

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN
SUPERIOR DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN ACUICULTURA**

**Tratamiento de efluentes de una planta piloto de producción
hiper intensiva de tilapia nilótica con dos cepas de
microalgas**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Julio Enrique Ramos Chávez

Ensenada, Baja California, México
2014

Tesis defendida por

Julio Enrique Ramos Chávez

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Manuel Alberto Segovia Quintero

Director del Comité

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez

Miembro del Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez

Miembro del Comité

Dra. Beatriz Cordero Esquivel

Coordinador del Posgrado en Ciencias en
Acuicultura

Dr. Jesús Favela Vara

Director de Estudios de Posgrado

Septiembre 2014

Resumen de la tesis que presenta **Julio Enrique Ramos Chávez**, como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Tratamiento de efluentes de una planta piloto de producción hiper intensiva de tilapia nilótica con dos cepas de microalgas

Resumen elaborado por:

Julio Enrique Ramos Chávez

El constante crecimiento de la industria acuícola y la disminución del recurso hídrico, han conducido al avance de nuevas técnicas de producción enfocadas a la optimización del uso del agua. En este sentido, los sistemas de recirculación acuícola (SRA) se desarrollaron para optimizar el uso de este recurso, con un recambio diario $\leq 10\%$ del volumen total del agua. Estos sistemas son una herramienta en la producción de especies de valor comercial como la tilapia nilótica (*Oreochromys niloticus*). La alta demanda en el mercado y las características específicas de la especie permiten cultivar en densidades de hasta 120 kg/m^3 en SRA. Sin embargo, el uso de SRA para producción hiper intensiva se caracteriza por la generación de altas concentraciones de nutrientes en sus efluentes, como el nitrógeno amoniacal total (NAT), nitritos (NO_2), nitratos (NO_3) y fosfatos (PO_4). Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de remoción de nutrientes (NAT, NO_2 , NO_3 y PO_4) y la producción de biomasa de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* en sistemas de cultivos estáticos y semicontinuos utilizando efluentes crudos generados en un SRA. Las cepas de microalgas *S. obliquus* (SCO1) y *C. vulgaris* (CLV2) fueron obtenidas de la colección del cepario del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, (CICESE). La fracción disuelta de los efluentes obtenida de los SRA se colocó en garrafones de plástico con una capacidad de 19 litros. La capacidad de remoción de nutrientes de las microalgas en sistemas estáticos se evaluó usando 3 diferentes tratamientos (sintético, clorado y no clorado), se realizaron 3 bioensayos para cada especie en condiciones no controladas de luz y temperatura por un periodo 7 días. En los sistemas semicontinuos la capacidad de remoción de nutrientes de las 2 especies de microalgas, se evaluó en un volumen total de 17 litros en condiciones controladas de luz ($7,500 \pm 400 \text{ Lux}$) y temperatura ($20 \pm 0.6 \text{ }^\circ\text{C}$) durante 17 días, utilizando un control y 1 tratamiento de efluente no clorado por cada especie de microalga. En los sistemas estáticos la capacidad de crecimiento de *C. vulgaris* ($< 4 \times 10^6 \text{ cél/ml}$) fue menor que la de *S. obliquus* ($> 4 \times 10^6 \text{ cél/ml}$). La

dinámica de absorción de nutrientes fue diferente en cada uno de los bioensayos, debido a la naturaleza cambiante del efluente. Cuando se registraron concentraciones de NAT en el efluente, el consumo se llevó a cabo en 24 h en las 2 especies. Los NO_2 registraron un aumento en concentración en los 3 tratamientos con las 2 especies. La remoción de NO_3 fue $< 50\%$ en los 3 tratamientos con las 2 especies. Por otro lado, el consumo de PO_4 fue $> 60\%$ con *S. obliquus* en los 3 tratamientos, mientras que con *C. vulgaris* fue $> 98\%$ solo en el efluente sintético. En los sistemas semicontinuos *S. obliquus* resistió las condiciones de estrés ocasionadas por las diluciones, mientras que *C. vulgaris* solo permaneció durante 11 días. La capacidad de remoción al día 17 para *S. obliquus* fue del 100% de NAT, 97.2 % de NO_2 , 35.8% de NO_3 y 20.4% de PO_4 . La remoción con *C. vulgaris* al día 11 fue de 100% de NAT, 18.7% para NO_2 , 0% de NO_3 y 48.6% de PO_4 .

Palabras clave: ***Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, efluente, nutrientes**

Abstract of the thesis presented by **Julio Enrique Ramos Chávez**, as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

Effluent treatment of hyper intensive pilot production plant of Nile tilapia with two strains of microalgae

Abstract by:

Julio Enrique Ramos Chávez

The steady growth of the aquaculture industry and the decline of water resources have led to the development of new production techniques aimed to optimize the water resource. Recirculating aquaculture systems (RAS) were developed to optimize the use of this resource operating with daily exchanges $\leq 10\%$ of the total water volume. RAS are currently used in the production of commercially valuable species such as Nile tilapia (*Oreochromys niloticus*). One of the most important characteristics of the RAS is the ability to grow fish in small spaces at high densities (up to 120 kg/m^3). However, RAS are characterized by the production of high concentration of nutrients in the effluent, as: total ammonia nitrogen (TAN), nitrite (NO_2), nitrate (NO_3) and phosphate (PO_4). Therefore, the aim of this study was to evaluate the removal nutrient capability (NAT, NO_2 , NO_3 and PO_4) and biomass production of two species of microalgae: *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* in two different culture techniques, batch and semicontinuous using RAS effluents. Microalgae *S. obliquus* (SCO1) and *C. vulgaris* (CLV2) were obtained from the collection of the Department of Aquaculture microalgae collection. The RAS effluents were placed in plastic container (19 l). In the first experiment, the microalgae removal nutrient capacity was evaluated in batch culture systems using 3 different treatments: treatment 1: synthetic effluent, treatment 2: chlorinated effluent and treatment 3: non-chlorinated effluent. Three bioassays for each species were carried out in outdoor conditions for 7 days. In the second experiment one bioassay was designed to evaluate the nutrient removal capability of both microalgae species in a semicontinuous culture system under controlled light ($7,500 \pm 400 \text{ lux}$) and temperature conditions ($20 \pm 0.6 \text{ }^\circ \text{C}$) for 17 days period. Three treatments were evaluated in this experiment: treatment 1 control, treatment 2 non-chlorinated effluent with SCO1, and treatment 3 non-chlorinated effluent with CLV2. In the batch culture systems *C. vulgaris* ($<4 \times 10^6 \text{ cells / ml}$) cell density was lower than *S. obliquus* ($> 4 \times 10^6 \text{ cells / ml}$). Nutrient uptake was different in each of the bioassays in experiment 1

due to the changing nature of the effluent. NAT was removed in 24 h by both microalgae species. The NO_2 concentration increase with time recorded in the 3 treatments in all bioassay for species. The NO_3 removal was <50 % in the 3 treatments in all bioassays for both species. The PO_4 removal was > 60% for *S. obliquus* in the 3 treatments, and *C. vulgaris* was >98% only in the synthetic effluent. When *S. obliquus* was cultured in semicontinuous systems was able to grow for the duration of the bioassay (17 days), meanwhile *C. vulgaris* only remained viable for 11 days in the same culture conditions. The nutrient removal capacity at day 17 for *S. obliquus* was NAT 100%, 97.2% of NO_2 , NO_3 35.8% and 20.4% of PO_4 . The nutrient removal with *C. vulgaris* at 11 days was NAT 100%, 18.7 % of NO_2 , NO_3 0 % and 48.6% of PO_4 .

Keywords: ***Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, effluent, nutrients**

Dedicatoria

A DIOS POR SER QUIEN ME DA LA FUERZA PARA SEGUIR LUCHANDO EN ESTA VIDA.

A mi abuelita Manuela, por todo lo que ella significa en mi vida. ¡SIGAMOS LUCHANDO MAMÁ!

A mis padres Julia y Enrique y a mi hermano Adrián por ser mi gran pilar y parte fundamental de cada logro. ¡LOS AMO!

A toda mi familia por alentarme en todo momento, y sobre todo por confiar en mí.

A MI NOVIA GABY por estar conmigo y ayudarme a seguir en busca de cada sueño. Gracias por tu compañía y por tanto amor.

A mis amigas Laurita y Rosaura que siempre están conmigo. Gracias por su apoyo incondicional.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por haberme brindado el apoyo económico para la realización de mis estudios de Maestría.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), y al Departamento de Acuicultura por su valioso apoyo en mi formación académica.

A mi director de Tesis, Dr. Manuel Alberto Segovia Quintero, por darme la oportunidad de integrarme a su grupo de trabajo. ¡Gracias por todo su apoyo!

A los miembros de mi comité de tesis, Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez y Dra. Rufina Hernández Martínez por cada una de sus valiosas aportaciones para la realización de este trabajo. GRACIAS POR SU GRAN AYUDA.

A la Maestra en Ciencias Gabriela Ramírez Ovalle por su gran apoyo en el inicio de este trabajo.

A la Maestra en Ciencias Gissel Tinoco Orta por su ayuda en la realización de los análisis proximales.

A Carlos Carvallo, técnico del Departamento de Acuicultura, por su gran apoyo en la realización de los sistemas de cultivo.

A mis grandes compañeros de laboratorio Juan Pablo, Salvador, Romy, José

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español	i
Resumen en inglés	iii
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Lista de Figuras	xii
Lista de Tablas	xxii
Capítulo 1. Introducción	1
1.1. Introducción.....	1
1.2. Antecedentes.....	3
1.3. Justificación.....	8
1.4. Hipótesis.....	9
Capítulo 2. Objetivos	10
2.1. Objetivo general.....	10
2.2. Objetivos particulares.....	10
Capítulo 3. Materiales y Métodos	11
3.1. Obtención de cepas y condiciones de cultivo.....	11
3.1.1. Características generales de las especies.....	11
3.1.2. Determinación de la densidad celular.....	12
3.2. Calidad de agua.....	12
3.3. Formulación del efluente sintético.....	12
3.4. Análisis proximales.....	13
3.5. Obtención del efluente.....	14
3.6. Toma de muestras.....	15

Tabla de contenido (Continuación)

	Página
3.7. Eficiencias de remoción.....	15
3.8. Diseño experimental.....	16
3.8.1. Experimento I.....	16
3.8.2. Experimento II.....	17
3.9. Análisis estadístico.....	20
Capítulo 4. Resultados.....	21
4.1. Curvas de calibración para la determinación de densidad celular.....	21
4.2. Bioensayo I <i>Chlorella vulgaris</i>	22
4.2.1. Crecimiento microalgal (cél/ml).....	22
4.2.2. Remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT).....	23
4.2.3. Nitritos (NO ₂).....	24
4.2.4. Remoción de nitratos (NO ₃).....	26
4.2.5. Remoción de fosfatos (PO ₄).....	27
4.2.6. Alcalinidad (CaCO ₃).....	29
4.2.7. pH.....	29
4.3. Bioensayo II <i>Chlorella vulgaris</i>	30
4.3.1. Crecimiento microalgal (cél/ml).....	30
4.3.2. Remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT).....	31
4.3.3. Nitritos (NO ₂).....	33
4.3.4. Remoción de nitratos (NO ₃).....	35
4.3.5. Remoción de fosfatos (PO ₄).....	36
4.3.6. Alcalinidad (CaCO ₃).....	38
4.3.7. pH.....	39
4.4. Bioensayo III <i>Chlorella vulgaris</i>	39
4.4.1. Crecimiento microalgal (cél/ml).....	39
4.4.2. Remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT).....	41
4.4.3. Nitritos (NO ₂).....	42
4.4.4. Remoción de nitratos (NO ₃).....	44
4.4.5. Remoción de fosfatos (PO ₄).....	45
4.4.6. Alcalinidad (CaCO ₃).....	47
4.4.7. pH.....	47

Tabla de contenido (Continuación)

	Página
4.5. Bioensayo I <i>Scenedesmus obliquus</i>	48
4.5.1. Crecimiento microalgal (cél/ml).....	48
4.5.2. Remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT).....	49
4.5.3. Nitritos (NO ₂).....	51
4.5.4. Remoción de nitratos (NO ₃).....	53
4.5.5. Remoción de fosfatos (PO ₄).....	55
4.5.6. Alcalinidad (CaCO ₃).....	56
4.5.7. pH.....	57
4.6. Bioensayo II <i>Scenedesmus obliquus</i>	58
4.6.1. Crecimiento microalgal (cél/ml).....	58
4.6.2. Remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT).....	59
4.6.3. Nitritos (NO ₂).....	61
4.6.4. Remoción de nitratos (NO ₃).....	63
4.6.5. Remoción de fosfatos (PO ₄).....	64
4.6.6. Alcalinidad (CaCO ₃).....	66
4.6.7. pH.....	66
4.7. Bioensayo III <i>Scenedesmus obliquus</i>	67
4.7.1. Crecimiento microalgal (cél/ml).....	67
4.7.2. Remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT).....	68
4.7.3. Nitritos (NO ₂).....	70
4.7.4. Remoción de nitratos (NO ₃).....	71
4.7.5. Remoción de fosfatos (PO ₄).....	73
4.7.6. Alcalinidad (CaCO ₃).....	74
4.7.7. pH.....	75
4.8. Composición proximal.....	76
4.8.1. Carbohidratos.....	76
4.8.2. Proteínas.....	76
4.8.3. Lípidos.....	77
4.9. Experimento II.....	79
4.9.1. Crecimiento microalgal (cél/ml).....	79
4.9.2. Remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT).....	80
4.9.3. Nitritos (NO ₂).....	81
4.9.4. Remoción de nitratos (NO ₃).....	83
4.9.5. Remoción de fosfatos (PO ₄).....	84
4.9.6. Alcalinidad (CaCO ₃).....	86

Tabla de contenido (Continuación)

	Página
4.9.7. pH.....	86
Capítulo 5. Discusión, conclusiones y recomendaciones.....	88
5.1. Experimento I <i>Chlorella vulgaris</i>	88
5.1.1. Crecimiento microalgal.....	88
5.1.2. Remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT).....	90
5.1.3. Nitritos (NO ₂).....	90
5.1.4. Remoción de nitratos (NO ₃).....	91
5.1.5. Remoción de fosfatos (PO ₄).....	92
5.1.6. Alcalinidad (CaCO ₃).....	92
5.1.7. pH.....	93
5.2. Experimento I <i>Scenedesmus obliquus</i>	93
5.2.1. Crecimiento microalgal.....	93
5.2.2. Remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT).....	94
5.2.3. Nitritos (NO ₂).....	95
5.2.4. Remoción de nitratos (NO ₃).....	95
5.2.5. Remoción de fosfatos (PO ₄).....	96
5.2.6. Alcalinidad (CaCO ₃).....	97
5.2.7. pH.....	97
5.3. Composición proximal.....	98
5.3.1. Carbohidratos.....	98
5.3.2. Proteínas.....	98
5.3.3. Lípidos.....	99
5.4. Experimento II Cultivo semicontinuo.....	100
5.4.1. Crecimiento microalgal.....	100
5.4.2. Remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT).....	101
5.4.3. Nitritos (NO ₂).....	102
5.4.4. Remoción de nitratos (NO ₃).....	102
5.4.5. Remoción de fosfatos (PO ₄).....	103
5.4.6. Alcalinidad (CaCO ₃).....	104

Tabla de contenido (Continuación)

	Página
5.4.7. pH.....	104
5.5. Conclusiones.....	105
5.6. Recomendaciones.....	106
Lista de referencias.....	107

Lista de figuras

Figura		Página
1	Congelamiento en nitrógeno líquido (-196°C) de las muestras filtradas para determinación proximal de <i>C. vulgaris</i> y <i>S. obliquus</i>	14
2	Obtención del efluente del RAS para la separación de la materia orgánica.....	15
3	Tratamientos por triplicado para evaluar la capacidad de remoción de nutrientes de <i>C. vulgaris</i> y <i>S. obliquus</i> en sistema estático.....	17
4	Tratamientos para evaluar la capacidad de remoción de nutrientes de <i>C. vulgaris</i> y <i>S. obliquus</i> en sistema semicontinuo.....	18
5	Curva de calibración para la determinación de densidad celular de <i>C. vulgaris</i>	21
6	Curva de calibración para la determinación de densidad celular de <i>S. obliquus</i>	21
7	Valores promedio del crecimiento microalgal (cél/ml) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	22
8	Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitrógeno amoniacal total (NAT) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	23
9	Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.....	24
10	Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitritos (NO ₂) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	25

Lista de figuras (continuación)

Figura	Página	
11	Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitritos (NO_2) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.....	25
12	Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitratos (NO_3) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	26
13	Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitratos (NO_3) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.....	27
14	Valores promedio de la concentración (mg/l) de fosfatos (PO_4) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	28
15	Valores promedio de la eficiencia de remoción de fosfatos (PO_4) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.....	28
16	Valores promedio de la concentración (mg/l) de alcalinidad (CaCO_3) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	29
17	Valores promedio de la concentración (mg/l) de pH en los tratamientos de efluente sintético, clorado y clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	30
18	Valores promedio del crecimiento microalgal (cél/ml) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	31

Lista de figuras (continuación)

Figura		Página
19	Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitrógeno amoniacal total (NAT) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	32
20	Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.....	33
21	Valores promedios de la concentración (mg/l) de nitritos (NO ₂) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	34
22	Valores promedios de la eficiencia de remoción de nitritos (NO ₂) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.....	34
23	Valores promedios de la concentración (mg/l) de nitratos (NO ₃) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	35
24	Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitratos (NO ₃) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.....	36
25	Valores promedio de la concentración (mg/l) de fosfatos (PO ₄) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	37
26	Valores promedio de la eficiencia de remoción de fosfatos (PO ₄) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.....	37

Lista de figuras (continuación)

Figura		Página
27	Valores promedio de la concentración (mg/l) de alcalinidad (CaCO_3) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	38
28	Valores promedio pH en los tratamientos de efluente sintético, efluente clorado y efluente no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	39
29	Valores promedio del crecimiento microalgal (cél/ml) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	40
30	Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitrógeno amoniacal total (NAT) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	41
31	Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.....	42
32	Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitritos (NO_2) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	43
33	Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitritos (NO_2) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.....	43
34	Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitratos (NO_3) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	44
35	Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitratos (NO_3) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.....	45

Lista de figuras (continuación)

Figura		Página
36	Valores promedio de la concentración (mg/l) de fosfatos (PO_4) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	46
37	Valores promedio de la eficiencia de remoción de fosfatos (PO_4) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.....	46
38	Valores promedio de la concentración (mg/l) de alcalinidad (CaCO_3) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	47
39	Valores promedio de pH en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	48
40	Valores promedio del crecimiento microagal (cél/ml) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	49
41	Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitrógeno amoniacal total (NAT) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	50
42	Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.....	51
43	Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitritos (NO_2) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	52

Lista de figuras (continuación)

Figura	Página	
44	Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitritos (NO_2) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.....	53
45	Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitratos (NO_2) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	54
46	Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitratos (NO_3) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.....	54
47	Valores promedio de la concentración (mg/l) de fosfatos (PO_4) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	55
48	Valores promedio de la eficiencia de remoción de fosfatos (PO_4) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.....	56
49	Valores promedio de la concentración (mg/l) de alcalinidad (CaCO_3) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	57
50	Valores promedio de pH en los tratamientos de efluente sintético, efluente clorado y efluente no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	58
51	Valores promedio del crecimiento microalgal (cél/ml) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	59
52	Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitrógeno amoniacal total (NAT) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	60

Lista de figuras (continuación)

Figura		Página
53	Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.....	61
54	Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitritos (NO_2) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	62
55	Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitritos (NO_2) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.....	62
56	Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitratos (NO_3) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	63
57	Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitratos (NO_3) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.....	64
58	Valores promedio de la concentración (mg/l) de fosfatos (PO_4) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	65
59	Valores promedio de la eficiencia de remoción de fosfatos (PO_4) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.....	65
60	Valores promedio de la concentración (mg/l) de alcalinidad (CaCO_3) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	66
61	Valores promedio de pH en los tratamientos de efluente sintético, efluente clorado y efluente no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	67

Lista de figuras (continuación)

