.05	12.18 (2.12)	-0.86	6.19
4	4.06	15.98 (1.50)	11.92	13.44 (0.77)	-2.54	9.38
5	6.72	16.42 (2.53)	9.70	15.17 (1.21)	-1.25	8.45
X	5.82 (1.04)	14.66 (1.45)	8.84 (2.00)	12.93 (1.40)	-	7.10 (1.71)

III.5.2.3. Lípidos

Los valores de concentración de lípidos en los cultivos semicontínuos de SC-X-2, con dos de los factores de dilución ensayados (30 y 50%), presentaron la misma tendencia que los anteriores componentes bioquímicos ya que no se observaron valores de producción durante el periodo de obscuridad, disminuyendo así la concentración final de lípidos. La producción de lípidos al final del periodo de luz fue de 10.22, 10.45 y 11.59 mg Líp•l⁻¹ en las diluciones del 30, 40 y 50%. Al final de ambos periodos la producción fue de 10.00, 11.89 y 8.23 mg Líp•l⁻¹, para las diluciones 30, 40 y 50%, respectivamente (tabla XXI). Una diferencia importante entre los tres factores de dilución fue que durante el periodo de obscuridad de la dilución del 40%, se registró una producción de 2.41 mg Líp•l⁻¹ (tabla XXI).

Tabla XXI.- Valores de concentración de lípidos, en mg Líp•l⁻¹, inicial (I), periodo de luz (PL), producción durante el periodo de luz (Δ PL), final del periodo de obscuridad (PO), producción durante el periodo de obscuridad (Δ PO) y total producido en ambos periodos (PP), en cultivos semicontínuos de *Scenedesmus* sp. (SC-X-2), con diluciones diarias de 30 (a), 40% (b) y 50% (c).

a)

Día	I	PL	Δ PL	PO	Δ PO	PP
1	26.67	34.32 (5.75)	7.65	31.35 (2.41)	-2.97	4.68
2	21.95	33.60 (1.41)	11.65	34.26 (4.09)	0.66	12.31
3	23.98	38.42 (3.32)	14.44	36.67 (4.31)	-1.75	12.69
4	25.67	35.10 (0.75)	9.43	41.49 (2.17)	6.39	15.82
5	29.04	36.97 (2.30)	7.93	33.54 (0.51)	-3.43	4.50
X	25.46 (2.69)	35.68 (1.98)	10.22 (2.84)	35.46 (3.86)	-	10.00 (5.12)

b)

Día	I	PL	Δ PL	PO	Δ PO	PP
1	20.55	32.00 (3.97)	11.45	29.67 (5.02)	-2.33	9.12
2	17.80	28.70 (0.28)	10.90	31.03 (3.56)	2.33	13.23
3	18.62	30.63 (1.60)	12.01	32.48 (0.42)	1.85	13.86
4	19.49	26.70 (3.79)	7.30	28.30 (1.09)	1.60	8.81
5	16.98	27.58 (1.09)	10.60	31.43 (1.64)	3.85	14.45
X	18.69 (1.40)	29.12 (2.17)	10.45 (1.84)	30.58 (1.62)	2.41 (1.01)	11.89 (2.71)

Tabla XXI. Continuación.

c)

Día	I	PL	Δ PL	PO	Δ PO	PP
1	21.15	28.86 (1.58)	7.71	26.29 (1.33)	-2.57	5.14
2	13.15	24.29 (1.25)	11.14	25.41 (2.29)	1.12	12.26
3	12.71	25.57 (1.69)	12.86	17.06 (2.38)	-8.51	4.35
4	5.69	22.04 (1.57)	16.35	17.54 (1.27)	-4.50	11.85
5	8.77	18.66 (0.91)	9.89	16.34 (0.72)	-2.32	7.57
X	12.29 (5.82)	23.88 (3.82)	11.59 (3.26)	20.53 (4.89)	-	8.23 (3.69)

III.6. Balance de Nitrógeno

III.6.1. *Scenedesmus obliquus* (SC-O-1)

La concentración inicial promedio de nitrógeno total después de la dilución diaria del sistema de cultivo fue de 31.63 y 37.97 mg N•l⁻¹, para los factores de dilución de 30 y 40 %, respectivamente. Estos valores, considerando la suma del nitrógeno en forma de nitrato y de amonio, disminuyeron a lo largo del ciclo de cultivo, a 22.48 y 29.15 mg N•l⁻¹, respectivamente. En base a la diferencia de las concentraciones inicial y final, se determinó la remoción de nitrógeno en los sistemas de cultivo. Con la dilución del 30%, en promedio, se liberó más nitrógeno del que se agregó, mientras que, con la dilución del 40% el comportamiento fue inverso ya que las concentraciones tendieron a aumentar en el tiempo (tabla XXII). Con la dilución del 30%, se observó una remoción promedio de nitrógeno de 9.50 mg N•l⁻¹, de la cual aproximadamente un 70% fue en forma de N-NH₃, recuperado por las trampas hechas para este fin, y en lo que respecta a la asimilación de las microalgas, en forma de nitrógeno proteínico, esta fue de 42%, (tabla XXII), Al realizar el balance de nitrógeno se observó una sobresaturación de nitrógeno del 12%. En el caso de la dilución del 40%, la remoción promedio de nitrógeno fue de 8.44 mg N•l⁻¹, de la cual aproximadamente un 28% fue recuperado por las trampas de amonio y cerca de 43% fue

asimilado por las microalgas y transformado a nitrógeno proteínico (tabla XXII). El resto del nitrógeno desaparecido (29%) no pudo ser explicado, tal vez debido a que este se encontraba en forma gaseosa dentro de los recipientes de cultivo.