Figura	Página	
62	Valores promedio del crecimiento microalgal (cél/ml) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	68
63	Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitrógeno amoniacal total (NAT) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	69
64	Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.....	69
65	Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitritos (NO ₂) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	70
66	Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitritos (NO ₂) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.....	71
67	Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitratos (NO ₃) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	72
68	Valores promedios de la eficiencia de remoción de nitratos (NO ₃) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.....	72
69	Valores promedio de la concentración (mg/l) de fosfatos (PO ₄) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	73

Lista de figuras (continuación)

Figura		Página
70	Valores promedio de la eficiencia de remoción de fosfatos (PO_4) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.....	74
71	Valores promedio de la concentración (mg/l) de alcalinidad (CaCO_3) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	75
72	Valores promedio de pH en los tratamientos de efluente sintético, efluente clorado y efluente no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.....	76
73	Valores promedio del crecimiento microalgal (cél/ml) de <i>S. obliquus</i> y <i>C. vulgaris</i> en sistema semicontinuo de cultivo. Rombo, <i>S. obliquus</i> y cuadro <i>C. vulgaris</i>	79
74	Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitrógeno amoniacal total (NAT). Rombo, control; cuadro, <i>S. obliquus</i> y triángulo, <i>C. vulgaris</i>	80
75	Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT). Barra azul, control; barra guinda, <i>S. obliquus</i> y barra verde, <i>C. vulgaris</i>	81
76	Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitritos (NO_2). Rombo, control; cuadro, <i>S. obliquus</i> y triángulo, <i>C. vulgaris</i>	82
77	Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitritos (NO_2). Barra azul, control; barra guinda, <i>S. obliquus</i> y barra verde, <i>C. vulgaris</i>	82
78	Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitratos (NO_3). Rombo, control; cuadro, <i>S. obliquus</i> y triángulo, <i>C. vulgaris</i>	83
79	Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitratos (NO_3). Barra azul, control; barra guinda, <i>S. obliquus</i> y barra verde, <i>C. vulgaris</i>	84
80	Valores promedio de la concentración (mg/l) de fosfatos (PO_4). Rombo, control; cuadro, <i>S. obliquus</i> y triángulo, <i>C. vulgaris</i>	85

Lista de figuras (continuación)

Figura		Página
81	Valores promedio de la eficiencia de remoción de fosfatos (PO_4). Barra azul, control; barra guinda, <i>S. obliquus</i> y barra verde, <i>C. vulgaris</i>	85
82	Valores promedio de la concentración (mg/l) de alcalinidad (CaCO_3). Rombo, control; cuadro, <i>S. obliquus</i> y triángulo, <i>C. vulgaris</i>	86
83	Valores promedio de pH en los 3 tratamientos. Rombo, control; cuadro, <i>S. obliquus</i> y triángulo, <i>C. vulgaris</i>	87

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Uso de diferentes especies de microalgas en el tratamiento de efluentes.....	5
2	Valores promedio y desviación estándar de la composición proximal de carbohidratos de <i>C. vulgaris</i> y <i>S. obliquus</i> cultivadas en 3 tratamientos.....	78
3	Valores promedio y desviación estándar de la composición proximal de proteínas de <i>C. vulgaris</i> y <i>S. obliquus</i> cultivadas en 3 tratamientos.....	78
4	Valores promedio y desviación estándar de la composición proximal de lípidos de <i>C. vulgaris</i> y <i>S. obliquus</i> cultivadas en 3 tratamientos...	78

Capítulo 1. Introducción

La acuicultura es una actividad económica importante y es considerada como uno de los sectores productivos de mayor desarrollo en los últimos años a nivel mundial (FAO, 2012). El desarrollo de la actividad acuícola se debe al rápido crecimiento de la población mundial, lo que genera la necesidad de producir una mayor cantidad de alimento. La pesca de captura y la acuicultura en 2010 suministraron 148 millones de toneladas de productos acuáticos (FAO, 2012), de los cuales 128 millones de toneladas se destinaron al consumo humano. En 2011, la producción de productos acuícolas se incrementó a 154 millones. En un futuro, la producción alcanzada por la acuicultura superará a los volúmenes de pesca de captura (Avilés-Quevedo y Vásquez-Hurtado, 2006). En México, la acuicultura ha adquirido gran importancia en los últimos años, al grado de ser considerada como una actividad primaria (Fitzsimmons, 2000), cuyo principal objetivo es producir en forma eficiente organismos acuáticos en términos de producción y costos en sistemas controlados (Álvarez Torres *et al.*, 1999; Ponce-Palafox *et al.*, 2006).

La acuicultura tiene una repercusión directa en la sociedad, generando en forma paralela un incremento de la actividad económica y en la producción de alimento (Miranda-Baeza, 2002). En años recientes, el desarrollo de la acuicultura ha avanzado debido al desarrollo de nuevos sistemas de producción acuícola los cuales han mejorado e incrementado notablemente la producción acuícola. La producción acuícola se clasifica en base al grado de tecnificación como: extensiva, semi intensiva e intensiva (Avault, 1996). La acuicultura de nivel extensivo se caracteriza por el uso de un bajo nivel tecnológico y de inversión, con el uso de grandes volúmenes de agua y baja producción por unidad de área con mínima intervención humana (Pillay y Kutty, 2005; Lekang, 2007). Los sistemas semi intensivos, requieren un nivel intermedio de tecnología e inversión, con una mayor producción por unidad de área y mayor intervención humana (Pillay y Kutty, 2005; Lekang, 2007). Los sistemas intensivos tienen como características principales el cultivo de organismos acuáticos en altas densidades por unidad de área o volumen, con una mayor tecnología e inversión (Lekang, 2007). Como consecuencia del constante crecimiento de la industria acuícola

continental a nivel mundial y la disminución del recurso hídrico (Bernal, 2007), los avances en la técnicas de cultivo se han enfocado hacia la optimización del uso de este recurso. Los sistemas de recirculación acuícola (SRA) se desarrollaron para cumplir con la optimización del uso del recurso hídrico (Losordo *et al.*, 1998; Masser *et al.*, 1999; Timmons *et al.*, 2002). Los SRA se encuentran clasificados dentro de los sistemas intensivos de producción acuícola. La principal ventaja que caracteriza a los SRA es que $\leq 10\%$ del volumen total del agua se recambia diariamente y, por medio de cinco diferentes operaciones unitarias básicas se lleva a cabo el reciclado y reacondicionamiento constante del agua (Losordo *et al.*, 1998; Masser *et al.*, 1999; Timmons *et al.*, 2002; Timons y Ebeling, 2010).

En la actualidad, los SRA son una herramienta para la producción de especies de valor comercial como la tilapia nilótica (*Oreochromys niloticus*) y sus híbridos. Esta es una de las especies cultivadas más populares por su crecimiento rápido, la resistencia a condiciones adversas de la calidad del agua y a su palatabilidad. La alta demanda en el mercado de esta especie y sus características biológicas específicas hacen que pueda cultivarse a densidades de hasta 120 kg/m^3 en SRA. Sin embargo, los SRA para la producción hiper intensiva de peces también se caracterizan por la generación de efluentes con altas concentraciones de nutrientes tales como: el nitrógeno amoniacal total (NAT), nitritos (NO_2), nitratos (NO_3), y fosforo en forma de fosfatos (PO_4) (Piedrahita, 2003; Sugiura *et al.*, 2006). Los daños generados por las descargas de efluentes de los sistemas acuícolas se presentan principalmente en los ecosistemas acuáticos receptores (Dvir *et al.*, 1999), con daños como la eutrofización y el subsecuente deterioro del ecosistema en general (Beveridge, 1984; Lin *et al.*, 1989). La generación de efluentes con altas concentraciones de nutrientes ha conducido al desarrollo de diversos métodos de tratamientos, los cuales incluyen los tratamientos físicos, químicos, biológicos y mixtos (Oswald y Golueke, 1960; Oswald, 1998). Los tratamientos convencionales de efluentes presentan la desventaja de que su eficiencia depende del compuesto que se pretende remover; lo que en ocasiones requiere de procesos físicos y químicos que generan subproductos o contaminación secundaria, que implica el aumento de los costos de operación (Oswald, 1998). Los procesos biológicos en el tratamiento de efluentes incluyen el uso de diferentes grupos de organismos, los cuales son externos al efluente a tratar. Los organismos utilizados en

los tratamientos biológicos se dividen en los grupos de: bacterias, hongos, algas, protozoarios y metazoarios (Henze, 2002).

Actualmente, los métodos biológicos dentro de los cuales se encuentran las microalgas, pueden ser una opción viable para el tratamiento de efluentes como los producidos en la actividad acuícola (Lefebvre *et al.*, 1996; Benjamas *et al.*, 2003), debido a que poseen la capacidad de asimilar compuestos inorgánicos y contribuyen a la restauración del medio (Mallick, 2002). Los sistemas de cultivo de microalgas poseen una versatilidad que permite que sean usadas en diferentes procesos, tales como el tratamiento de efluentes, la producción de alimento para organismos cultivados, la agricultura, la industria farmacéutica y la industria cosmética, entre otras (De la Noüe y De Pauw, 1988). La utilización de los sistemas microalgales para el tratamiento de efluentes tiene ventajas sobre los demás tipos de tratamientos debido a que no requiere sistemas de producción de alta tecnología para su operación.

En las microalgas, la capacidad para remover compuestos nitrogenados y fosfatos depende de diversos factores tales como: (1) la concentración inicial de nutrientes, (2) la cepa de microalga, (3) la fuente de nutrientes, y (4) las características del efluente (De la Noüe *et al.*, 1992). Cuando la biomasa es cosechada y separada del efluente tratado, el tratamiento de efluentes con microalgas no genera contaminación adicional, lo que permite reciclar eficientemente los nutrientes consumidos (De la Noüe *et al.*, 1992). Por lo anterior, es necesario buscar aquellas especies de microalgas adecuadas para la remoción de compuestos nitrogenados inorgánicos y fosforo inorgánico que tengan gran capacidad de resistencia a condiciones adversas de cultivo para su uso potencial en el tratamiento de efluentes generados en los SRA y que una vez utilizadas brinden una alternativa de uso de acuerdo a su composición proximal.

1.2. Antecedentes

El uso de microalgas en la remoción de nutrientes en efluentes es ampliamente conocido, reportándose eficiencias de remoción mayores de 50% de fosfatos y compuestos nitrogenados, principalmente con los géneros de *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. (Serodes *et al.*, 1986; Oswald, 1998; De la Noüe y Proulx, 1988; Calzada

et al., 1991; De la Noüe *et al.*, 1993; Cañizares *et al.*, 1994). La especie *Scenedesmus* sp. presentó eficiencias de remoción de 83-99% de nitrógeno (NH_4) y 99% de fosforo (PO_4) (Xin *et al.*, 2010). Los trabajos con *C. vulgaris*, en el tratamiento de efluentes comenzaron con la remoción de nutrientes presentes en efluentes industriales, los cuales se caracterizaban por presentar altas concentraciones de nitrógeno y fósforo inorgánico. En este tipo de efluentes *Chlorella* sp. se caracterizó por tener una gran capacidad de remoción de nutrientes con eficiencias de hasta 50.2% para el nitrógeno inorgánico, y 85.75% del fosforo inorgánico (Colak y Kaya,1998). Lau *et al.*, (1996) en trabajos anteriores reportó eficiencias de remoción mayores con *C. vulgaris* para el nitrógeno inorgánico (86%) y eficiencias más bajas del 70% para el fosforo inorgánico.

En la actualidad, son numerosos los trabajos en donde diferentes especies de microalgas se utilizan en el tratamiento de efluentes; sin embargo, este proceso no ha sido llevado a cabo de igual forma en efluentes generados en la producción acuícola. Los efluentes son una fuente de nutrientes que permiten a las microalgas aumentar en biomasa y remover compuestos nitrogenados y los fosfatos (Lefebvre *et al.*, 1996). Lo anterior abre la oportunidad para utilizar microalgas en la remoción de nutrientes y a la vez usar los efluentes acuícolas como un medio de cultivo para la producción de biomasa algal. Hasta el momento, un gran número de especies de microalgas se han evaluado en la remoción de nutrientes en diferentes condiciones de cultivo y con el uso de diversos tipos de efluentes como lo mencionado por Pires *et al.*, (2013) (Tabla 1).

Tabla 1. Uso de diferentes especies de microalgas en el tratamiento de efluentes. V volumen; DC días de cultivo; T temperatura; L luz

Microalga	Efluente	NH ₄	NO ₃	PO ₄	Condiciones experimentales	Referencia
<i>Botryococcus brauni</i>	Efluente doméstico		79.63%	100 %	V=9L; DC=14 días; T=25°C; L=3500 lx	(Sydney <i>et al.</i> , 2011)
<i>Botryococcus brauni</i>	Efluente porcícola		80%		V=500 ml; DC=12 días; T=25 °C; L=100 μE m ⁻² s ⁻¹	(Hernandez-Carballo y Marco-Parra 2003)
<i>Chlorella kessleri</i>	Efluente sintético		19%		V=100 ml; DC=72 h; T=30 °C L=45 μmol m ⁻² s ⁻¹	(Lee y Lee, 2001)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Efluente soja	89.1%		70.3%	V=500 ml; DC=5 días; T=27 °C; L=40.5 μmol m ⁻² s ⁻¹	(Su <i>et al.</i> , 2011)
<i>Chlorella sp.</i>	Efluente municipal	93.9%		80.9%	V=25 L; DC=14 días; T=25 °C; L=50 μmol m ⁻² s ⁻¹	(Li <i>et al.</i> , 2011)

Nota: Los recuadros vacíos indican que no se evaluó la remoción del nutriente

Tabla 1. Uso de diferentes especies de microalgas en el tratamiento de efluentes (continuación). V volumen; DC días de cultivo; T temperatura; L luz

Microalga	Efluente	NH ₄	NO ₃	PO ₄	Condiciones experimentales	Referencia
<i>Chlorella vulgaris</i>	Efluente agro-industria	de 95%		95%	V=2L; DC=9 días; T=20 °C; L=60 μmol m ⁻² s ⁻¹	(Gonzalez <i>et al.</i> , 1997)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Residuales acero	de 92 g m ⁻³ h ⁻¹			T=27 °C; L=110 μE m ⁻² s ⁻¹	(Yun <i>et al.</i> , 1997)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Efluente sintético	97%		96%	V= 2L; DC=14 días; T=30 °C; L=3000 lx	(Peng <i>et al.</i> , 2011)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Efluente pretratado		100%	100%	V=130 ml; DC=5 días; T=23 °C; L=50 μmol m ⁻² s ⁻¹	(Kang <i>et al.</i> , 2006)
<i>Neochloris oleoabundans</i>	Efluente sintético		99%	100%	V=400 ml; DC=7 días; T=30 °C; L=1,280 lumenes	(Wang y Lan, 2011)

Nota: Los recuadros vacíos indican que no se evaluó la remoción del nutriente

Tabla 1. Uso de diferentes especies de microalgas en el tratamiento de efluentes (continuación). V volumen; DC días de cultivo; T temperatura; L luz

Microalga	Efluente	NH ₄	NO ₃	PO ₄	Condiciones experimentales	Referencia
<i>Phormidium bohneri</i>	Efluente doméstico	0.83 g m ⁻³ h ⁻¹		0.58 g m ⁻³ h ⁻¹	V=24 L; Cultivo abierto	(Laliberte <i>et al.</i> , 1997)
<i>Phormidium bohneri</i>	Efluente acuícola	82 %		85 %	V=70 L; DC=30 días; Cultivo abierto	(Dumas <i>et al.</i> , 1998)
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	Residuales de agro-industria	95 %			V=2 L; DC=9 días; T=20 °C; L=60 μmol m ⁻² s ⁻¹	(Gonzales <i>et al.</i> , 1997)
<i>Spirulina</i>	Residuales de cerdo	84-96 %		72-87 %	Raceway 24 m ² ; DC=7 días	(Olguin <i>et al.</i> , 2003)

Nota: Los recuadros vacíos indican que no se evaluó la remoción del nutriente

1.3. Justificación

Los trabajos utilizando microalgas para la remoción de nutrientes en efluentes son diversos (Tabla 1). Sin embargo, cuando se aborda el uso de las microalgas en el tratamiento de efluentes de origen acuícola, las referencias son escasas. Por ejemplo, el uso de las diatomeas marinas (*Skeletonema costatum* y *Chaetoceros* spp.) que se utilizaron en efluentes provenientes de cultivos intensivos acuícolas (Lefebvre *et al.*, 1996). La evaluación de *Phormidium bohneri* utilizada en efluente generado en cultivo de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), (Dumas *et al.*, 1998). Trabajos con *Oscillatoria okeni* y *Chlorella vulgaris* evaluadas en efluentes de cultivos de tilapia (Attasat *et al.*, 2012) y el uso de *Platymonas subcordiformis* evaluada en efluentes obtenidos del cultivo de lenguado (Guo *et al.*, 2013).

Por lo anterior, se abre la oportunidad para iniciar la evaluación de especies de microalgas con capacidad de remover la carga de nutrientes (NAT, NO₂, NO₃ y PO₄) y para la producción de biomasa algal en efluentes crudos generados en la actividad acuícola. El uso de microalgas como método biológico en el tratamiento de efluentes implicaría una disminución de los costos de operación debido a la operación sencilla y al uso de efluentes crudos. A lo anterior se le suma la producción de biomasa algal mediante el aprovechamiento de los nutrientes. Esta biomasa algal de acuerdo a su composición proximal podrá ser aprovechada con diferentes fines. Por otro lado, se busca disminuir el impacto ambiental causado por el vertido de los efluentes acuícolas en los ecosistemas acuáticos y evitar problemas ambientales como la eutrofización. El tratamiento de los efluentes podría ser el inicio de la recuperación del $\leq 10\%$ del volumen total de agua que es recambiado diariamente en los SRA.

1.4. Hipótesis

La producción de biomasa microalgal y la remoción de nutrientes en efluentes provenientes de un SRA de producción hiper intensiva de tilapia nilótica se puede realizar usando cultivos monoalgales de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scedesmus obliquus* en sistemas de cultivos estáticos con condiciones no controladas y en semicontinuos en condiciones controladas.

Capítulo 2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Evaluar la producción de biomasa algal y la capacidad de remoción de nutrientes (NAT, NO₂, NO₃ y PO₄) de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*, en sistemas de cultivos estáticos y semicontinuos utilizando efluentes generados en un SRA de producción hiper intensiva de tilapia nilótica.

2.2. Objetivos particulares

1. Determinar la densidad celular de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*, producida en sistemas de cultivos estáticos en condiciones no controladas para el tratamiento de efluentes crudos de un SRA.
2. Comparar la remoción de nutrientes (NAT, NO₂, NO₃ y PO₄) presentes en efluentes provenientes de un SRA, mediante el uso de *C. vulgaris* y *S. obliquus* en sistemas de cultivos estáticos y semicontinuos.
3. Determinar la dinámica de la concentración de nutrientes en sistemas de cultivos estáticos en condiciones no controladas y semicontinuos en condiciones controladas de luz y temperatura.
4. Elegir la especie con mejor capacidad de remoción de nutrientes, adaptación y mayor producción celular en sistemas de cultivos estáticos en condiciones no controladas.
5. Determinar la composición proximal de la biomasa algal producida de *C. vulgaris* y *S. obliquus* en sistemas de cultivos estáticos para el tratamiento de efluentes de un SRA.
6. Determinar la densidad celular producida de las microalgas *C. vulgaris* y *S. obliquus* en un sistema de cultivo semicontinuo en el tratamiento de efluentes provenientes de un SRA.
7. Elegir la especie con mejor capacidad de remoción de nutrientes, adaptación y mayor producción celular en un sistema de cultivo semicontinuo en condiciones controladas de luz y temperatura.

Capítulo 3. Materiales y métodos

3.1. Obtención de cepas y condiciones de cultivo

Las cepas de microalgas *S. obliquus* (SCO1) y *C. vulgaris* (CLV2) fueron obtenidas de la colección del cepario del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE). La cepa de *S. obliquus* se aisló de ambientes hipertróficos (aguas residuales) en Ensenada, Baja California. La microalga *C. vulgaris* fue adquirida del Instituto de Microbiología Aplicada (IAM) de la Universidad de Tokyo (Bunkyo-Ku, Japan). Los cultivos de ambas microalgas fueron escalados creciendo en tubos de ensayo (10 ml), matraces Erlenmeyer (125 y 250 ml) y posteriormente transferidos a volúmenes de 1 L en matraces Fernbach. El medio de cultivo se esterilizó en una autoclave (Modelo 18-A-16L Biomega, USA) a 121°C a una presión de 16 psi durante 30 minutos. Los cultivos estáticos se mantuvieron en condiciones controladas de luz a una irradiancia de 7500 ± 400 LUX con lámparas fluorescentes de luz blanca (PHILIPS, F40D/XPT. USA). El medio de cultivo “f” fue preparado como lo recomendado por Guillar y Rither (1962). Los cultivos se escalaron hasta un volumen total de 17 litros y mantenidos con un medio de cultivo “F/2” comercial (Proline, Aquatic Eco-Systems, Florida. USA).

3.1.1. Características generales de las especies

Las especies de microalgas del género *Chlorella*, son algas verdes unicelulares que pertenecen al género Chlorophyta. Las características principales son: forma esférica, midiendo de 2 a 10 μm de diámetro y no poseen flagelo. Las especies de microalgas del género *Scenedesmus*, son microalgas pertenecientes a la clase Chlorophyceae. *Scenedesmus* es un género comúnmente encontrado en agua dulce, presenta estructuras conocidas como cenobios de 4 hasta 8 células, con un tamaño promedio de 4 a 6 μm , son de forma elipsoidal, obtusa, acusada y algunas con espinas, con estructura colonial sin movilidad (Borowitzka y Lesley, 1998).

3.1.2. Determinación de la densidad celular

La densidad celular se evaluó por densidad óptica. Para la realización de las curvas de calibración de densidad celular de las 2 especies se hicieron diluciones de 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100% del volumen total. Las diluciones de las muestras se colocaron en una microplaca de 96 pozos de 300 μl . La longitud de onda se determinó para las 2 especies con un barrido de 400 nm a 740 nm utilizando un espectrofotómetro (Modelo EPOCH, Biotek USA). La transmitancia óptima se obtuvo a 680 nm. y las absorbancias obtenidas se graficaron contra la densidad celular. Para la obtención de la ecuación de la recta y la R^2 se usó una regresión (Figuras 1 y 2). En forma paralela la densidad celular de cada una de las diluciones fue determinada en triplicado y por conteo directo con una cámara de Neubauer de 0.100 mm (HAUSSER SCIENTIFIC, USA).

3.2. Calidad de agua

La calidad de agua se evaluó todos los días en cada experimento, 7 días (bioensayo I) y 17 días (bioensayo II). El nitrógeno amoniacal total (NAT) se midió con el método de azul de indofenol, los nitritos (NO_2) por el método de disociación con sulfanilamida y naftiletildiamina. Los nitratos (NO_3) se midieron por la lectura directa 220 y 275 nm por el método ultravioleta usando una microplaca de cuarzo. Los fosfatos (PO_4) se midieron con el método del ácido ascórbico (APHA, 1998). El nitrógeno total (NT) se midió por el método de persulfato de potasio (Adams, 1989). La alcalinidad se determinó por titulación y el pH se determinó con un potenciómetro (Modelo pH 10A, EcoSense, China).

3.3. Formulación del efluente sintético

Antes de iniciar cada bioensayo se caracterizó el efluente crudo para determinar la concentración de nutrientes y con esta información elaborar un efluente sintético que serviría como efluente control. Para la formulación del efluente sintético, se usó el número de Avogadro para igualar la concentración del nitrógeno amoniacal total (NAT),

nitritos (NO_2), nitratos (NO_3) y fosfatos (PO_4) previamente determinados en el efluente crudo. El efluente sintético se elaboró con cloruro de amonio (NH_4Cl), nitrito de sodio (NaNO_2), nitrato de sodio (NaNO_3) y fosfato de potasio (KH_2PO_4).

3.4. Análisis proximales

Al finalizar cada bioensayo con cada una de las 2 especies de microalgas en los sistemas estáticos (Bioensayo I), se filtraron muestras de la biomasa algal producida en cada tratamiento, usando filtros de fibra de vidrio GF/A (45 mm) (Whatman, UK) (Sorokin, 1973). Los filtros se colocaron en tubos de 1.5 ml y se mantuvieron en nitrógeno líquido (-196°C) para su posterior análisis (Figura 1). La extracción de carbohidratos se llevó a cabo con ácido sulfúrico, metodología descrita por Whyte (1987). La cuantificación se realizó mediante la técnica descrita por Dubois *et al.*, (1956). La extracción de lípidos fue realizada con una mezcla de cloroformo-metanol-agua, técnica descrita por Bligh y Dyer (1959). La cuantificación fue determinada por el método establecido de Pande *et al.*, (1963). La concentración de proteínas se llevó a cabo mediante el método indirecto de nitrógeno total (Adams, 1989)



Figura 1. Congelación en nitrógeno líquido (-196°C) de las muestras filtradas para determinación proximal de *C. vulgaris* y *S. obliquus*.

3.5. Obtención del efluente crudo

El efluente se obtuvo de un sistema de recirculación hiper intensivo de tilapia nilótica, con una densidad aproximada de 95 kg/m³. Los peces se alimentaron con una dieta comercial (Nutripec, PURINA, México), con una composición de 32% de proteína y 16% de lípidos. Los efluentes se obtuvieron directamente después de llevar a cabo los retrolavados de los biofiltros. Una vez obtenidos los efluentes, estos fueron transferidos a un tanque de 1 m³ en donde se mantuvieron por un tiempo de residencia hidráulica de 3 horas para poder realizar la separación de la fracción particulada de la fracción disuelta la cual sería utilizada para los bioensayos (Figura 2). La fracción disuelta de los efluentes se colocó en garrafones de plástico transparente con una capacidad de 19 litros y estos fueron separados de acuerdo a las características de cada uno de los tratamientos descrito abajo (sintético, clorado y no clorado).



Figura 2. Obtención del efluente del RAS para la separación de la materia orgánica.

3.6 Toma de muestras

Los muestreos en cada bioensayo se llevaron a cabo diariamente durante los 7 días (cultivos estático) y los 17 días del cultivo semicontinuo, para la determinación de la densidad celular y la concentración de nutrientes (NAT , NO_2 , NO y PO_4), así como alcalinidad y pH. Un volumen de 14 ml fue centrifugado a 1500 rpm durante 15 minutos para separar las células y la materia orgánica que se encontraban presentes en el medio y poder realizar la determinación de nutrientes por espectrofotometría.

3.7 Eficiencias de remoción

El porcentaje de remoción de nutrientes (NAT , NO_2 , NO_3 y PO_4), se calculó considerando la relación del valor inicial, respecto a la disminución de la concentración obtenida al día final de cada bioensayo. El porcentaje de producción de NO_2 , fue obtenido al relacionar la concentración del día inicial con respecto al incremento presentado al día último de cada bioensayo.

3.8. Diseño experimental

En este estudio se hicieron 2 experimentos: Experimento I, 3 bioensayos con *C. vulgaris* y 3 bioensayos con *S. obliquus*, evaluando 3 tratamientos: Tratamiento I (efluente sintético), tratamiento II (efluente clorado) y tratamiento III (efluente no clorado). Experimento II, un bioensayo donde se evaluaron 3 tratamientos: Tratamiento I, control (efluente crudo), tratamiento II, (*C. vulgaris* en efluente crudo) y tratamiento III (*S. obliquus* en efluente crudo).

3.8.1 Experimento I

La capacidad de remoción de nutrientes fue evaluada usando 2 diferentes especies de microalgas: *C. vulgaris*. y *S. obliquus* en sistema de cultivo estático. Se hicieron para cada especie 3 bioensayos en diferentes tiempos, cada bioensayo tuvo 3 tratamientos por triplicado (Figura 3). El tratamiento I fue un efluente sintético utilizado como control positivo. El tratamiento II fue un efluente clorado y neutralizado con tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) a las 24 h de haber agregado el cloro. El tratamiento III fue el efluente crudo. El inóculo inicial de microalgas fue de aproximadamente 8×10^5 cél/ml en cada uno de los tratamientos. Los bioensayos se mantuvieron por 7 días en un volumen total de 17 litros con aireación constante en condiciones no controladas de luz y temperatura.



Figura 3. Tratamientos por triplicado para evaluar la capacidad removedora de nutrientes de *C. vulgaris* y *S. obliquus* en cultivo estático.

3.8.2 Experimento II

Una vez identificada las fases de crecimiento y la respuesta de adaptación a los efluentes acuícolas de las microalgas *C. vulgaris* y *S. obliquus*, en la remoción de nutrientes en cultivos estáticos, se continuó con el establecimiento de cultivos semicontinuos unialgales para las 2 especies.

La capacidad removedora de nutrientes de *C. vulgaris* y *S. obliquus* fue evaluada en un cultivo semicontinuo monoalgal en un volumen de 17 litros en condiciones controladas de luz ($7,500 \pm 400$ Lux) y temperatura ($20 \pm 0.6^\circ\text{C}$) durante 17 días (Figura 4). El tratamiento I o control biológico consistió en el efluente crudo sin inocular. El tratamiento II fue un efluente no clorado inoculado con 8×10^5 cél/ml de *C. vulgaris*. El tratamiento III fue un efluente no clorado inoculado con 8×10^5 cél/ml de *S. obliquus*. Para determinar la producción de densidad celular y la capacidad removedora de nutrientes de las 2 especies en el sistema semicontinuo, fue necesario llevar a cabo diluciones de los cultivos del 30% del volumen total cada tercer día. Las diluciones

comenzaron una vez que los cultivos se encontraban en fase de crecimiento exponencial.

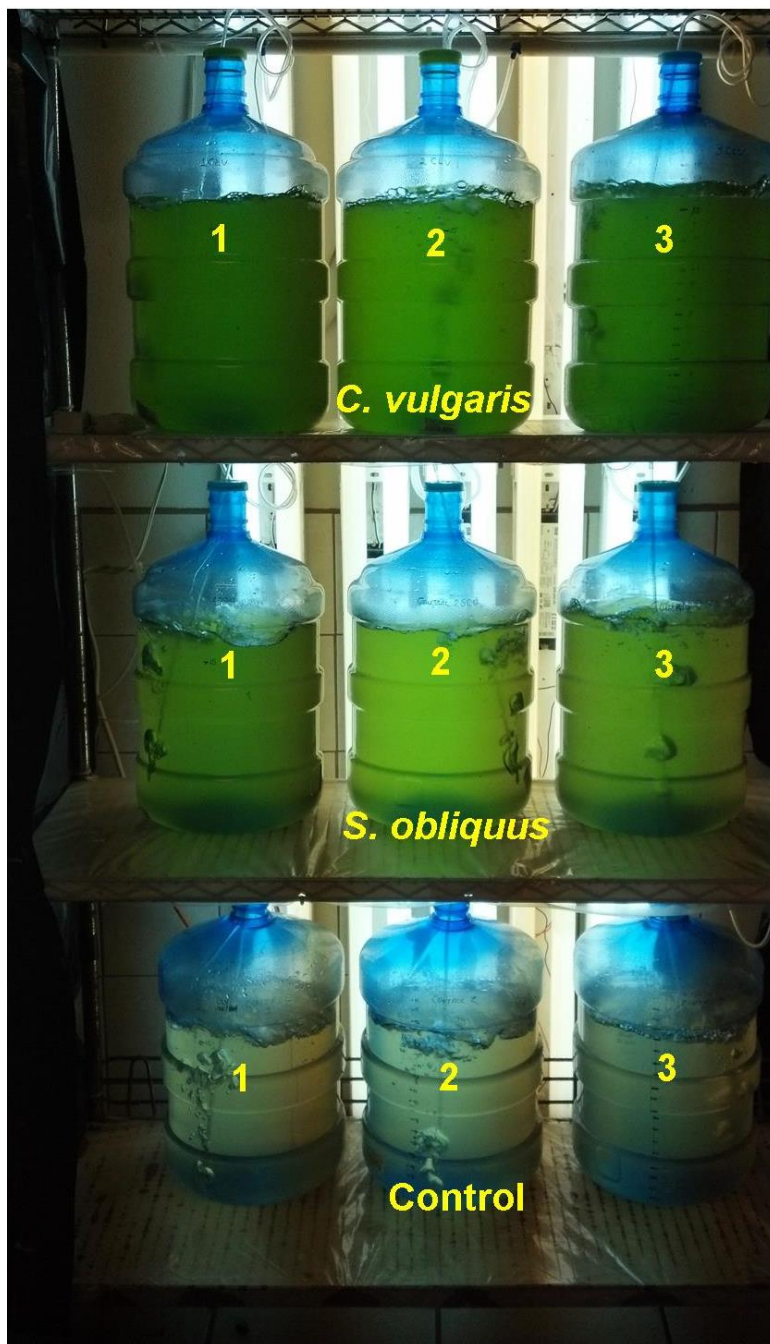


Figura 4. Tratamientos para evaluar la capacidad de remoción de nutrientes de *C. vulgaris* y *S. obliquus* en sistema semicontinuo.

El agua con la que se hicieron las diluciones era el efluente crudo proveniente de los SRA. El tiempo transcurrido entre las diluciones en los cultivos, se estableció con el

objetivo de permitir a las células adaptarse a las nuevas condiciones del medio de cultivo y al estrés a causa de la adición de efluente nuevo.

3.9. Análisis estadístico

En todos los datos se verificó que cumplieran los postulados de homogeneidad de varianza, normalidad, y en su caso de linealidad (Zar, 1984).

La comparación la tendencia de la densidad celular con respecto a los días de cultivo en los sistemas estáticos y sistemas semicontinuos en los diferentes tratamientos se llevó a cabo con un análisis de covarianza (ANCOVA). La evaluación de la dinámica de los nutrientes (NAT, NO₂, NO₃ y PO₄) entre los 3 diferentes tratamientos y los días de cultivo en los sistemas estáticos y sistemas semicontinuos se llevó a cabo con un análisis de covarianza (ANCOVA). La composición proximal de proteínas, lípidos y carbohidratos entre especies, tratamientos y experimentos se llevó a cabo usando un análisis de varianza (ANOVA) de 3 vías. Los datos de porcentaje de proteínas, lípidos y carbohidratos previos a su análisis se transformaron con la función arcoseno raíz cuadrada. En los casos donde se encontraron diferencias significativas entre las medias de cada uno de los diferentes tratamientos se llevó a cabo una prueba a *posteriori* Tukey con un nivel de significancia de $P < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SAS (SAS[®] Software 2007).

Capítulo 4. Resultados

4.1. Curvas de calibración para la determinación de densidad celular

Las curvas de calibración obtenidas para la determinación celular de *C. vulgaris* y *S. obliquus* se obtuvieron con una longitud de onda de 680 nm (Figuras 5 y 6).

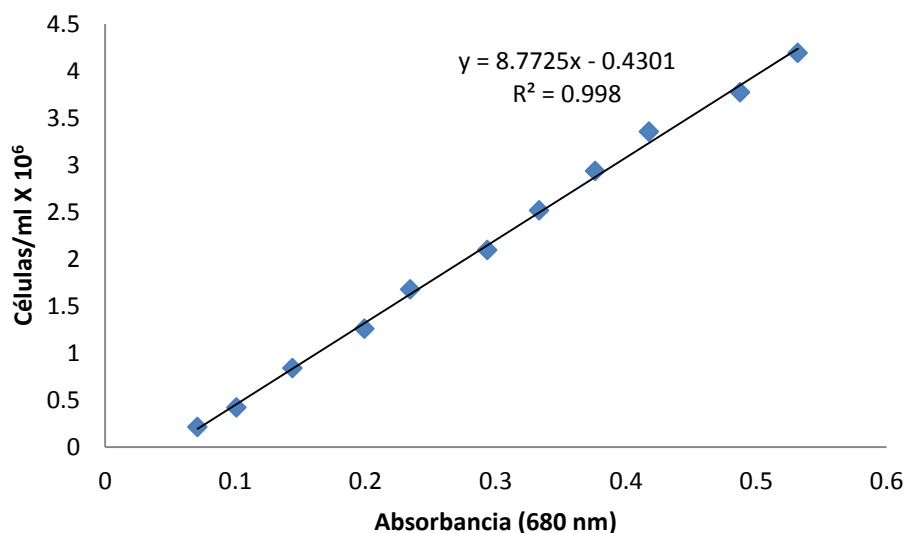


Figura 5. Curva de calibración para la determinación de densidad celular de *C. vulgaris*.

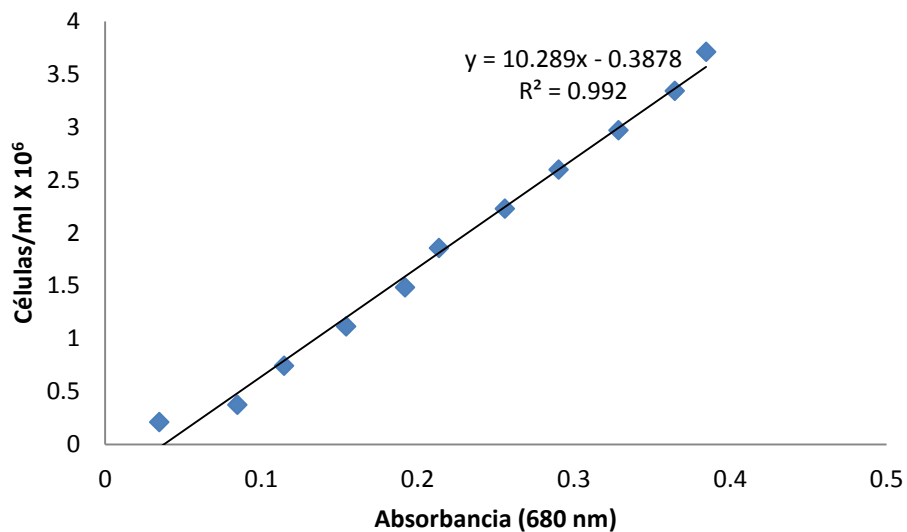


Figura 6. Curva de calibración para la determinación de densidad celular de *S. obliquus*.

4.2. Bioensayo I *Chlorella vulgaris*

4.2.1. Crecimiento microalgal (cél/ml)

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($P = 0.0591$) en el crecimiento microalgal en los diferentes. El mayor crecimiento fue registrado ($4.0 \times 10^6 \pm 849,264$ células/ml) al día 7 y el crecimiento más bajo se presentó en el efluente no clorado ($2.6 \times 10^5 \pm 140,680$ células/ml). La tendencia del crecimiento celular es explicada en el modelo de regresión lineal ($P < 0.001$ $R^2 = 0.7652$) (Figura 7).

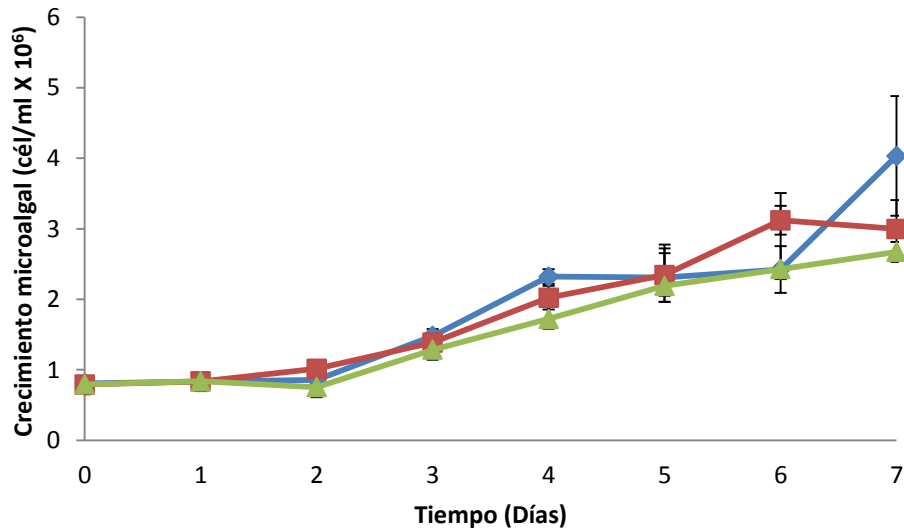


Figura 7. Valores promedio del crecimiento microalgal (cél/ml) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($P = 0.7692$) en la tasa de crecimiento. El análisis de covarianza no detectó cambios ($P = 0.7650$) en la tasa de crecimiento con respecto a los días de cultivo en los tratamientos. La tasa más alta de crecimiento se registró para el tratamiento de efluente sintético (0.78 ± 0.08) y el efluente no clorado (0.77 ± 0.15). Sin embargo, a partir del día 4 se presentaron disminuciones en las tasas de crecimiento en los 3 tratamientos. La tendencia de la tasa de crecimiento no se explica en el modelo de regresión lineal ($P = 0.4269$ $R^2 = 0.0058$).