Tabla XXII. Balance de nitrógeno en $\text{mg N}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, en cultivos semicontínuos de *Scenedesmus obliquus* (SC-O-1), con factores de dilución del 30 (a), y 40% (b), se muestran los valores de concentración de nitrógeno: total inicial (N-I), final en el medio de cultivo en forma de: nitratos (N-NO_3^-), amonio (N-NH_4^+) y nitritos (N-NO_2^-), sumatoria de los componentes nitrogenados al final del ciclo de cultivo (Σ_1), diferencia entre N-I y Σ_1 (Δ_1), asimilado y transformado como nitrógeno proteínico (N-Prot.), recuperado en forma de N-NH_3 por las trampas ($\text{N-NH}_4^+-\text{T}$), sumatoria de N-Prot y $\text{N-NH}_4^+-\text{T}$ (Σ_2) y nitrógeno no explicado (Δ_2).

a)

Día	N-I	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₂ ⁻	Σ ₁	Δ ₁	N-Prot.	N-NH ₄ ⁺ -T	Σ ₂	Δ ₂
1	-	2.27	21.58	0.012	23.86	-	3.74	5.67	9.41	-
2	32.29	1.93	21.42	0.016	23.37	8.92	3.26	6.42	9.68	-0.76
3	31.95	2.33	20.17	0.018	22.51	9.44	4.19	6.92	11.11	-1.67
4	31.36	1.47	20.42	0.013	21.90	9.46	4.20	7.08	11.28	-1.82
5	30.92	1.07	19.67	0.016	20.76	10.16	4.55	7.17	11.72	-1.56
X	31.63	1.81	20.65	0.015	22.48	9.50	3.99	6.65	10.64	-1.45
	(0.61)	(0.59)	(0.82)	(0.002)	(1.22)	(0.51)	(0.50)	(0.62)	(1.03)	(0.47)

b)

Día	N-I	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₂ ⁻	Σ ₁	Δ ₁	N-Prot.	N-NH ₄ ⁺ -T	Σ ₂	Δ ₂
1	-	1.27	26.25	0.013	27.53	-	2.63	6.42	9.05	-
2	37.44	1.63	25.75	0.014	27.39	10.05	1.55	3.75	5.30	4.75
3	37.35	1.73	22.75	0.012	24.49	12.86	-	2.50	-	-
4	35.65	2.13	28.42	0.015	30.57	5.08	-	2.83	-	-
5	39.22	2.33	29.83	0.014	32.17	7.05	2.80	2.92	5.72	1.33
6	40.17	2.90	29.83	0.012	32.74	7.43	-	3.25	-	-
X	37.97	2.00	27.14	0.013	29.15	8.44	2.33	3.61	6.69	3.04
	(1.76)	(0.58)	(2.76)	(0.001)	(3.21)	(3.01)	(0.68)	(1.44)	(2.05)	(2.42)

III.6.2. *Scenedesmus sp.* (SC-X-2)

La concentración inicial promedio de nitrógeno total después de la dilución diaria del sistema de cultivo fue de 35.83, 40.17 y 42.88 mg N•l⁻¹, para los factores de dilución de 30, 40 y 50%, respectivamente. Al final del ciclo de cultivo los valores disminuyeron a 28.87, 32.05 y 37.23 mg N•l⁻¹. Al determinar la remoción de nitrógeno en los cultivos, con los tres factores de dilución, se encontró que las concentraciones iniciales promedio de nitrógeno a lo largo de los días de toma de muestra, no presentaron variaciones considerables, por lo que podemos decir que la cantidad de nitrógeno que era agregada diariamente a los sistemas de cultivo era la misma que se removía (tabla XXIII). En la dilución del 30%, la remoción promedio de nitrógeno fue de 6.92 mg N•l⁻¹, de la cual un 59% fue en forma de N-NH₃, recuperado en las trampas, el 41% restante fue incorporado como nitrógeno proteínico por las microalgas (tabla XXIII). Para el caso de la dilución del 40%, en promedio, la cantidad de nitrógeno removido fue de 8.15 mg N•l⁻¹, de la cual el 96% fue recuperado por las trampas en forma de N-NH₃. Sin embargo, se encontró que el nitrógeno asimilado por las microalgas (nitrógeno proteínico) fue del 41% (tabla XXIII). En la dilución del 50%, la remoción promedio de nitrógeno fue de 5.86 mg N•l⁻¹, de la cual un 51% fue asimilado por las microalgas como nitrógeno proteínico. Sin embargo, al tratar de explicar la cantidad de nitrógeno removido en forma gaseosa, encontramos un comportamiento atípico, similar al de la dilución del 30% de la anterior microalga, solo que en este caso fue de mayor magnitud. Reportándose que las trampas de amonio, presentaron una mayor cantidad de nitrógeno del que había sido removido del cultivo (109%) (tabla XXIII). Algunas posibles explicaciones a este hecho, es que los recipientes en donde se recuperaba el nitrógeno en forma gaseosa (trampas) hayan estado o estuvieran siendo contaminados, o que el agua destilada utilizada también lo estuviera.