4.2.2. Remoción de Nitrógeno Amoniacal Total (NAT)

No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.2786$) en la remoción de NAT entre los tres tratamientos. El análisis de covarianza no detectó cambios ($P = 0.1343$) en la concentración de NAT (mg/l) en los tratamientos con los días de cultivo. Las concentraciones iniciales fueron bajas 0.079545 ± 0.005 mg/l (efluente sintético), 0.15538 ± 0.05 mg/l (efluente clorado) y 0.115835 ± 0.04 mg/l (efluente no clorado). El consumo total de NAT se llevó a cabo en las primeras 24 horas en los tratamientos de efluente sintético y efluente no clorado. La tendencia en la concentración de NAT no es explicada en el modelo de regresión lineal ($P = 0.0811$ $R^2 = 0.0292$) (Figura 8).

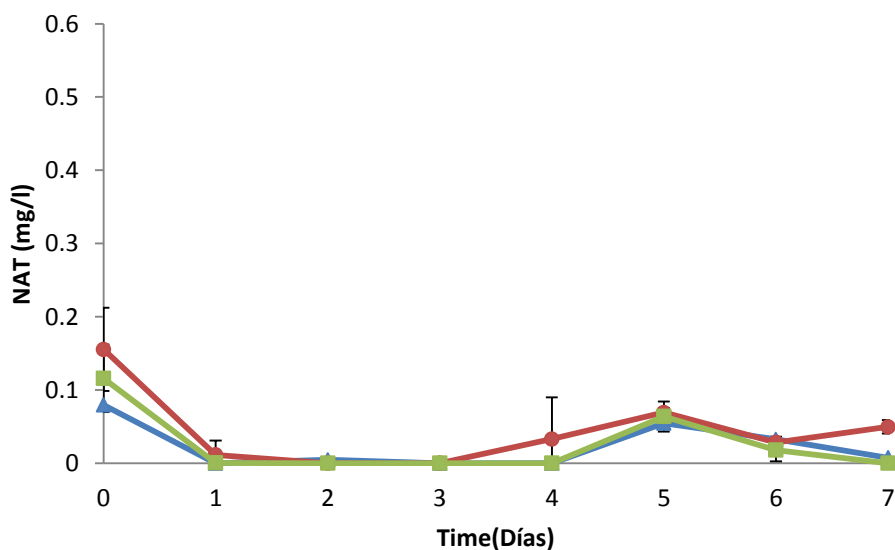


Figura 8. Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitrógeno amoniacal total (NAT) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

Las eficiencias de remoción en los tratamientos fueron: 90.5% (efluente sintético), 64.9% (efluente clorado) y 100%(efluente no clorado) (Figura 9).

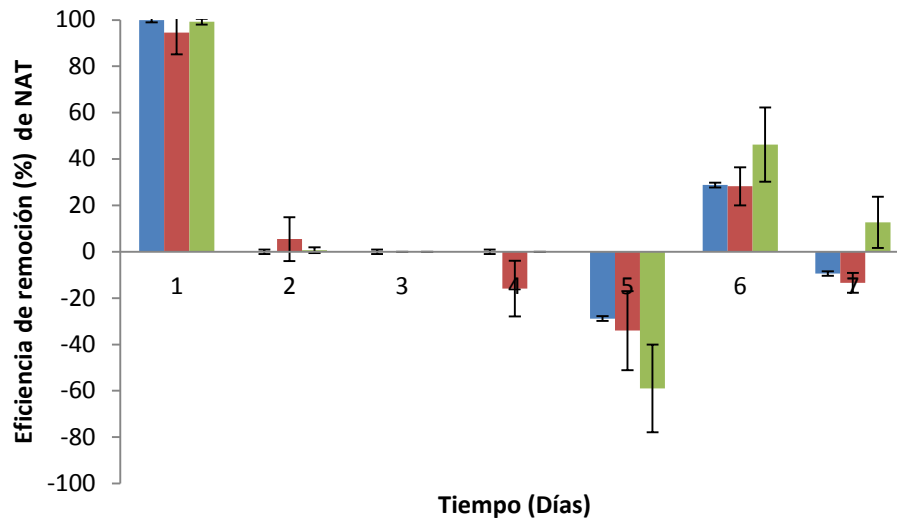


Figura 9. Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.

4.2.3. Nitritos (NO₂)

Se encontraron diferencias significativas ($P = 0.0055$) en la concentración de NO₂ entre tres los tratamientos. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en la concentración de NO₂ (mg/l) en los tratamientos con los días de cultivo. En el día 0 las concentraciones registradas en los tratamientos fueron de 0.210 ± 0.002 (mg/l) en el efluente sintético, 0.201 ± 0.014 (mg/l) efluente no clorado y 0.048 ± 0.004 (mg/l) para efluente clorado. Durante los siete días del bioensayo se registró la producción de NO₂, con la mayor producción al día 7 registrada en el efluente no clorado (0.902 ± 0.036 mg/l). La tendencia en las concentraciones de NO₂ es explicada en el modelo de regresión lineal ($P < 0.0001$ $R^2 = 0.7211$) (Figura 10).

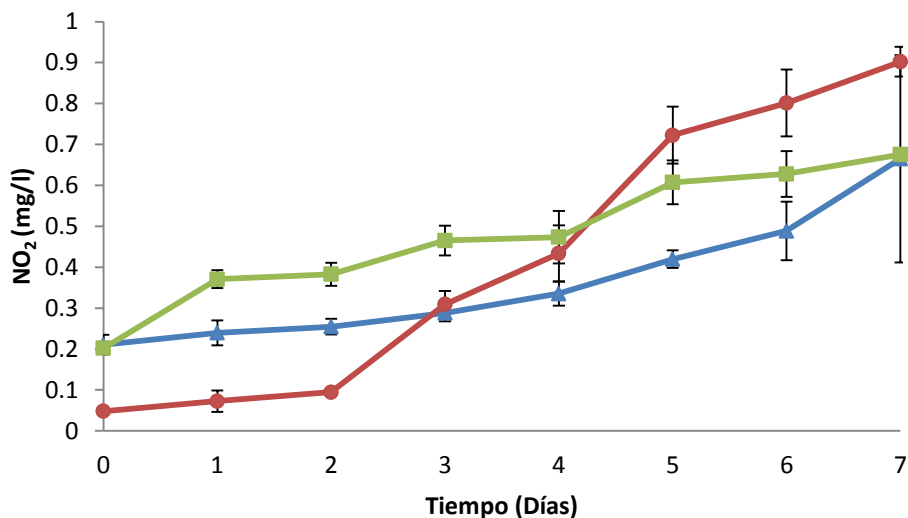


Figura 10. Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitritos (NO_2) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

En los 3 tratamientos se presentó un aumento en la concentración de NO_2 , de 210% (efluente sintético), 1,781% (efluente clorado) y 235%(efluente no clorado) (Figura 11).

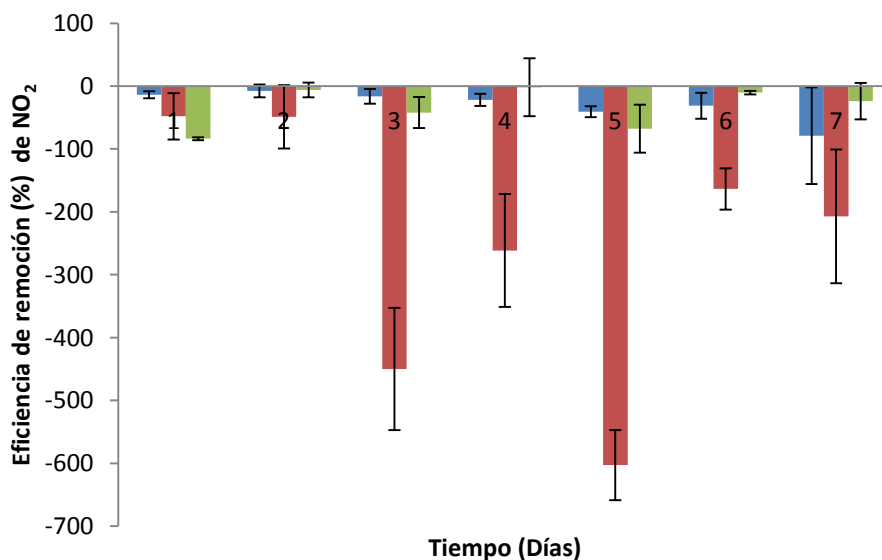


Figura 11. Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitritos (NO_2) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.

4.2.4. Remoción de nitratos (NO_3)

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) en la remoción de los (NO_3). El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en la concentración de NO_3 (mg/l) con los días de cultivo entre los tratamientos, con tendencias similares entre los tratamientos de efluente clorado y no clorado. La concentración inicial más alta se registró en el efluente sintético (84.4 ± 2.1 mg/l), alcanzando una concentración final de 65.1 ± 3.7 mg/l. Las concentraciones iniciales registradas para los tratamientos de efluente clorado y no clorado fueron de 68.6 ± 2.1 mg/ y 67.6 ± 0.6 mg/l, obteniendo las menores concentraciones en el día 7 con 51 ± 1.2 mg/l y 51.4 ± 0.9 mg/l, respectivamente. Las tendencias en la concentración de NO_3 no se explica en el modelo de regresión lineal ($P < 0.0001$ $R^2 = 0.3566$) (Figura 12).

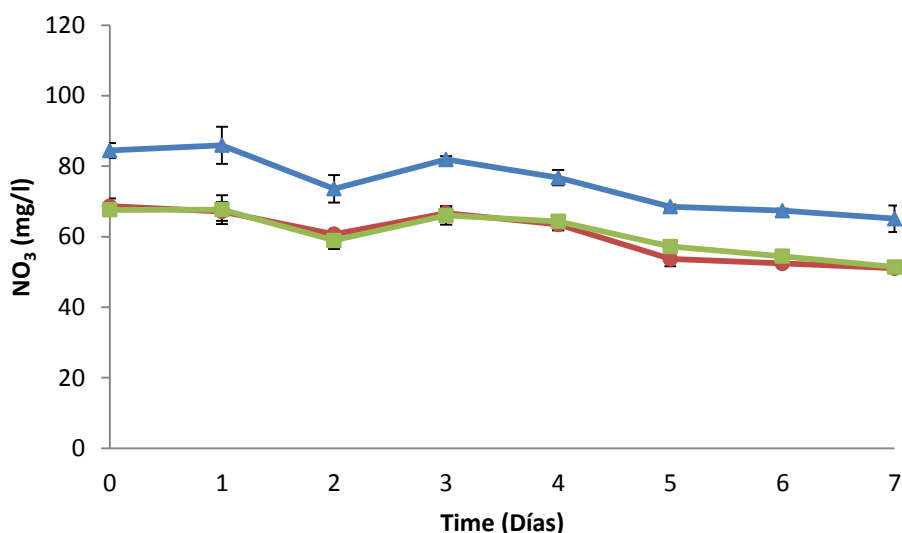


Figura 12. Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitratos (NO_3) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

Se registró la remoción de NO_3 a lo largo de los siete días del bioensayo en los 3 tratamientos. Las eficiencias registradas fueron de 22.8% en el efluente sintético, 25.5% en el efluente clorado y 23.9% para el efluente no clorado (Figura 13).

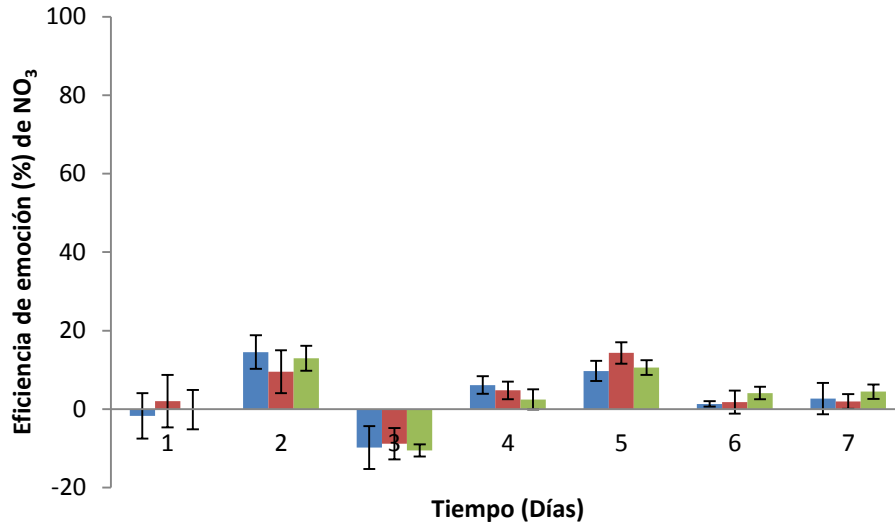


Figura 13. Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitratos (NO_3) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.

4.2.5. Remoción de fosfatos (PO_4)

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) en la remoción de PO_4 entre los tratamientos donde la remoción fue mayor en el efluente artificial que en el clorado y no clorado. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en la concentración de PO_4 (mg/l) con los días de cultivo entre los tratamientos. Las concentraciones iniciales registradas en el efluente sintético fueron 1.093 ± 0.031 (mg/l), en el efluente clorado 1.733 ± 0.022 (mg/l) y en el efluente no clorado de 1.733 ± 0.038 (mg/l). En los 3 tratamientos se registró una disminución en la concentración de PO_4 con respecto a los días. Sin embargo, la remoción total de PO_4 se registró en el efluente sintético en el día 4. La tendencia en la concentración de PO_4 se explica parcialmente en el modelo de regresión lineal ($P < 0.0001$ $R^2 = 0.5283$) (Figura 14).

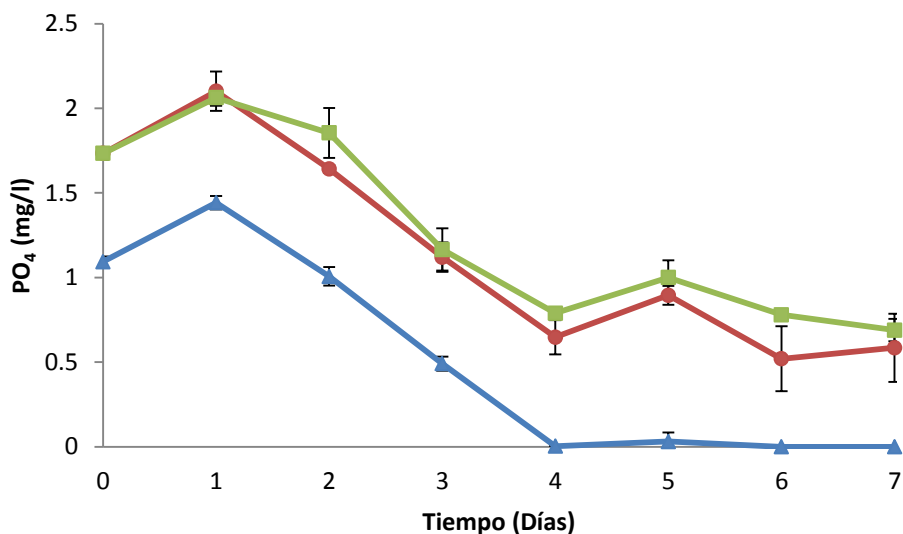


Figura 14. Valores promedio de la concentración (mg/l) de fosfatos (PO_4) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

Las eficiencias de remoción fueron de 100% para el efluente sintético, alcanzando el consumo total en el día 4. En los tratamientos de efluente clorado y no clorado las eficiencias incrementaron con respecto al tiempo alcanzando eficiencias totales de 66.3% (efluente clorado) y 60.1% (efluente no clorado) (Figura 15).

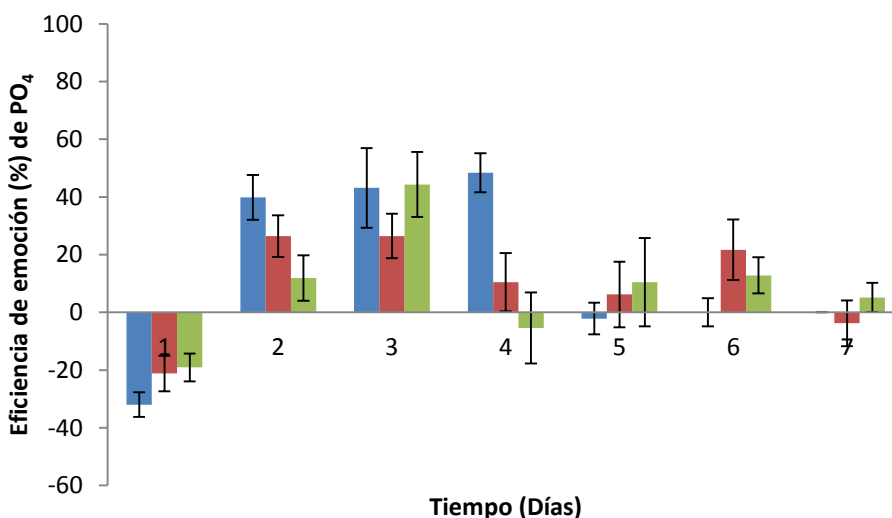


Figura 15. Valores promedio de la eficiencia de remoción de fosfatos (PO_4) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.

4.2.6. Alcalinidad (CaCO_3)

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) entre los tratamientos. El análisis de covarianza detectó ($P < 0.0001$) en la concentración de CaCO_3 (mg/l) con los días de cultivo en los tratamientos. Las tendencias registradas en los tratamientos de efluente clorado y no clorado fueron similares y diferentes del efluente sintético, registrando concentraciones iniciales CaCO_3 (76.6 ± 5.7 mg/l), a diferencias de la concentración registrada en el tratamiento de efluente sintético (150 ± 10 mg/l). La tendencia en las concentraciones de CaCO_3 no se explica en el modelo de regresión lineal ($P = 0.0102$ $R^2 = 0.0777$) (Figura 16).

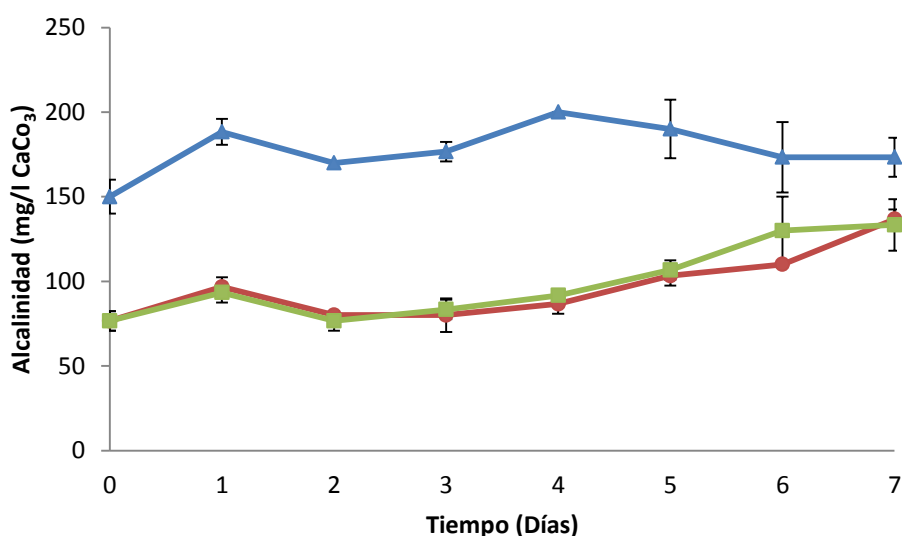


Figura 16. Valores promedio de la concentración (mg/l) de alcalinidad (CaCO_3) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

4.2.7. pH

No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.0904$) entre los tratamientos. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en los valores de pH con los días de cultivo en los tratamientos. La tendencia observada entre los 3 tratamientos fue similar durante el cultivo. En los 3 tratamientos los valores iniciales de pH se registraron en 8.6 ± 0.062 en el efluente sintético, 8.4 ± 0.020 en el efluente clorado y 8.3 ± 0.056 para el efluente no clorado. A lo largo del bioensayo se registró un incremento en el pH.

El valor más alto de pH registrado fue de 10 ± 0.098 (efluente clorado) al día 7. En la tendencia de pH entre los tratamientos con respecto al tiempo se explica en el modelo de regresión lineal ($P < 0.0001$ $R^2 = 0.7909$) (Figura 17).

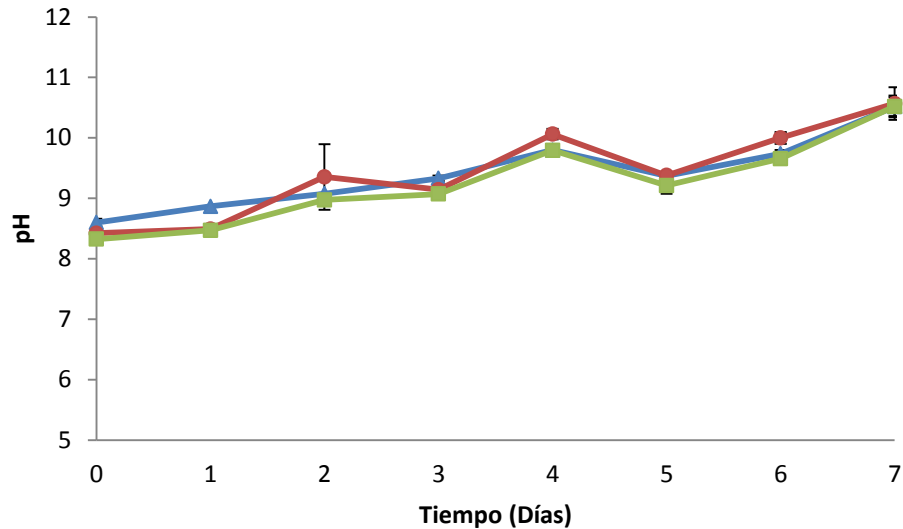


Figura 17. Valores promedio de la concentración (mg/l) de pH en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

4.3. Bioensayo II *Chlorella vulgaris*

4.3.1. Crecimiento microalgal (cél/ml)

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) entre los tratamientos. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en la densidad celular (cél/ml) con los días de cultivo. Las tendencias fueron similares en los tratamientos de efluente sintético y efluentes clorados pero diferentes del efluente no clorado. La densidad celular más alta se registró en el efluente clorado ($4 \times 10^6 \pm 578,409$ células/ml). La densidad más baja se registró en el efluente no clorado ($1.9 \times 10^6 \pm 672,716$ células/ml). El aumento de la densidad celular durante el cultivo en los tratamientos se explica en el modelo de regresión lineal ($P < 0.0001$ y $R^2 = 0.6618$) (Figura 18).

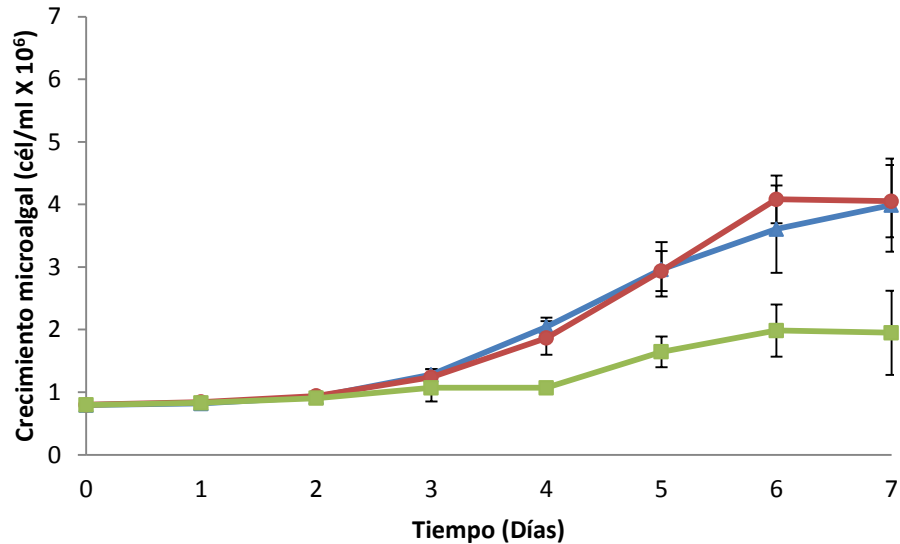


Figura 18. Valores promedio del crecimiento microalgal (cél/ml) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.0948$) en las tasas de crecimiento entre los tratamientos. El análisis de covarianza detectó cambios ($P = 0.1197$) en la tasa de crecimiento con respecto a los días de cultivo en los tratamientos. En los tratamientos de efluente sintético y efluente clorado se registró un aumento constante en la tasa de crecimiento, obteniendo la mayor tasa de crecimiento al día 4 con 0.67 ± 0.076 (efluente sintético) y al día 5 con 0.58 ± 0.094 (efluente clorado). El comportamiento de la tasa de crecimiento no se explica en el modelo de regresión lineal ($P = 0.2928$ $R^2 = 0.0020$).

4.3.2. Remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT)

No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.2053$) en la remoción de NAT entre los tratamientos. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en la concentración de NAT (mg/l) con respecto a los días de cultivo en los tratamientos. Las concentraciones iniciales fueron de 0.368 ± 0.022 mg/l (efluente sintético), 0.398 ± 0.026 mg/l (efluente clorado) y 0.388 ± 0.007 mg/l (efluente no clorado). El consumo total se registró en las primeras 24 h de cultivo únicamente en el tratamiento de efluente sintético, mientras que en el efluente clorado en las primeras 24 h se obtuvo una

concentración de 0.022 ± 0.002 mg/l. En el efluente no clorado el consumo total de NAT se presentó hasta el día 5 de cultivo. La tendencia en la concentración de NAT en los tratamientos no es explicada en el modelo de regresión lineal ($P < 0.0001$ $R^2 = 0.4034$) (Figura 19).

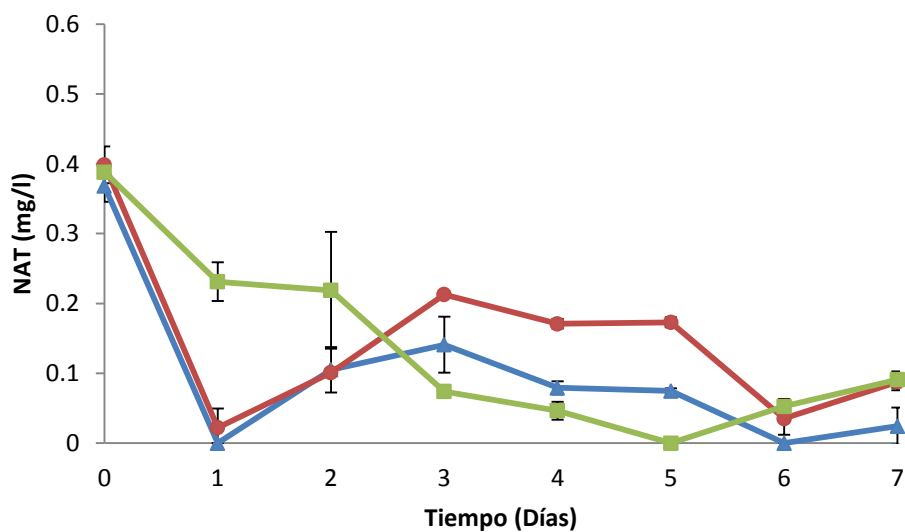


Figura 19. Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitrógeno amoniacal total (NAT) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

Las eficiencias más altas de NAT se presentaron en las primeras 24 h de cultivo en el efluente sintético (100%) y efluente clorado (94.6%). En el efluente no clorado la eficiencia de remoción total fue de 76.6% (Figura 20).

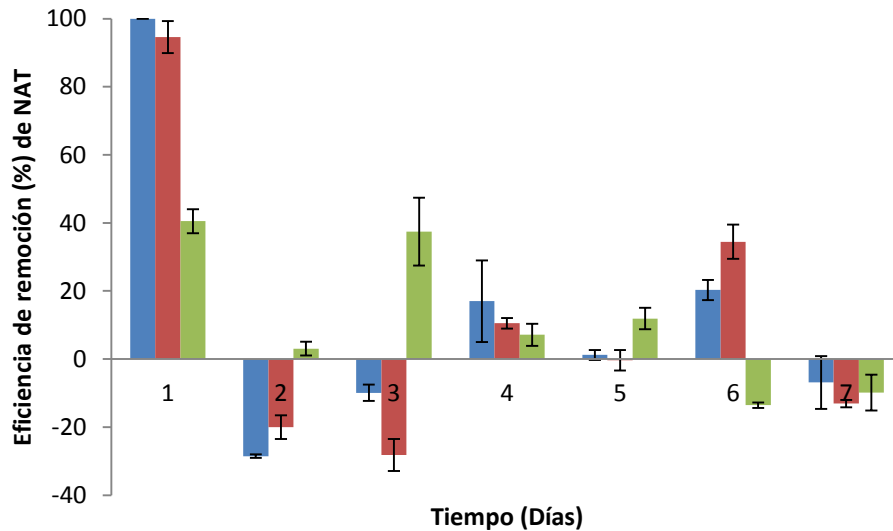


Figura 20. Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.

4.3.3. Nitritos (NO_2)

Se encontraron diferencias significativas ($P = 0.0029$) en las concentraciones de NO_2 entre los tratamientos. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en la concentración de NO_2 (mg/l) con respecto a los días de cultivo en los tratamientos, presentándose tendencias similares entre los tratamientos de efluente sintético y clorado y diferentes al efluente no clorado. En el día 0 las concentraciones registradas en los fueron de 0.360 ± 0.005 (mg/l) en el efluente sintético, 0.415 ± 0.025 mg/l en el efluente no clorado y 0.199 ± 0.030 (mg/l) para el efluente clorado. La producción más alta se encontró en el día 7 de cultivo, en los tratamiento de efluente sintético (0.680 ± 0.185 mg/l) y el efluente clorado (0.703 ± 0.007 mg/l). La tendencia en las concentraciones de NO_2 no es explicada en el modelo de regresión lineal ($P < 0.0001$ $R^2 = 0.3242$) (Figura 21).

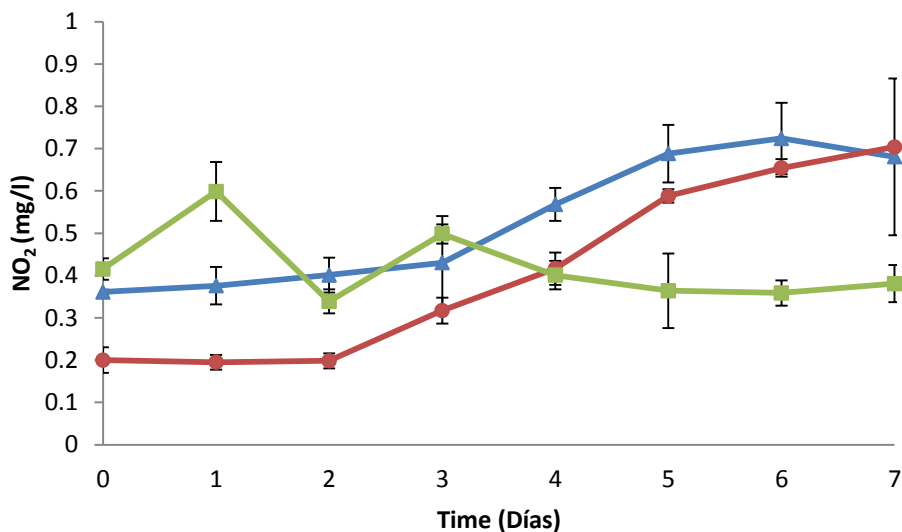


Figura 21. Valores promedios de la concentración (mg/l) de nitritos (NO_2) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

En el tratamiento de efluente no clorado se presentó una baja eficiencia de remoción (7.75%) de NO_2 . En los tratamiento de efluente sintético y efluente clorado se registró una producción de NO_2 con respecto al tiempo de cultivo, con aumentos de 89.02% (efluente sintético) y 257.2% (efluente clorado) (Figura 22).

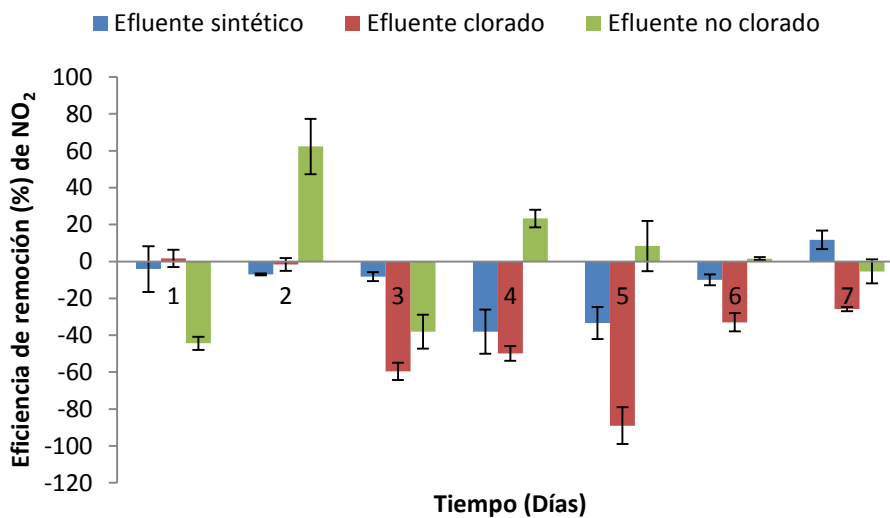


Figura 22. Valores promedios de la eficiencia de remoción de nitritos (NO_2) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.

4.3.4. Remoción de nitratos (NO₃)

No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.2139$) en la remoción de NO₃ entre los tratamientos. El análisis de covarianza detectó cambios ($P = 0.2425$) en la concentración de NO₃ (mg/l) con respecto a los días de cultivo en los tratamientos, registrando tendencias similares entre los tratamientos. La concentración en el día inicial fue de 69.6 ± 1.2 (mg/l) en el tratamiento de efluente sintético, 66.2 ± 5.5 (mg/l) en el efluente clorado y 68 ± 2.6 (mg/l) para el efluente no clorado. La concentración más baja se registró en el día 2 para el efluente no clorado (57.2 ± 1.6 mg/l). La tendencia en las concentraciones no es explicada en el modelo de regresión lineal ($P= 0.2964$ $R^2 = 0.0015$) (Figura 23).

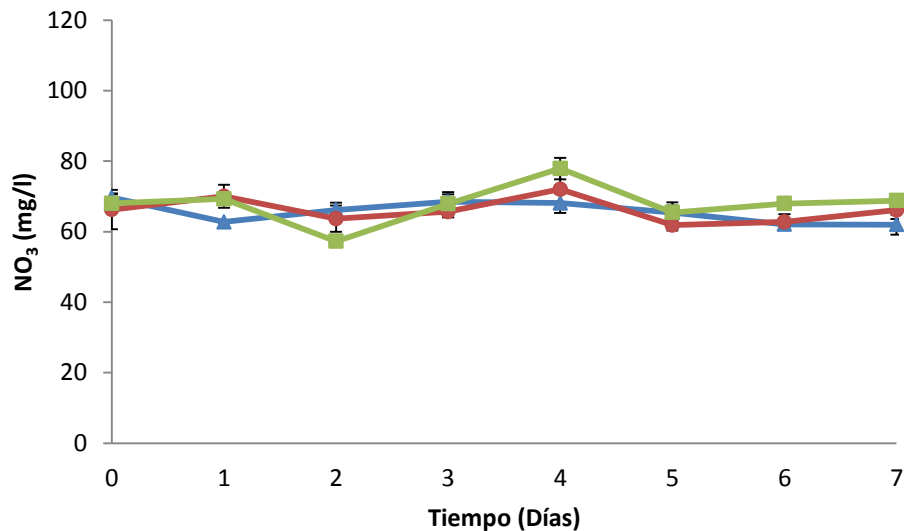


Figura 23. Valores promedios de la concentración (mg/l) de nitratos (NO₃) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

La remoción de NO₃ únicamente se registró en los tratamientos de efluente sintético y clorado, con eficiencias de 11.08% y 5.15%, respectivamente. En el efluente clorado se presentó un aumento de 1.27%, donde se observó una dinámica de consumo/producción durante el bioensayo (Figura 24).

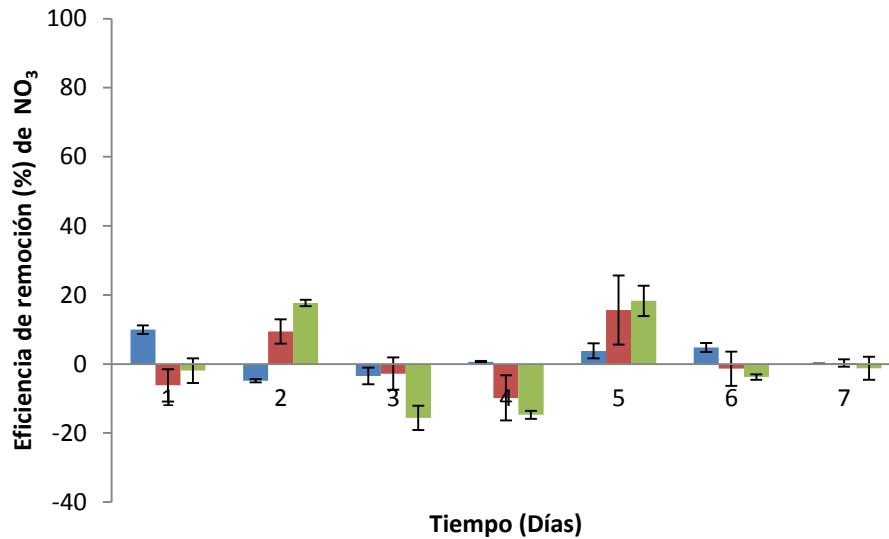


Figura 24. Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitratos (NO₃) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.

4.3.5. Remoción de fosfatos (PO₄)

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) en la remoción de PO₄ entre los tratamientos. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en la concentración de PO₄ (mg/l) con respecto a los días de cultivo en los tratamientos, con tendencias similares entre los tratamientos. El consumo total se registró en el tratamiento de efluente sintético, el cual presentó una concentración inicial de 1.621 ± 0.047 (mg/l). Los tratamientos de efluente clorado y efluente no clorado registraron una concentración inicial de 1.633 ± 0.037 (mg/l) y 1.727 ± 0.204 (mg/l), respectivamente, sin presentar un consumo total. La tendencia en la concentración de PO₄ es explicada parcialmente en el modelo de regresión lineal ($P < 0.0001$ $R^2 = 0.5790$) (Figura 25).