Tabla XXIII. Balance de nitrógeno en $\text{mg N}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, en cultivos semicontínuos de *Scenedesmus* sp. (SC-X-2), con factores de dilución del 30 (a), 40 (b) y 50% (c), se muestran los valores de concentración de nitrógeno: total inicial (N-I), final en el medio de cultivo en forma de: nitratos (N-NO_3^-), amonio (N-NH_4^+) y nitritos (N-NO_2^-), sumatoria de los componentes nitrogenados al final del ciclo de cultivo (Σ_1), diferencia entre N-I y Σ_1 (Δ_1), asimilado y transformado como nitrógeno proteínico (N-Prot.), recuperado en forma de N-NH_3 por las trampas ($\text{N-NH}_4^+\text{-T}$), sumatoria de N-Prot y $\text{N-NH}_4^+\text{-T}$ (Σ_2) y nitrógeno no explicado (Δ_2).

a)

Día	N-I	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₂ ⁻	Σ ₁	Δ ₁	N-Prot.	N-NH ₄ ⁺ -T	Σ ₂	Δ ₂
1	-	1.17	27.50	0.029	28.70	-	2.94	4.17	7.11	-
2	35.64	1.23	27.25	0.029	28.51	7.13	3.34	3.50	6.84	0.29
3	35.52	1.47	28.83	0.031	30.33	5.19	2.66	3.00	5.66	-0.47
4	36.78	1.27	27.00	0.039	28.31	8.47	2.21	4.83	7.04	1.43
5	35.36	1.77	26.67	0.040	28.48	6.86	3.00	4.83	7.83	-0.95
X	35.83	1.38	27.45	0.034	28.87	6.92	2.83	4.07	6.90	0.08
	(0.65)	(0.24)	(0.83)	(0.005)	(0.83)	(1.35)	(0.42)	(0.81)	(0.79)	(1.04)

b)

Día	N-I	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₂ ⁻	Σ ₁	Δ ₁	N-Prot.	N-NH ₄ ⁺ -T	Σ ₂	Δ ₂
1	-	1.17	31.00	0.012	32.18	-	3.52	6.83	10.35	-
2	40.18	1.17	30.08	0.011	31.26	8.92	3.25	7.92	11.17	-2.25
3	39.64	1.27	31.83	0.010	33.11	6.53	2.95	8.08	11.03	-4.50
4	40.73	1.17	30.92	0.011	32.10	8.63	3.10	8.67	11.77	-3.14
5	40.13	1.27	30.33	0.012	31.61	8.52	4.03	7.92	11.95	-3.43
X	40.17	1.19	30.83	0.012	32.05	8.15	3.37	7.88	11.25	-3.33
	(0.45)	(0.05)	(0.68)	(0.001)	(0.70)	(1.09)	(0.42)	(0.66)	(0.64)	(0.93)

c)

Día	N-I	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₂ ⁻	Σ ₁	Δ ₁	N-Prot.	N-NH ₄ ⁺ -T	Σ ₂	Δ ₂
1	-	1.47	36.58	0.024	38.07	-	1.52	8.25	9.77	-
2	43.93	1.90	34.33	0.021	36.25	7.68	3.82	5.83	9.65	-1.97
3	43.06	1.63	33.58	0.031	35.24	7.82	2.81	5.50	8.31	-0.49
4	42.53	1.53	32.67	0.015	34.22	8.31	3.79	6.67	10.46	-2.15
5	42.01	1.77	40.58	0.028	42.38	-0.37	2.92	5.75	8.67	-8.71
X	42.88	1.66	35.55	0.024	37.23	5.86	2.97	6.40	9.37	-3.31
	(0.82)	(0.18)	(3.16)	(0.006)	(3.21)	(4.16)	(0.94)	(1.12)	(0.87)	(3.66)

Como se puede observar en estos balances, las diferencias entre las fracciones de nitrógeno removido y explicado, ya sea por asimilación directa de las microalgas o por captura en la trampa de amonio, resultaron considerables. En relación al nitrógeno amoniacal se encontró una relación inversa entre las concentraciones de las dos formas (NH_4^+ y NH_3), que se presentan en una solución acuosa la cual está en función de los valores de pH del agua. Al aumentar el pH, aumentó la fracción no ionizada (NH_3) que puede ser difundida a la atmósfera, debido a la aireación constante de los sistemas de cultivo. Los cambios en los valores de pH durante los periodos de luz y oscuridad, en los diferentes días de muestreo, ocasionaron variación en una fracción importante del nitrógeno presente en el medio, como se demuestra a continuación:

Según Spotte y Adams (1983), la razón entre la concentración de N-NH_4^+ y N-NH_3 en el agua es:

$$1 + \text{antilogaritmo}(\text{pK} - \text{pH}) \quad (1)$$

en donde pK es el logaritmo negativo de la constante del equilibrio de las dos formas de nitrógeno:



Este equilibrio se ve afectado por la temperatura y la fuerza iónica según la siguiente fórmula:

$$pK = \frac{(0.09018 + 2727.92)}{((t + 273.1) + (0.1552 - (0.000314 * t)))} * I \quad (2)$$

en donde:

t = temperatura en grados Celsius

I = fuerza iónica

$$I = \frac{(19.973 * S)}{(1000 - (1.200519 * S))} \quad (3)$$

en donde:

S = total de sólidos disueltos, en partes por mil ($\text{gramos} \cdot \text{kg}^{-1}$)

En agua de mar S se expresa como salinidad pero en nuestro caso utilizamos la dureza total, que en la ciudad de Ensenada es cercana a uno, valor que se utilizó para la

ecuación 2, obteniendo, para las temperaturas de 17.5 y 25.5 °C, valores de pK de 9.3826 y 9.1315, respectivamente. Utilizando los valores de pK calculados anteriormente se obtienen las razones y porcentajes de nitrógeno amoniacal en forma gaseosa, que se resumen en la Tabla XXIV.