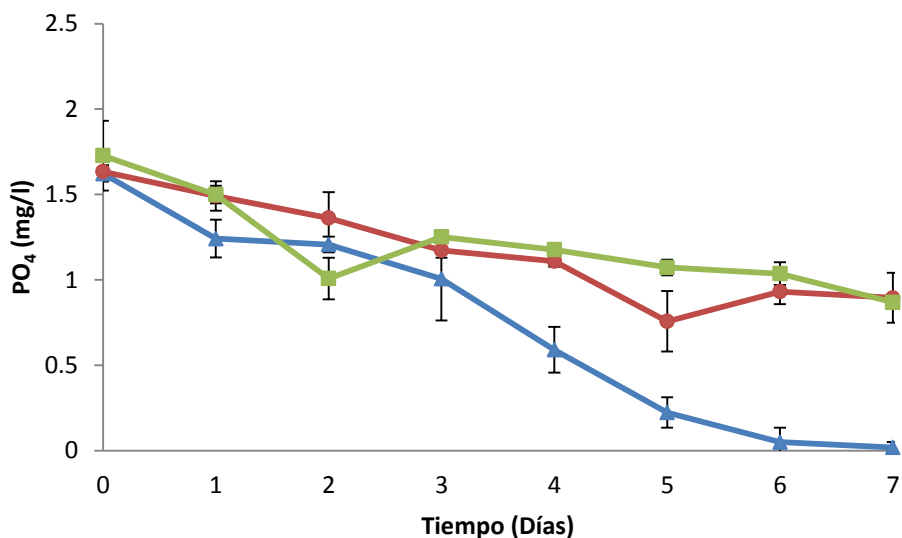


Figura 25. Valores promedio de la concentración (mg/l) de fosfatos (PO_4) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

Las eficiencias de remoción incrementaron con respecto al tiempo, detectando la más alta en el tratamiento de efluente sintético con 98.8%. En los tratamientos de efluente clorado y no clorado las eficiencias registradas fueron de 45.3% y 49.3%, respectivamente (Figura 26).

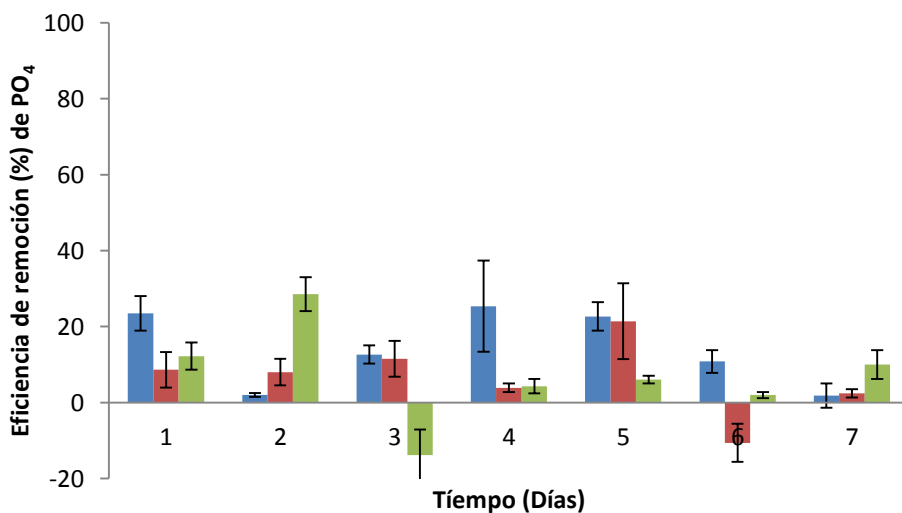


Figura 26. Valores promedio de la eficiencia de remoción de fosfatos (PO_4) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.

4.3.6. Alcalinidad (CaCO_3)

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) en las concentraciones de CaCO_3 entre los tratamientos. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en la concentración de CaCO_3 (mg/l) en los días de cultivo entre los tratamientos. Las tendencias en las concentraciones de CaCO_3 fueron similares en los tratamientos de efluente clorado y no clorado durante los 7 días de cultivo, con concentraciones iniciales de 80 y 76.6 ± 5.7 (mg/l), respectivamente y diferentes al efluente sintético. Las concentraciones de CaCO_3 registradas durante todo el cultivo en el tratamiento de efluente sintético, fueron las más altas con respecto a las concentraciones registradas en los tratamientos de efluente clorado y no clorado durante con una concentración inicial de 123 ± 5 (mg/l) y una final de 166 ± 11 (mg/l). La tendencia en las concentraciones de CaCO_3 no se explica en el modelo de regresión lineal ($P = 0.0018$ $R^2 = 0.1187$) (Figura 27).

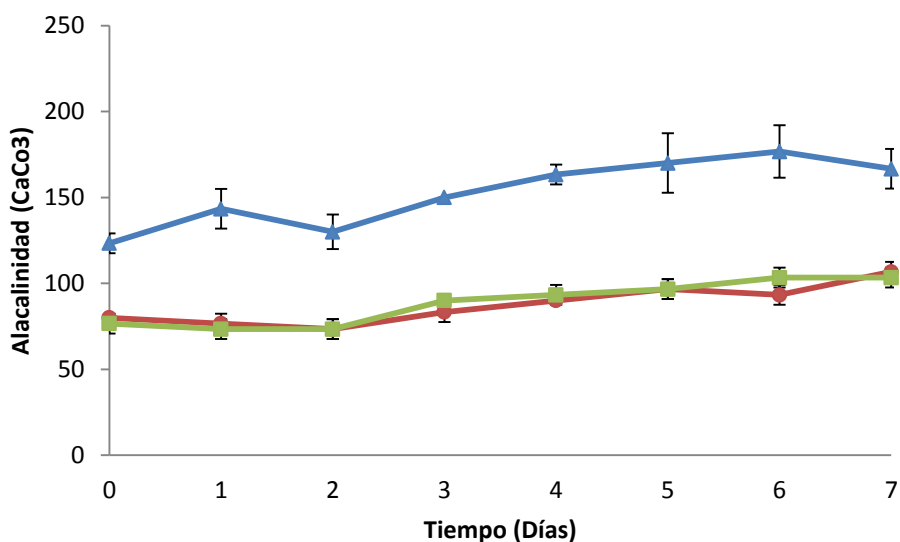


Figura 27. Valores promedio de la concentración (mg/l) de alcalinidad (CaCO_3) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

4.3.7. pH

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) en el pH entre los tratamientos de efluente sintético y no clorado. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en los valores de pH con respecto a los días de cultivo en los tratamientos. A lo largo de los días del bioensayo, se registró un aumento constante en el pH en todos los tratamientos. Las concentraciones iniciales registradas fueron de 8.4 ± 0.045 en el efluente sintético, 8.2 ± 0.028 en el efluente clorado y 8.21 ± 0.01 para el efluente no clorado. Al día 7 de cultivo, el pH más alto se registró en el efluente sintético (9.4 ± 0.222). La tendencia de los valores de pH no se explica en el modelo de regresión lineal ($P < 0.0001$ $R^2 = 0.3685$) (Figura 28).

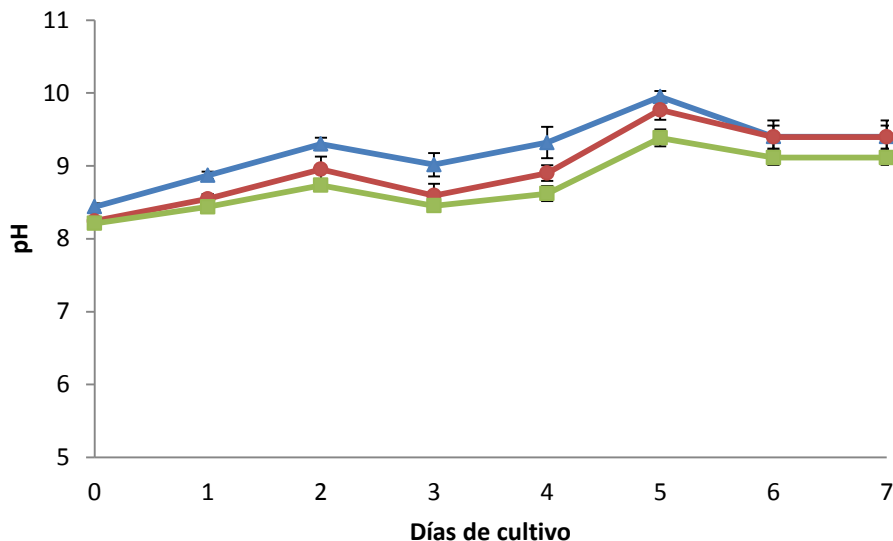


Figura 28. Valores promedio pH en los tratamientos de efluente sintético, efluente clorado y efluente no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

4.4. Bioensayo III *Chlorella vulgaris*

4.4.1. Crecimiento microalgal (cél/ml)

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) en la densidad celular, el efluente no clorado fue diferente al sintético y clorado. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en la densidad celular (cél/ml) con respecto a los días de cultivo. En el día

7 de cultivo se registró la densidad celular más alta en el efluente sintético ($6.4 \times 10^6 \pm 1,032,937$ cél/ml). La densidad más baja se presentó en el efluente no clorado ($7 \times 10^5 \pm 358,910$ cél/ml) el cual presentó una disminución en la concentración celular a partir del día 5. La tendencia de la densidad celular no es explicada en el modelo de regresión lineal ($P < 0.0001$ $R^2 = 0.4036$) (Figura 29).

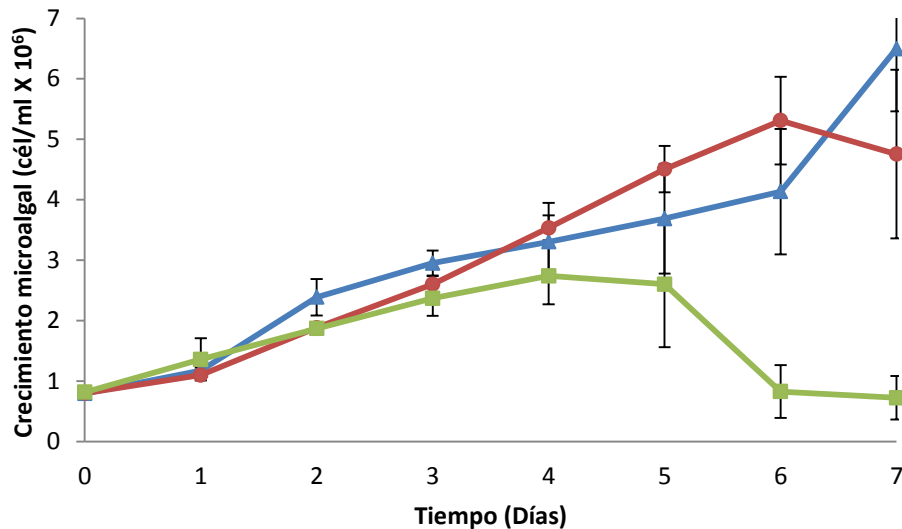


Figura 29. Valores promedio del crecimiento microalgal (cél/ml) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

Se encontraron diferencias significativas ($P = 0.0030$) en las tasas de crecimiento entre los tratamientos de efluente sintético y clorado, con el efluente no clorado. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en la tasa de crecimiento en los días de cultivo entre los tratamientos. Las tasas de crecimiento más altas se encontraron en el día 2 en el efluente sintético (1.01 ± 0.192) y en el efluente clorado (0.77 ± 0.004). A partir del día 3, se registró una disminución en las tasas de crecimiento en los 3 tratamientos. La tendencia de la tasa de crecimiento en los tratamientos no es explicada en el modelo de regresión lineal ($P < 0.0001$ $R^2 = 0.2460$).

4.4.2. Remoción nitrógeno amoniacal total (NAT)

No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.6154$) en la concentración de NAT entre los tratamientos. El análisis de covarianza detectó cambios ($P = 0.0002$) en la concentración de NAT (mg/l) con los días de cultivo en los tratamientos. En este bioensayo las concentraciones iniciales de NAT fueron bajas, 0.034 ± 0.006 mg/l (efluente sintético), 0.016 ± 0.001 mg/l (efluente clorado) y 0.036 ± 0.0152 mg/l (efluente no clorado). El consumo total de NAT se registró en las primeras 24 h de cultivo. A partir del día 1, las concentraciones de NAT registradas fueron de 0 mg/l hasta el día 7. La tendencias en las concentraciones de NAT no son explicadas en el modelo de regresión lineal ($P = 0.0002$ $R^2 = 0.2262$) (Figura 30).

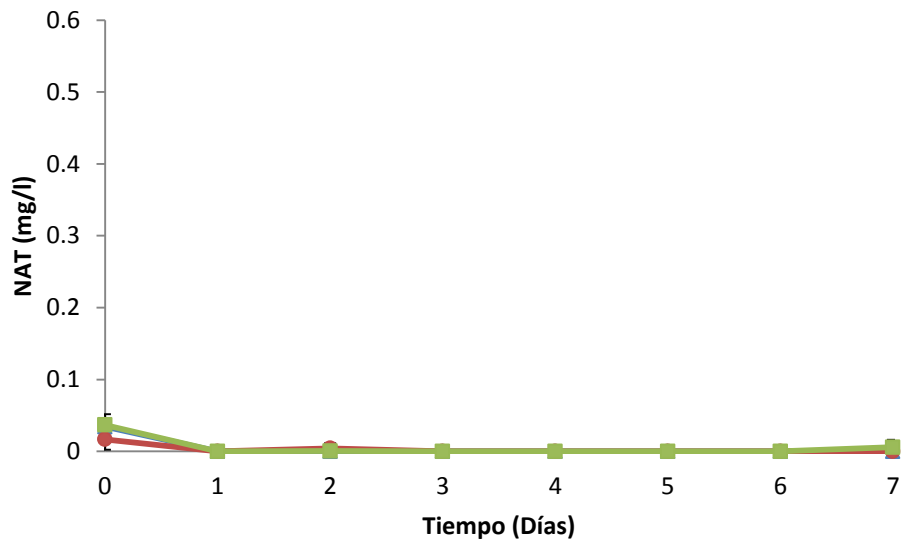


Figura 30. Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitrógeno amoniacal total (NAT) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

Las eficiencias de remoción más altas se registraron en los tratamientos de efluente sintético y clorado, con 100% en ambos casos. En el tratamiento de efluente no clorado la eficiencia registrada fue de 85.17% (Figura 31).

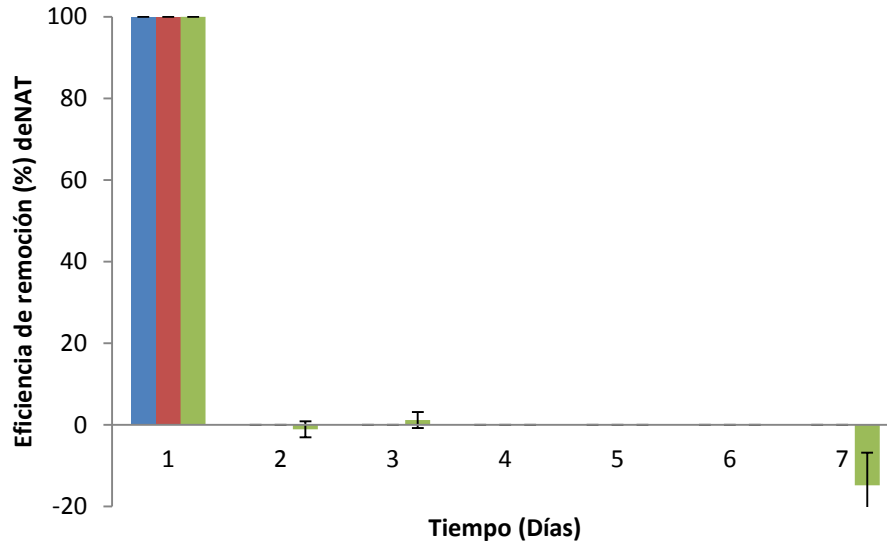


Figura 31. Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.

4.4.3. Nitritos (NO_2)

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) entre los tratamientos. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en la concentración de NO_2 (mg/l) con respecto a los días de cultivo en los tratamientos, presentándose tendencias similares entre los tratamientos de efluente sintético y clorado y diferentes al efluente no clorado. Las concentraciones iniciales fueron bajas con 0.032 ± 0.011 mg/l en el efluente sintético, 0.015 ± 0.001 mg/l en el efluente clorado y 0.024 ± 0.0008 mg/l en el efluente no clorado. Se observó un aumento constante en la concentración de NO_2 hasta el día 7 en los tratamientos de efluente sintético (0.495 ± 0.043 mg/l) y efluente clorado (0.397 ± 0.002 mg/l). La tendencia en la concentración de NO_2 en los tratamientos no es explicada en el modelo de regresión lineal ($P < 0.0001$ $R^2 = 0.2960$) (Figura 32).

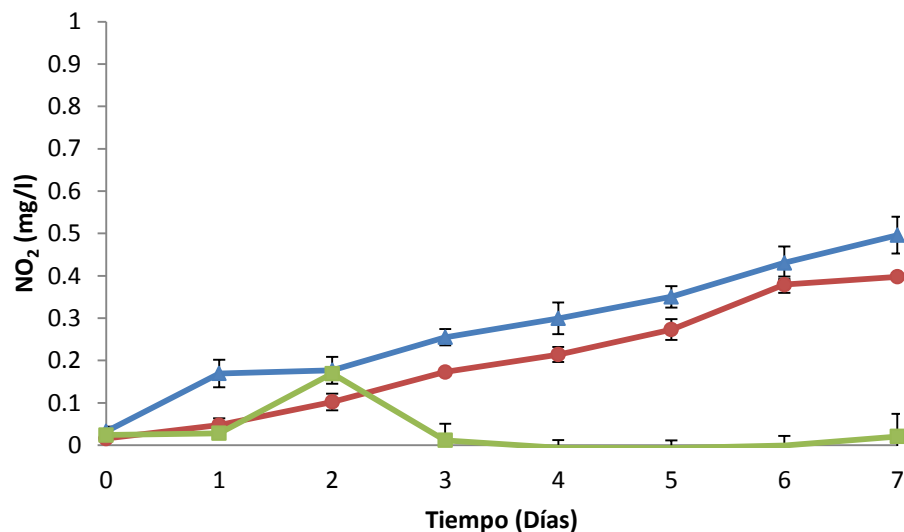


Figura 32. Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitritos (NO_2) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

En los 3 tratamientos no se registró consumo de NO_2 . Las producciones fueron de 1,555.8% (efluente sintético), $2,425.9\% \pm 221.4$ (efluente clorado) y 21.5% (efluente no clorado) (Figura 33).

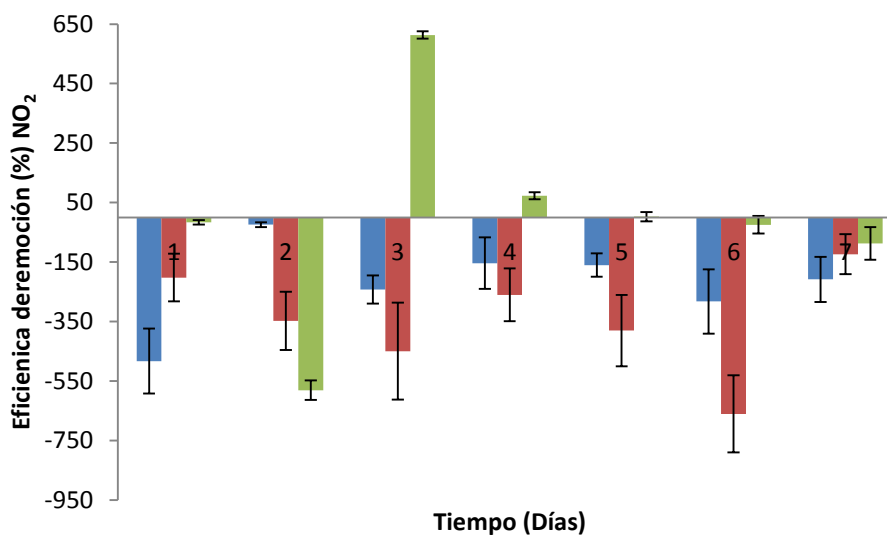


Figura 33. Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitritos (NO_2) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.

4.4.4. Remoción de nitratos (NO_3)

No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.4128$) entre los tres tratamientos. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en la concentración de NO_3 (mg/l) con respecto a los días de cultivo en los tratamientos. En el día inicial se registraron concentraciones de 102.4 ± 1.8 (mg/l) en el efluente sintético, 102.1 ± 0.5 (mg/l) para el efluente clorado y de 100.3 ± 1 (mg/l) en el efluente no clorado. Se observó una disminución constante en la concentración de NO_3 en los 3 tratamientos durante los 7 días, obteniendo las concentraciones finales de 57.1 ± 7.6 (mg/l) para el efluente sintético, 55.4 ± 6.1 (mg/l) en el efluente clorado y 56.3 ± 1.3 (mg/l) para el efluente no clorado. La tendencia en las concentraciones de NO_3 es explicada en el modelo de regresión lineal ($P < 0.0001$ $R^2 = 0.8314$) (Figura 34).