Tabla XXIV. Razón y valores de porcentaje entre $N-NH_4^+$ y $N-NH_3$ y porcentajes de NH_3 , a las diferentes temperaturas y valores de pH utilizados en los sistemas de cultivos y en la trampa de amonio.

pH	17.5		25.5	
	Razón	%	Razón	%
2.0	24.0X10+6	0.00	13.5X10+6	0.00
7.5	77.31	1.29	43.81	2.28
8.5	8.26	11.60	5.28	18.95
9.5	1.76	56.80	1.43	69.95

Como se puede notar, la forma gaseosa puede representar una fracción importante y resulta más clara la importancia de las microalgas en forma indirecta, como modificadoras del pH, que por su utilización directa al asimilar los iones de amonio.

III.7. Efecto del pH sobre la enterobacteria *Escherichia coli*

III.7.1. *Scenedesmus obliquus* (SC-O-1)

La concentración inicial promedio del inóculo de la enterobacteria *Escherichia coli* fue de aproximadamente $6X10^{+5} \pm 1.5X10^{+5} \bullet ml^{-1}$. Al transcurrir los periodos de luz y de obscuridad, la concentración de bacterias aumentó paulatinamente hasta alcanzar en todos los casos su máximo al final del periodo de obscuridad. A excepción del control de pH=8.5 para el cual la concentración de bacterias alcanzó su máximo de $6.5X10^{+6} \bullet ml^{-1}$ al final del

periodo de luz, y descendió al final del periodo de obscuridad a cerca de $5 \times 10^{+6} \bullet \text{ml}^{-1}$ (fig. 9), probablemente debido a la baja concentración de lactosa en el medio. En el cultivo de SC-O-1 el comportamiento fue diferente, ya que la concentración de *Escherichia coli* se mantuvo casi constante en ambos periodos (luz-obscuridad). Como el intervalo de los valores de pH de los cultivos fue similar al de los ensayos con el medio fresco y con el medio utilizado por las microalgas y no se observó un crecimiento considerable durante la fase de luz, probablemente esta microalga sintetiza constantemente algún tipo de substancia bacteriostática que mantiene a la enterobacteria en un nivel de concentración aproximadamente constante, ya que cultivando las bacterias en el medio de cultivo que esta utilizó, no se presenta el mismo comportamiento.

III.7.2. *Scenedesmus sp.* (SC-X-2)

La figura 10 indica las concentraciones iniciales promedio de la enterobacteria *Escherichia coli* en los cultivos de SC-X-2, en medio de cultivo utilizado y en medio fresco (control), además de las observadas al final del periodo de luz y al final del periodo de obscuridad con tres diferentes valores de pH (7.5, 8.5 y 9.5). La concentración inicial del inóculo fue de $5.0 \times 10^{+5} \pm 1.0 \times 10^{+5} \bullet \text{ml}^{-1}$. Al igual que con la microalga anterior en los ensayos con el medio usado por la microalga y con el medio fresco se observó que durante los periodos de luz y de obscuridad la concentración de bacterias aumentó en el caso de los controles de pH 7.5 y 9.5, alcanzando su máximo al final del periodo de obscuridad. Como en el caso anterior, el control de pH 8.5 alcanzó un máximo de $6.5 \times 10^{+6} \bullet \text{ml}^{-1}$ al final de la fase luminosa y descendió a cerca de $5 \times 10^{+6} \bullet \text{ml}^{-1}$ al final del periodo de obscuridad. Este comportamiento fue diferente para los ensayos realizados con el medio usado por la microalga, ya que las concentraciones de enterobacterias durante el periodo de obscuridad permanecieron casi constantes. Además, el comportamiento de las enterobacterias durante el cultivo con SC-X-2 fue diferente al de la otra microalga, ya que conforme transcurrían el periodo de luz y obscuridad la concentración de la enterobacteria disminuyó a valores

menores de $1.0 \times 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$ (fig. 10), que tal vez indica un probable efecto de antibiosis, provocando un ambiente adverso para *Escherichia coli*.

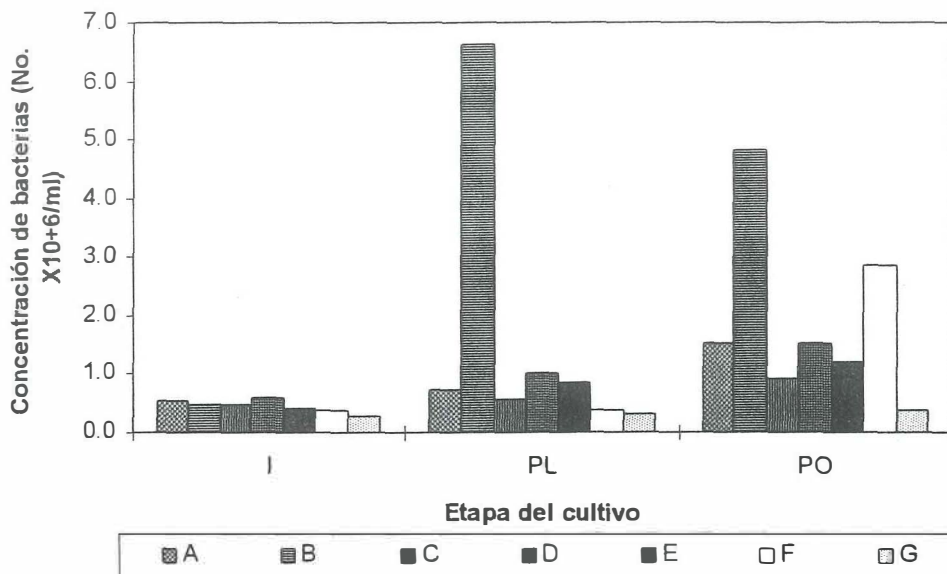


Figura 9.- Valores de concentración de la enterobacteria *Escherichia coli*, inicial (I), al final del periodo de luz (PL) y al final del periodo de oscuridad (PO), en tres diferentes ensayos y pH. Medio de cultivo fresco con pH de 7.5 (A), 8.5 (B) y 9.5 (C), medio de cultivo utilizado por *Scenedesmus obliquus* (SC-O-1), con pH de 7.5 (D), 8.5 (E) y 9.5 (F) y en cultivo de *Scenedesmus obliquus* (SC-O-1) (G).

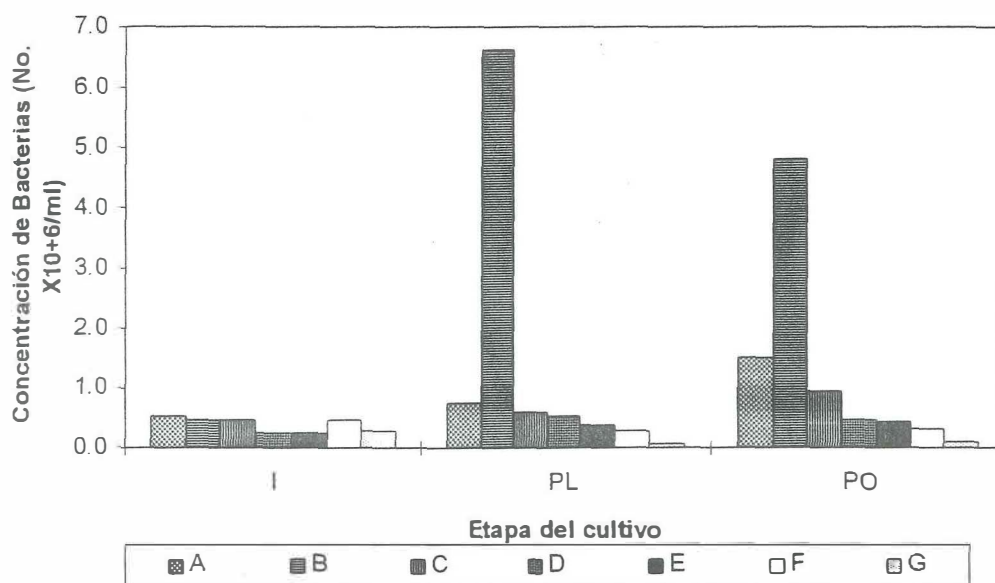


Figura 10.- Valores de concentración de la enterobacteria *Escherichia coli*, inicial (I), al final del periodo de luz (PL) y al final del periodo de oscuridad (PO), en tres diferentes ensayos y pH. Medio de cultivo fresco con pH de 7.5 (A), 8.5 (B) y 9.5 (C), medio de cultivo utilizado por *Scenedesmus sp.* (SC-X-2), con pH de 7.5 (D), 8.5 (E) y 9.5 (F) y en cultivo de *Scenedesmus sp.* (SC-X-2) (G).

IV.- DISCUSIONES

Los primeros autores que proponen y utilizan a las microalgas en el tratamiento de aguas residuales fueron Caldwell en 1946 y Oswald y Gotaas en 1957, cuando las lagunas facultativas eran la alternativa más viable durante esa época. Los tratamientos sólo se enfocaban en obtener efluentes de calidad para riego y las microalgas utilizadas pertenecían a los géneros *Spirulina*, *Phormidium*, *Chlorogonium*, *Chlamydomonas*, *Euglena*, *Chlorella* y *Scenedesmus*, entre otras.

En estudios llevados a cabo con anterioridad, Grobbelaar *et al.* (1990), Soto-Sainz (1993) y Cañizares-Villanueva (1994) entre otros, mencionan a diferentes especies del género *Scenedesmus* como especies con alto potencial para ser usadas en el tratamiento de aguas residuales, ya que presentan remociones que fluctúan entre el 85 y 100% del nitrógeno presente.

De la Noüe y Basseres (1989) encontraron que *Scenedesmus obliquus* presentaba mejores tiempos y tasas de remoción de amonio que *Chlorella sp.*, en donde ambas especies removieron el 100% de la concentración de amonio inicial, aunque los tiempos de tratamiento fueron muy largos (7 a 15 días), lo cual hace poco práctica su utilización en serie con plantas urbanas de tratamiento primario y secundario.

Al observar los factores utilizados en este trabajo, para la selección de dos cepas de microalgas con potencial para ser usadas en un tratamiento terciario de aguas residuales, encontramos que las dos especies del género *Scenedesmus* tardaron menos tiempo en alcanzar la producción de 1mg de biomasa celular, guardaron mejor relación entre su peso seco y su densidad óptica, y presentaron mayor resistencia a variaciones de pH.