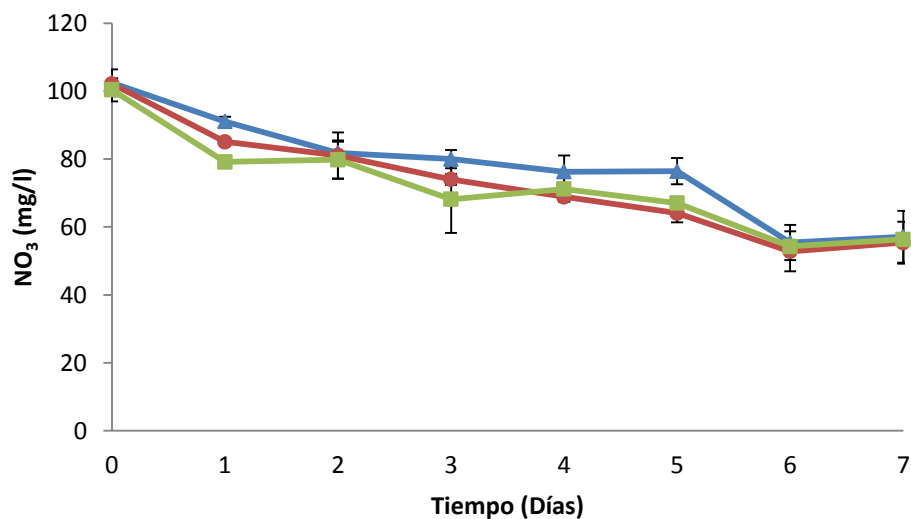


Figura 34. Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitratos (NO_3) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

La remoción de NO_3 se registró en los 3 tratamientos durante los 7 días de bioensayo. Las eficiencias fueron similares en los 3 tratamientos, alcanzando 44.23% (efluente sintético), 45.73% (efluente clorado) y 43.86% (efluente no clorado) (Figura 35).

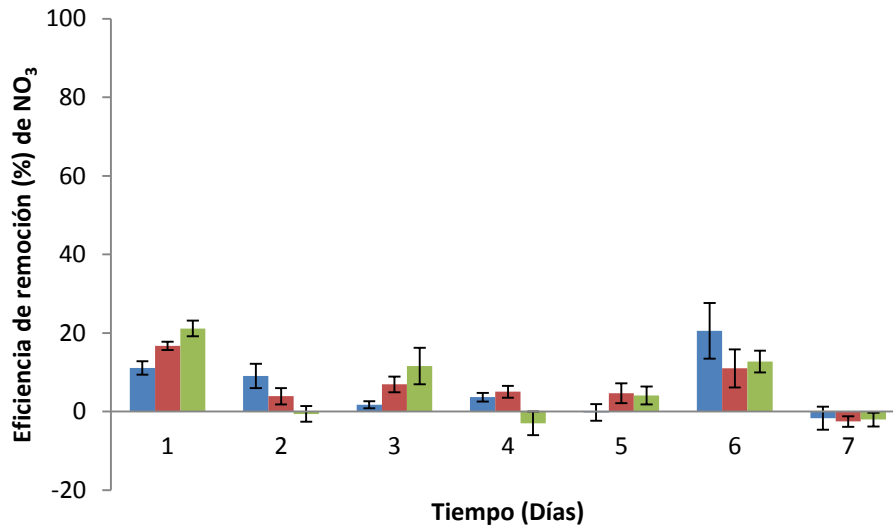


Figura 35. Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitratos (NO₃) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.

4.4.5. Remoción de fosfatos (PO₄)

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) en la concentración de PO₄ en los tratamientos. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en la concentración de PO₄ (mg/l) con respecto a los días de cultivo en los tratamientos. El consumo total de PO₄ se registró en el efluente sintético durante las primeras 24 h, este tratamiento presentó una concentración inicial de 1.018 ± 0.016 (mg/l). El tratamiento de efluente clorado registró un consumo total de PO₄ observado hasta el día 5, este tratamiento inició con una concentración de 1.059 ± 0.026 (mg/l), mientras que en el efluente no clorado no se registró un consumo total. En el efluente no clorado hubo una baja remoción de PO₄. La tendencia en las concentraciones de PO₄ no se explican en el modelo de regresión lineal ($P < 0.0001$ $R^2 = 0.2875$) (Figura 36).

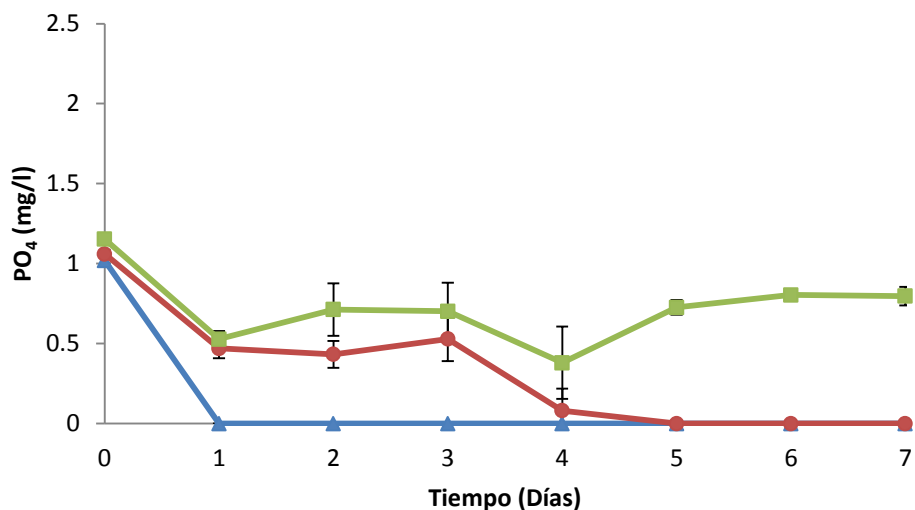


Figura 36. Valores promedio de la concentración (mg/l) de fosfatos (PO_4) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

Las eficiencias de remoción fueron del 100% en los tratamientos de efluente sintético y clorado. En el efluente no clorado se registró la eficiencia de 20.8% (Figura 37).

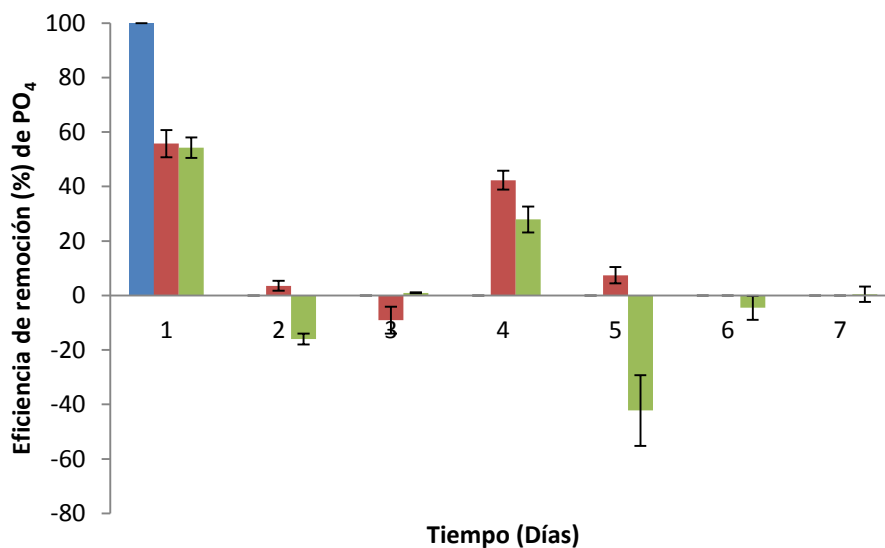


Figura 37. Valores promedio de la eficiencia de remoción de fosfatos (PO_4) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.

4.4.6. Alcalinidad (CaCO_3)

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) en las concentración de CaCO_3 entre los tres tratamientos. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en la concentración de CaCO_3 (mg/l) con respecto a los días de cultivo en los tratamientos. La concentración inicial más alta se registró en el efluente sintético con una concentración de 136.6 ± 5.7 (mg/l). Las concentraciones iniciales de los tratamientos de efluente clorado y efluente no clorado fueron de 76.6 ± 5.7 (mg/l) y 50 (mg/l), respectivamente. La tendencia en la concentración de CaCO_3 en los tratamientos no es explicada en el modelo de regresión lineal ($P = 0.6040$ $R^2 = -0.0104$) (Figura 38).

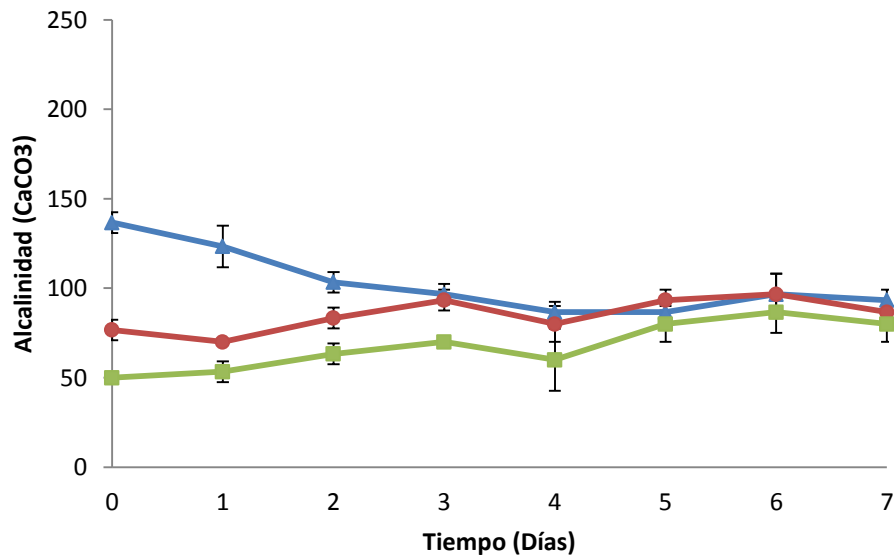


Figura 38. Valores promedio de la concentración (mg/l) de alcalinidad (CaCO_3) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

4.4.7. pH

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) en el pH entre los tratamientos, siendo el tratamiento de efluente no clorado diferentes al sintético y clorado. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en los valores de pH registrados con respecto a los días de cultivo en los tratamientos. En los 3 tratamientos se registró un aumento en el pH durante los 7 días de cultivo. Los pH iniciales registrados fueron de 8.7 ± 0.131 en el efluente sintético, 8.5 ± 0.049 en el efluente clorado y 8.3 ± 0.037 en el

efluente no clorado. El pH más alto se registró en el día 7 en el efluente clorado (9.4 ± 0.057). La tendencia en los valores de pH no se explica en el modelo de regresión lineal ($P < 0.0001$ $R^2 = 0.3800$) (Figura 39).

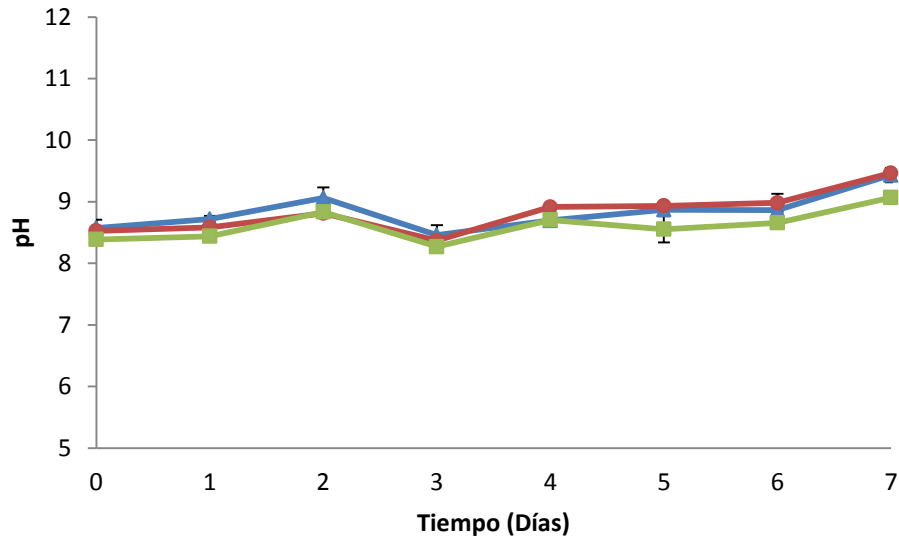


Figura 39. Valores promedio de pH en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

4.5. Bioensayo I *Scenedesmus obliquus*

4.5.1. Crecimiento microalgal (cél/ml)

No se encontraron diferencias significativas en densidad celular ($P = 0.2040$) entre los tres tratamientos. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en la densidad celular (cél/ml) con respecto a los días de cultivo en los tratamientos. Es importante mencionar que al día 7 la densidad más alta se registró en el tratamiento de efluente clorado ($4.4 \times 10^6 \pm 1400,083$ células/ml) y la densidad más baja se presentó en el tratamiento de efluente no clorado ($3.9 \times 10^6 \pm 512,477$ células/ml). La densidad celular es explicada en el modelo de regresión lineal ($P < 0.0001$ $R^2 = 0.8261$) (Figura 40).

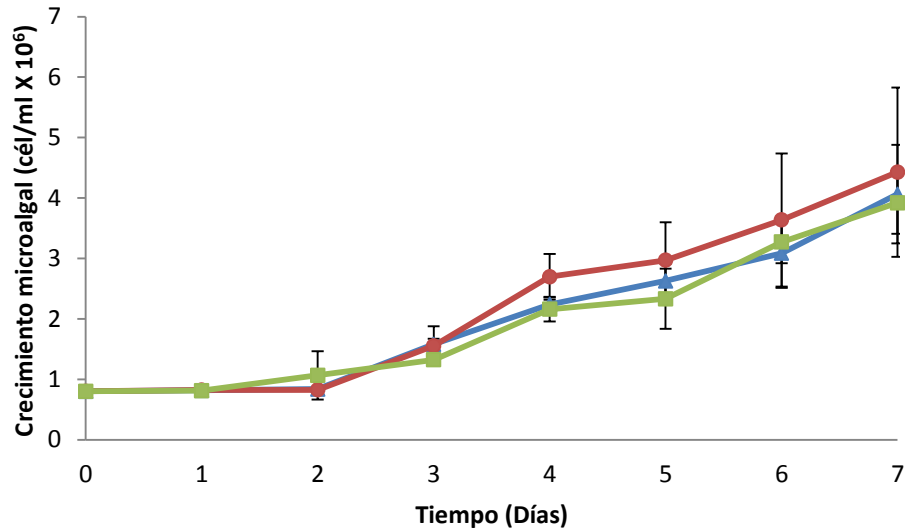


Figura 40. Valores promedio del crecimiento microalgal (cél/ml) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

No se encontraron diferencias en las tasas de crecimiento entre los tres tratamientos ($P = 0.9835$). El análisis de covarianza no detectó cambios ($P = 0.7418$) en la tasa de crecimiento con respecto a los días de cultivo en los tratamientos. Las tasas de crecimiento más altas se registraron al día 3, en los tratamientos de efluente sintético (0.91 ± 0.08) y en el efluente clorado (0.88 ± 0.287). A partir del día 4 se registraron decrementos en las tasas de crecimiento en los 3 tratamientos. El comportamiento de la tasa de crecimiento no es explicada en el modelo de regresión lineal ($P = 0.2667$ $R^2 = 0.0041$).

4.5.2. Remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT)

No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.2093$) en las concentraciones de NAT entre los tres tratamientos. El análisis de covarianza no detectó cambios ($P = 0.0943$) en la concentración de NAT (mg/l) con respecto a los días de cultivo en los tratamientos. Las concentraciones iniciales fueron bajas, 0.038 ± 0.011 (mg/l) en el efluente sintético, 0.047 ± 0.017 (mg/l) en el efluente clorado y 0.036 ± 0.011 (mg/l) en el efluente no clorado. A lo largo de los días de bioensayo, se observó una dinámica de

consumo y producción de NAT en los 3 tratamientos. La tendencia en las concentraciones de NAT no es explicada en el modelo de regresión lineal ($P = 0.0701$ $R^2 = 0.0325$) (Figura 41).

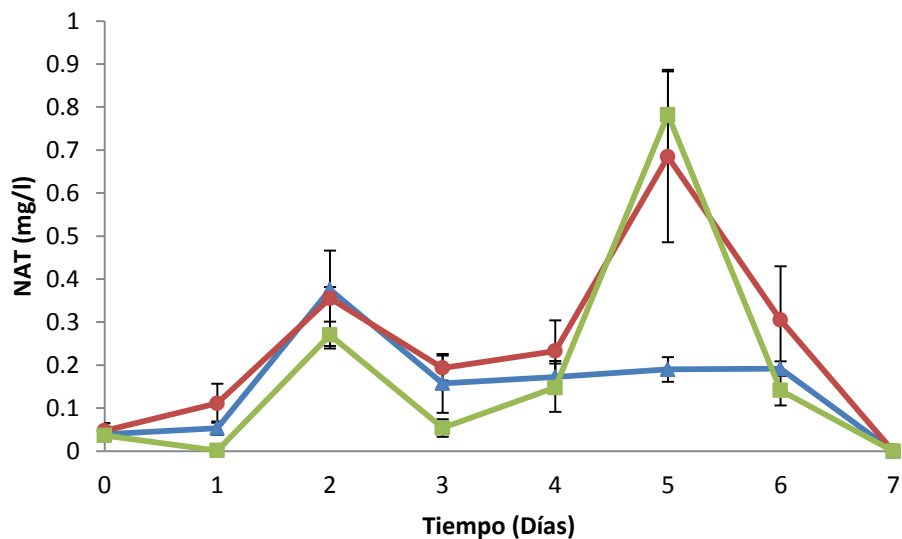


Figura 41. Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitrógeno amoniacal total (NAT) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

Durante el bioensayo se registró la producción y el consumo de NAT en los 3 tratamientos. Las eficiencias alcanzaron el 100% en los 3 tratamientos durante el cultivo (Figura 42).

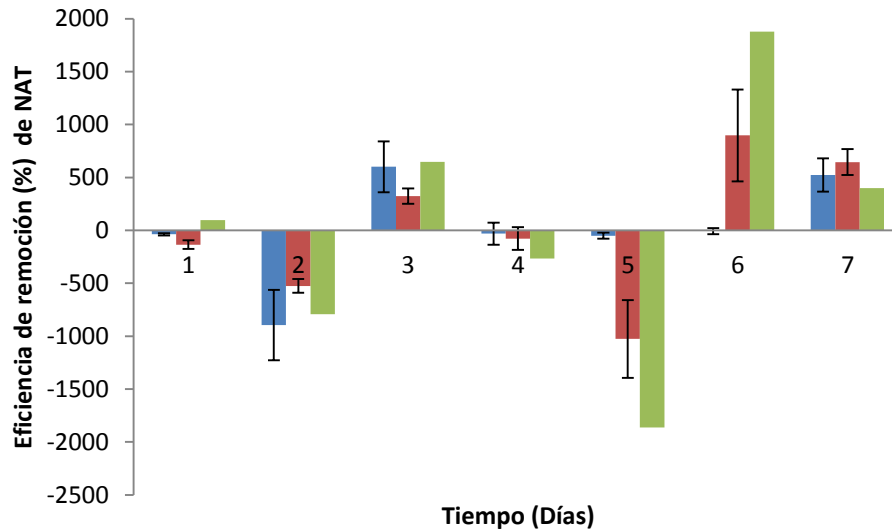


Figura 42. Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.