Martin *et al.* (1985), Pouliot *et al.* (1989) y De la Noüe y Basseres (1989), reportaron que *Scenedesmus sp.*, cultivada en agua residual proveniente de granjas de cerdos, llega a remover cerca del 99% del amonio presente y que la mayor remoción se da en las primeras horas de cultivo. Al observar este comportamiento, estos autores se

formularon la hipótesis de que una fracción considerable del amonio presente en los medios de cultivo era removida en forma gaseosa, ya que solamente aireando y agitando los medios de cultivo reportaron pérdidas cercanas al 12% del amonio. Martin *et al.* (1985) mencionan remociones superiores a la producción del nitrógeno protéinico microalgal, lo cual puede tomarse como prueba indirecta de la hipótesis anterior. Esto fue posteriormente comprobado por Talbot y De la Noüe (1993), quienes reportan pérdidas del 38 al 100%, del nitrógeno amoniacal, debidas al burbujeo o agitación de los sistemas de cultivo.

En este trabajo encontramos pérdidas de la fracción nitrogenada del 11 al 29% debido a la combinación de la temperatura y el pH prevaleciente en los sistemas de cultivo. Martin *et al.* (1985) reportan que las variaciones en la concentración de las diferentes formas de nitrógeno presentes en cultivo pueden ser debidas a la actividad de las bacterias *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*, las cuales reducen u oxidan estas diferentes formas para mantenerlas en equilibrio. Debido a esto podemos explicar las variaciones en las concentraciones de amonio y nitratos observadas a lo largo de los cultivos, ya que observamos hasta un 18% de diferencia en las concentraciones de amonio. En el caso de *Scenedesmus obliquus* (SC-O-1), la mejor remoción de amonio de los sistemas de cultivo se presentó en la dilución del 30%, la cual fue de 6.11 mg N-NH₄⁺•l⁻¹ y en la dilución del 40% la remoción fue de 4.52 mg N-NH₄⁺•l⁻¹ sin embargo, para el caso de la dilución del 30% se encontró que el 100% de la remoción fue en forma de amoniaco (forma gaseosa del amonio) a diferencia de la dilución del 40%, en donde cerca de un 24% de la remoción fue debida a la asimilación directa de la microalga. En el caso de *Scenedesmus sp.* la mejor remoción de amonio la encontramos en la dilución del 40% que fue de 4.41 mg N-NH₄⁺•l⁻¹, seguida de las diluciones del 30 (3.99 mg N-NH₄⁺•l⁻¹) y 50% (3.26 mg N-NH₄⁺•l⁻¹) respectivamente, pero al igual que en la dilución del 30% de la anterior microalga, la remoción fue debida a la pérdida en forma de amoniaco (NH₃) de los sistemas de cultivo.

Como se pudo observar, los valores de asimilación por parte de las microalgas fueron bajos o nulos, lo que sugiere que la única forma en que éstas contribuían a la disminución de la concentración era la liberación de amonio, debida al aumento de los valores de pH. Por otro lado, al realizar los balances de nitrógeno se observaron valores

positivos, lo que nos demuestra la existencia de procesos de denitrificación o de amonificación en los cultivos. Como los nitritos estaban ausentes en la formulación original del medio de cultivo y éstos se encontraron constantemente presentes en el sistema de cultivo, se puede considerar que su presencia, aunque en concentraciones muy bajas, indica la ocurrencia de procesos de nitrificación o de denitrificación o de ambos.

Otra explicación a este hecho, es que a lo largo de los experimentos de cultivo, se tuvo una fuente de contaminación de amoniaco, ya que tal vez algún residuo de amoniaco que no era atrapado por las trampa de amonio era liberado en el interior de la cámara climática, donde estaban contenidos los cultivos, y como en este mismo lugar se mantenía la bomba de aireación que inyectaba aire a nuestros cultivos, tal vez parte de este amonio era inyectado también a los sistemas de cultivo.

En cuanto al aumento de la concentración de fósforo durante los periodos de oscuridad, éste pudo deberse a la lisis celular o a la eliminación de reservas, ya que no se pudo comprobar la hipótesis de una precipitación de fosfatos insolubles durante el día y de su solubilización nocturna por las variaciones de pH.

En lo que respecta a la calidad de la biomasa producida en nuestros sistemas de cultivo, se encontró que la más alta concentración de proteínas se observó en la microalga *Scenedesmus obliquus* la cual produjo en la dilución del 30%, $25 \text{ mg Prot} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, mientras que durante la dilución del 40% la producción fue de $15 \text{ mg Prot} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. En cuanto a los otros dos componentes bioquímicos se encontró que las mejores proporciones se encontraron en la dilución del 30%. Para el caso de *Scenedesmus sp.* la producción de proteínas más alta alcanzada fue en el factor de dilución del 40%, la cual fue de $21 \text{ mg Prot} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, seguida del factor de dilución del 50% con $18.5 \text{ mg Prot} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, y de $17.7 \text{ mg Prot} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ para la dilución del 30%. En cuanto a los otros dos componentes bioquímicos, las mejores proporciones se encontraron en la dilución del 30%.

En los ensayos con ambas microalgas se observó que las concentraciones de carbohidratos y lípidos tendían a disminuir durante la noche, esto debido a que, durante la noche no hay proceso de fotosíntesis y por eso las microalgas hacen uso de sus reservas, lo que trae como consecuencia una disminución en estos componentes bioquímicos.

Otro factor que pudiera hacer atractivo el uso de microalgas para el tratamiento de aguas residuales es la posibilidad de su efecto negativo sobre el crecimiento de las enterobacterias. En el caso de *Escherichia coli* se encontró que la variación del pH no representó un factor inhibitor de crecimiento pero, al agregar *Escherichia coli* a los cultivos de *Scenedesmus obliquus*, encontramos que la concentración de la enterobacteria se mantuvo casi constante a lo largo de los periodos de luz-obscuridad, aun con una variación en los valores de pH similar a los ensayos con medio fresco y medio utilizado por la microalga, por lo que probablemente esta microalga sintetiza constantemente algún tipo de sustancia bacteriostática. En el comportamiento de *Escherichia coli* en los cultivos de *Scenedesmus sp.* fue similar a lo encontrado en el ensayo con la microalga anterior. En los ensayos con medio usado por las microalgas bajo diferentes valores de pH, se encontró que la concentración de las enterobacterias fue aumentando paulatinamente a lo largo del periodo de luz-obscuridad. Mientras que, al mantener a *Escherichia coli* en los cultivos de *Scenedesmus sp.* el comportamiento fue diferente ya que la concentración de la enterobacteria fue disminuyendo conforme transcurría el tiempo hasta alcanzar concentraciones de un orden de magnitud menor a la inicial. Por tal motivo, se piensa que probablemente la microalga provoca un ambiente adverso para *Escherichia coli* mediante la producción de una sustancia con acción antibiótica.

Los ensayos de pH que realizamos anteriormente fueron hechos a tres valores de pH diferente (7.5, 8.5 y 9.5), pero en los tres casos estos valores de pH se mantuvieron constantes a lo largo de un ciclo de cultivo, a diferencia de los cultivos de microalgas, donde estos tenían una variación constante en los valores de pH, ya que durante el día, por efecto de la fotosíntesis el pH tendía a aumentar y durante la noche este tendía a disminuir

(figs. 6 y 8), siendo estas variaciones a lo largo del ciclo de cultivo lo que mantenga a la concentración de bacterias casi constantes o ligeramente disminuyendo.

Además de que los cambios observados en la concentración de *Escherichia coli* en los ensayos con ambas especies de *Scenedesmus* (SC-O-1 y SC-X-2), no fueron muy significativos debido a la técnica de sembrado empleada, por lo que no se pudo apreciar con exactitud si existía algún efecto por el pH o de la síntesis de alguna substancia bacteriostática o antibiótica.

V.- CONCLUSIONES

Las microalgas seleccionadas para el tratamiento de aguas residuales fueron las cepas del género *Scenedesmus* (*Scenedesmus obliquus* y *Scenedesmus sp.*).

La mayor cantidad de nitrógeno removido diariamente, se encontró en los cultivos de *Scenedesmus obliquus* y fue de $10.64 \text{ mg N}\cdot\text{l}^{-1}$ con un factor de dilución del 30%, siendo aproximadamente un 63% en forma de N-NH_3 perdido a la atmósfera y 37% asimilado y transformado a nitrógeno proteínico por las microalgas.

Los cambios de pH a lo largo del ciclo diario de cultivo provocaron un aumento en la remoción de las diferentes formas de nitrógeno presente en los cultivos.

La cepa de *Scenedesmus obliquus* cultivada bajo un factor de dilución del 30% resultó ser el mejor tratamiento para aguas residuales, removiendo del sistema de cultivo aproximadamente la cantidad de $10 \text{ mg N}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$.

Los cambios observados en la concentración de *Escherichia coli* no son muy significativos con las técnicas de sembrado empleadas. Por lo que, los resultados no permiten sacar ninguna conclusión, ni de un efecto bacteriostático ni antibiótico.

LITERATURA CITADA

- Bligh, E.G. y W.J. Dyer. 1959. **A rapid method of total Lípid extraction and purification.** Can.J. Biochem.Physiol. 37:911-917.
- Caldwell, D.H. 1946. **Sewage oxidation ponds-performance, operation and design.** Sewage Works J. 18:433-458.
- Cañizares-Villanueva, R. O. 1994. **Tratamiento terciario de aguas residuales utilizando microalgas.** Vol 2 No. 1 (Especial) Tópicos selectos sobre microalgas. Serie Científica. UABCS. 2:35-50.
- Cañizares-Villanueva, R.O. y C. Casas-Campillo. 1991. **El papel de las microalgas en el tratamiento terciario de aguas residuales.** Cuadernos sobre Biotecnología. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados-IPN. México, 55 pp.
- Chiaverini, J. 1972. **Techniques d'extraction et d'analyse des Lípides.** Université de Paris. et M. Curie, Paris. Station Zoologique Villefranche-Sur-Mer. Notes de Travail No. 12. 12 pp.
- Daniel, W. W., 1977. **Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud.** Editorial Noriega Limusa., México. 661 pp.
- De la Noüe, J. y A. Basseres. 1989. **Biotreatment of anaerobically digested swine manure with microalgae.** Biological Wastes. 29:17-31.

- De la Noüe, J. y N. de Pauw. 1988. **The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae.** *Biotechnol. Adv.* 6:725-770.
- Dorsey, T.E., P. McDonald y O.A. Roels. 1978. **Measurements of phytoplankton-protein content with the heated biuret-folin assay.** *J. Phycol.*, 14:167-171.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers y F. Smith. 1956. **Colorimetric method for determination of sugars and related substances.** *Analyt.Chem.* 28:350-356.
- Färber-Lorda, J. 1986. **Etudes biologiques, energetiques et biochimiques du krill antarctique *Euphausia superba* et *Thysanoessa macrura* recolecte au cours de la campagne Fibex (Février 1981).** These de Doctorat, Universite d' Aix-Marseille II. 214 p.
- Fogg, G.E. y B. Thake. 1987. **Algal cultures and phytoplankton ecology.** The University of Wisconsin Press, Madison. 269 pp.
- Grobbelaar, J.U., C.J. Soeder y E. Stengel. 1990. **Modeling algal productivity in large outdoor cultures and waste treatment systems.** *Biomass.* 21:297-314.
- Guillard, R.L.L. y J.H. Ryther. 1962. **Studies on marine planktonic diatoms I *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran.** *Can. J. Microbiol.* 8:229-239.
- Hach. 1992. **Water analysis handbook.** 2nd Ed. Hach Company, Loveland. 831 pp.

- Kawasaki, L. Y., E. Tarifeño-Silva, D. P. Yu, M. S. Gordon y D. J. Chapman. 1982. **Aquacultural approaches to recycling of dissolved nutrients in secondarily treated domestic wastewater-I: Nutrient uptake and release by artificial food chains.** Water Research. Vol. 16:37-39.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall. 1951. **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** J. Biol. Chem. 193:265-275.
- Malara, G. y R. Charra. 1972 a. **Dosage des protéines particulières selon la méthode de Lowry.** Université de Paris. Station Zoologique. Villefranche-Sur-Mer. Notes de Travail. No. 5. 11 pp.
- Malara, G. y R. Charra. 1972 b. **Dosage des glucides particulières de phytoplancton selon la méthode de Dubois.** Université de Paris. Station Zoologique. Villefranche-Sur-Mer. Notes de Travail. No. 6. 12 pp.
- Martin, C., J. De la Noüe y G. Picard. 1985. **Intensive cultivation of freshwater microalgae on aerated pig manure.** Biomass. 7:245-259.
- Mc Garry, M.G., H.N. Leung y L.T. Lee. 1974. **Wastewater reclamation under tropical conditions.** Process Biochem. Sept. 1974.
- Oswald, W.J. 1988. **Micro-algae and waste-water treatment.** 405-328. En Borowitzka M.A. y L.J. Borowitzka (Eds). Microalgal biotechnology. Cambridge University Press. New York.
- Oswald, W.J. y H. B. Gotaas. 1957. **Photosynthesis in sewage treatment.** Trans. Am. Soc. Civ. Eng. 122:73-105.

- Pande, S.V., R.P. Khan y T.A. Venkitasubramanian. 1963. **Microdetermination of Lípids and serum total fatty acid**. *Analyt. Biochem.* 6:415-423.
- Pouliot, Y., G. Buelna, C. Racine y J. De la Noüe. 1989. **Culture of cyanobacteria for tertiary wastewater treatment and biomass production**. *Biological Wastes.* 29:81-91.
- Soeder C.J. y E. Hegewald. 1988. *Scenedesmus*. 59-83. En Borowitzka M.A. y L.J. Borowitzka (Eds). *Microalgal biotechnology*. Cambridge University Press. New York.
- Sokal, R.R y F.J. Rohlf. 1969. **Biometría: Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica**. H. Blume Ediciones. Barcelona. 832 pp.
- Sorokin, C. 1973. **Dry weight, packed cell volume and optical density**. 321-343. En: Stein, J.R. (Ed.). *Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurement*. Cambridge University Press, New York. 394 pp.
- Soto-Sainz, L.P. 1993. **Remoción de nutrientes de agua residual sintética utilizando la microalga *Scenedesmus* sp.** Universidad Autónoma de Sinaloa, Escuela de Ciencias del Mar, Mazatlán, México, Memoria de Servicio Social. 41 pp.
- Spotte, S. y G. Adams. 1983. **Estimation of the allowable upper limit of ammonia in saline waters**. *Mar. Ecol. Progs. Ser.* 10:207-210.
- Straub, C.P. 1989. **Practical handbook of enviromental control**. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 487 pp.

Talbot, P. y J. De la Noüe. 1993. **Tertiary treatment of wastewater with *Phormidium bohneri* (Schimdle) under various light and temperature conditions.** *Wat. Res.* 27, 153-159 pp.

Trujillo-Valle, M. L. 1993. **La colección de microalgas del CICESE. Informe técnico.** Comunicaciones Académicas, Serie Acuicultura, CICESE. CIACT9301. 103 pp.

Voltolina-Lobina, D., D.G. Pérez-Ishiwara, J.L. de la Rosa-Arana, M.I. González-Leonardo, S. Gonzáles-Medina y M.A. Rivera-Padilla. 1991. **Reporte de las actividades de estudio de lodos activados y aguas residuales de la planta de tratamiento “El Gallo” de Ensenada, B.C.** Informe presentado a la Comisión Estatal de Servicios Públicos de Ensenada (CESPE). Comunicaciones Académicas, Serie Acuicultura, CICESE, Ensenada, México. 29 pp.

Whyte, J.N.C. 1987. **Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves.** *Aquaculture* 60:231-241.

Wilde, E.W., J.R. Benemann, J.C. Weissman y D.M. Tillett. 1991. **Cultivation of algae and nutrient removal in a waste heat utilization process.** *J. Appl. Phycol.* 3:159-167.