4.5.3. Nitritos (NO_2)

No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.2017$) en las concentraciones de NO_2 entre los tres tratamientos. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en la concentración de NO_2 (mg/l) con los días de cultivo en los tratamientos. Se observó un aumento en la concentración de NO_2 en los 3 tratamientos durante el cultivo. Las concentraciones iniciales registradas fueron de 0.140 ± 0.014 (mg/l) en el tratamiento de efluente sintético, 0.006 ± 0.001 (mg/l) en el efluente clorado y 0.180 ± 0.028 (mg/l) en el efluente no clorado. Las concentraciones más altas se registraron para el día 7 de cultivo en los tratamientos de efluente clorado (0.820 ± 0.129 mg/l) y no clorado (0.735 ± 0.064 mg/l). La tendencia en las concentraciones de NO_2 es explicada parcialmente en el modelo de regresión lineal ($P < 0.0001$ $R^2 = 0.5987$) (Figura 43).

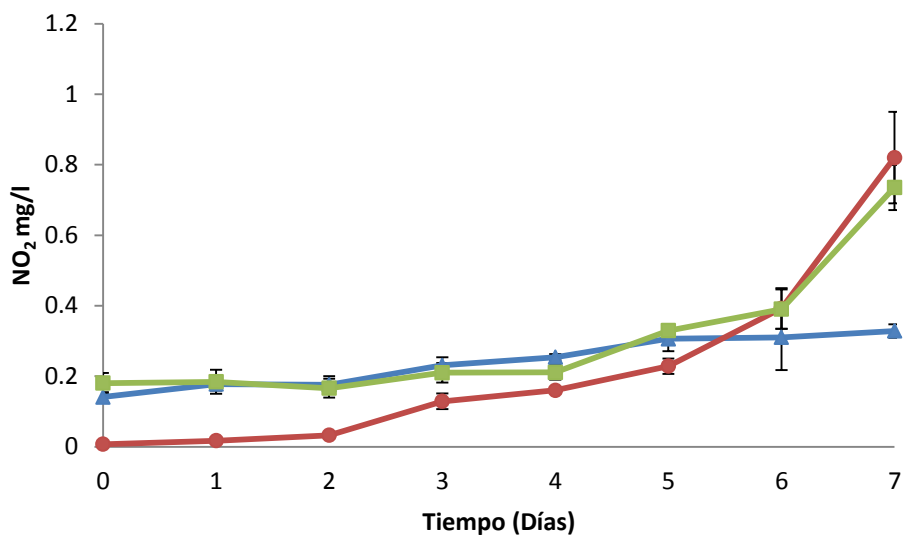


Figura 43. Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitritos (NO_2) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

No se llevó a cabo remoción de NO_2 durante el bioensayo en los 3 tratamientos, las concentraciones iniciales registraron un aumento con respecto al tiempo. Los aumentos en la producción fueron de 134.2% en el efluente sintético, 11623% en el efluente clorado y 311.1 % en el efluente no clorado (Figura 44).

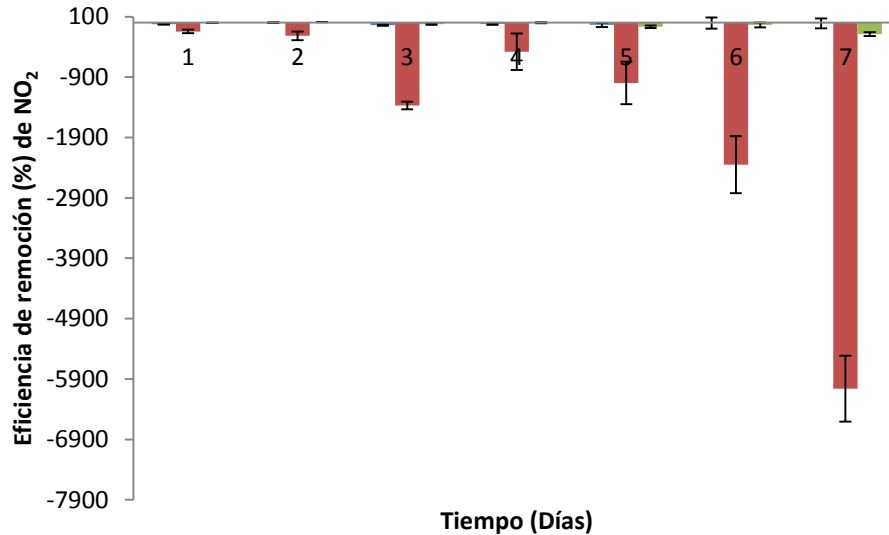


Figura 44. Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitritos (NO₂) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.

4.5.4. Remoción nitratos (NO₃)

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) en la remoción de NO₃ entre los tratamientos, siendo el tratamiento de efluente sintético diferente a los tratamientos de efluente clorado y no clorado. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en la concentración de NO₃ (mg/l) con los días de cultivo en los tratamientos. En los 3 tratamientos disminuyó la concentración de NO₃ que se prolongó hasta el día 7. Las concentraciones iniciales registradas para cada uno de los tratamientos fueron de 54.4 ± 1 (mg/l) en el efluente sintético, 50.9 ± 1.6 (mg/l) en el efluente clorado y 51.3 ± 1.1 (mg/l) para el efluente no clorado. En el día 7 la concentración más baja se registró en el efluente no clorado (37 ± 1.3 mg/l). La tendencia en las concentraciones de NO₃ es explicada en el modelo de regresión lineal ($P < 0.0001$ $R^2 = 0.6210$) (Figura 45).

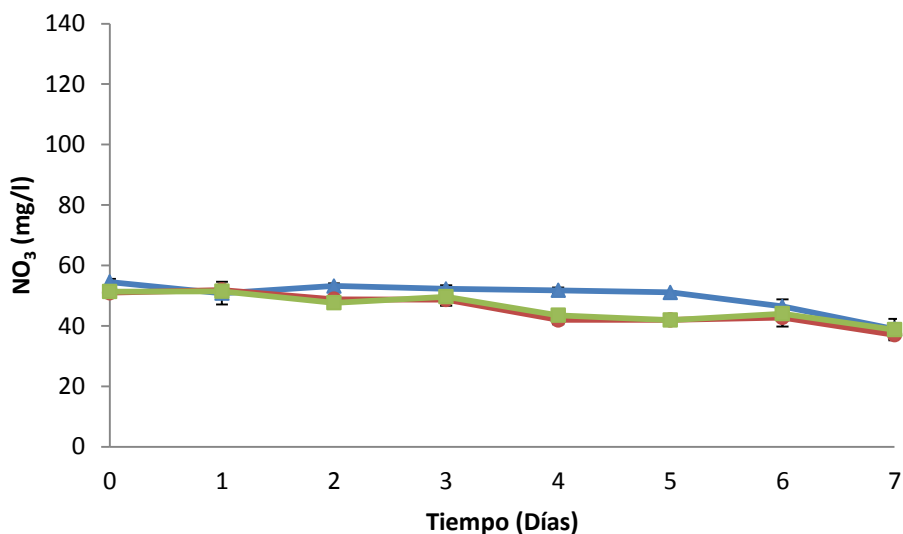


Figura 45. Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitratos (NO_3) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

En los 3 tratamientos se registró remoción de NO_3 con respecto al tiempo. Las eficiencias de remoción fueron de 23.7% en el efluente sintético, 27.3% en el efluente clorado y 24.5% en el efluente no clorado (Figura 46).

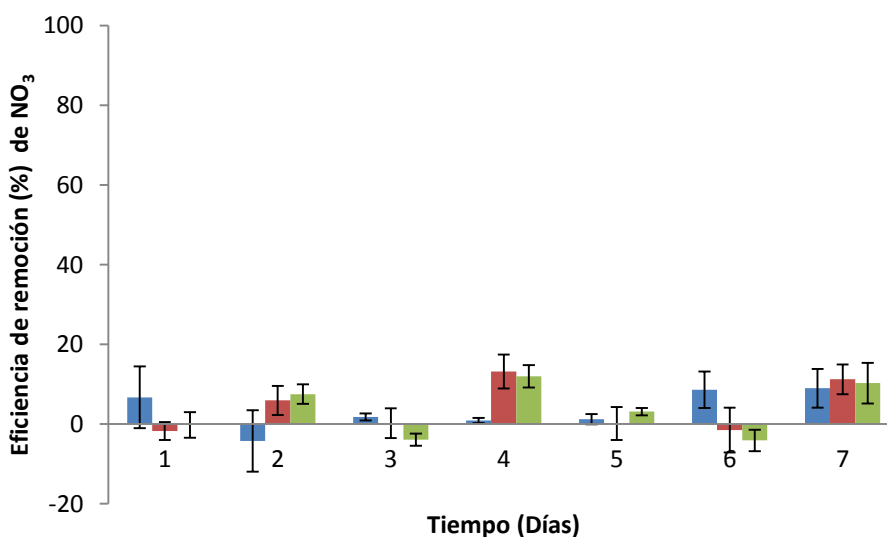


Figura 46. Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitratos (NO_3) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.

4.5.5. Remoción fosfatos (PO₄)

No se encontraron diferencias significativas en la remoción de PO₄ entre los tres tratamientos ($P = 0.1039$). El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en la concentración de PO₄ (mg/l) con respecto a los días de cultivo en los tratamientos. A lo largo del bioensayo, se observó una disminución en la concentración de PO₄ en los 3 tratamientos. Las concentraciones iniciales fueron de 1.344 ± 0.023 (mg/l) en el efluente sintético, 1.357 ± 0.039 (mg/l) en el efluente clorado y 1.441 ± 0.050 para el efluente no clorado. La concentración más baja fue registrada en el tratamiento de efluente no clorado (0.252 ± 0.223 mg/l) en el día 7. La tendencias en las concentraciones de PO₄ es explicada en el modelo de regresión lineal ($P < 0.0001$ $R^2 = 0.6830$) (Figura 47).

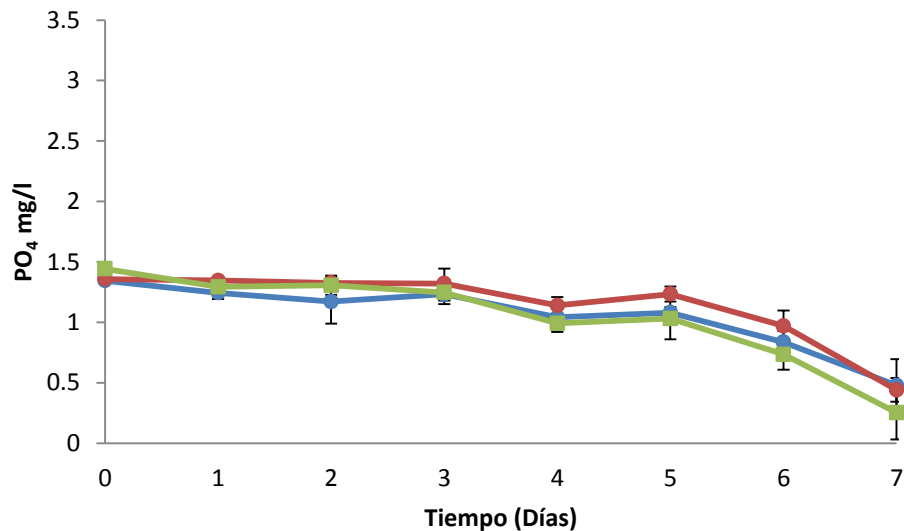


Figura 47. Valores promedio de la concentración (mg/l) de fosfatos (PO₄) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

La eficiencia más alta fue registrada en el tratamiento de efluente no clorado (82.3%). En los tratamientos de efluente sintético y clorado la remoción fue de 64.4% y 67.4%, respectivamente (Figura 48).

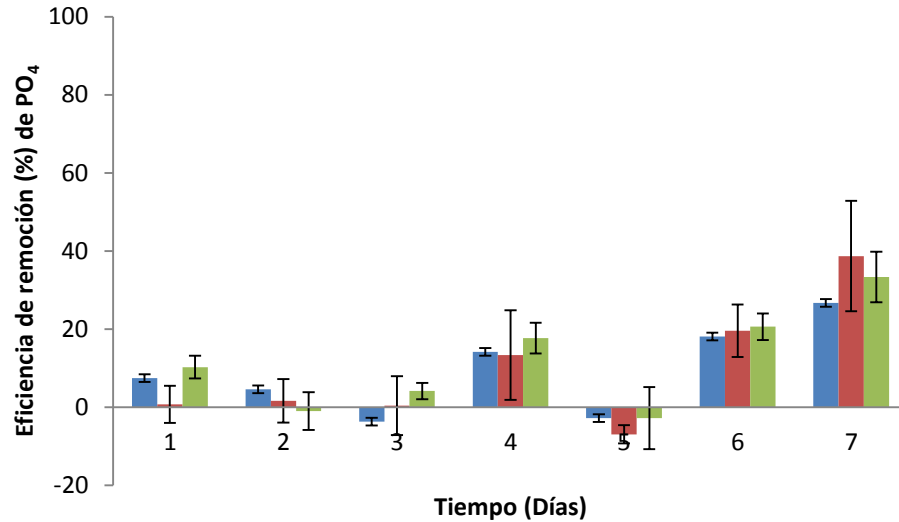


Figura 48. Valores promedio de la eficiencia de remoción de fosfatos (PO_4) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.

4.5.6. Alcalinidad (CaCO_3)

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) en las concentraciones de CaCO_3 entre los tres tratamientos. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en la concentración de CaCO_3 (mg/l) con respecto a los días de cultivo en los tratamientos. La tendencia en las concentraciones fue similar en los tratamientos de efluente clorado y no clorado y diferentes del efluente sintético. Las concentraciones más altas se registraron en el tratamiento de efluente sintético con una concentración inicial de 140 (mg/l) y una final de 186 ± 32.1 (mg/l). La tendencia en las concentraciones de CaCO_3 no se explica en el modelo de regresión lineal ($P = 0.0205$ $R^2 = 0.0611$) (Figura 49).

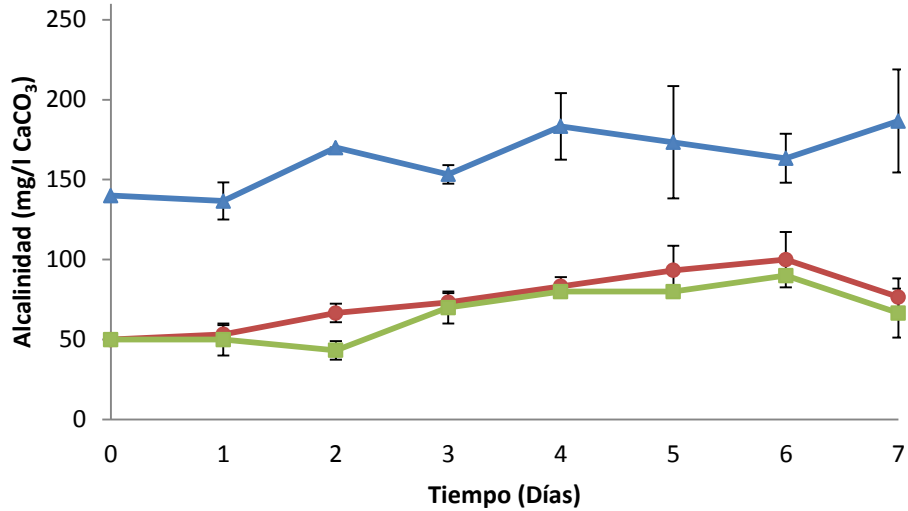


Figura 49. Valores promedio de la concentración (mg/l) de alcalinidad (CaCO₃) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

4.5.7. pH

No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.5852$) en los valores de pH entre los tres tratamientos. En análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en los valores de pH registrados en los tratamientos con respecto al tiempo. En los 3 tratamientos se observó una tendencia similar con un incremento constante en los valores de pH en los primeros 4 días. Los valores iniciales fueron de 8.3 ± 0.05 en el efluente sintético, 8.0 ± 0.03 en el efluente clorado y 7.4 ± 0.11 para el efluente no clorado. Al día último de cultivo el valor más alto de pH fue registrado en el efluente no clorado (9.0 ± 0.16). Las tendencias de pH en los tratamientos no se explica en el modelos de regresión lineal ($P < 0.0001$ $R^2 = 0.3341$) (Figura 50).

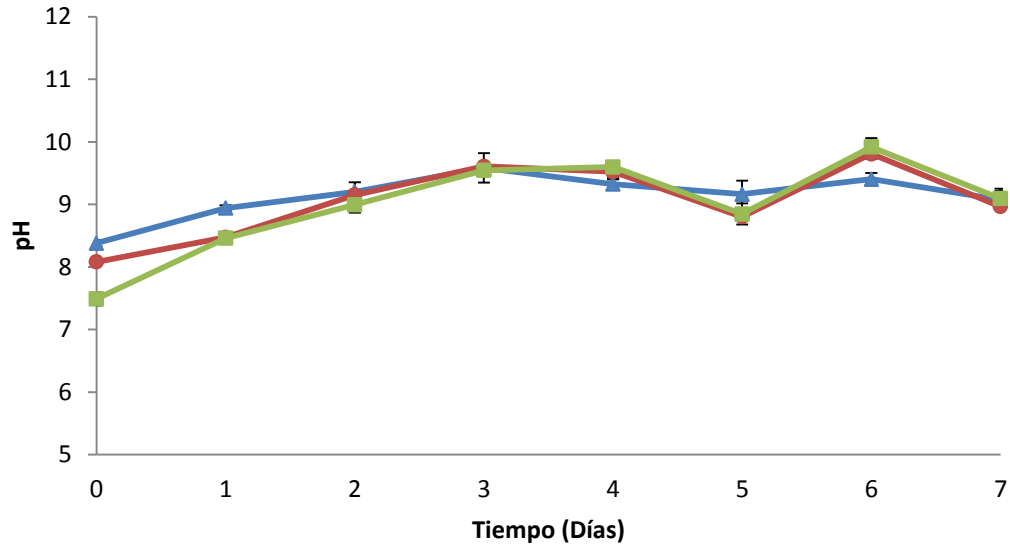


Figura 50. Valores promedio de pH en los tratamientos de efluente sintético, efluente clorado y efluente no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

4.6. Bioensayo II *Scenedesmus obliquus*

4.6.1. Crecimiento microalgal (cél/ml)

No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.7180$) en la densidad celular entre los tres tratamientos. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en la densidad celular en los tratamientos (cél/ml) con respecto a los días de cultivo. Se registró un aumento constante en la densidad celular desde el día 2, la densidad más alta se detectó en el efluente no clorado ($6.3 \times 10^6 \pm 1,400,083$ célula/ml), mientras que la densidad más baja se presentó en el tratamiento de efluente clorado ($5 \times 10^6 \pm 435,086$ célula/ml). La tendencia en la densidad celular es explicada en el modelo de regresión lineal ($P < 0.0001$ $R^2 = 0.8894$) (Figura 51).

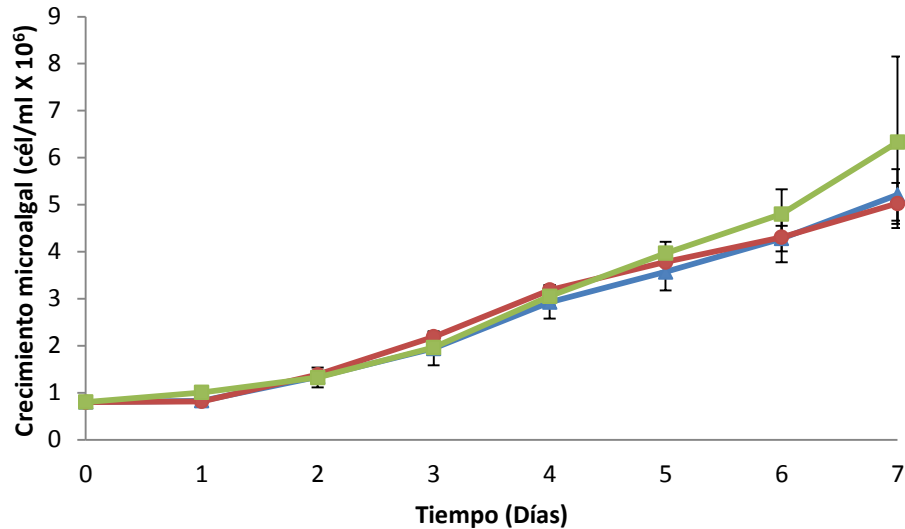


Figura 51. Valores promedio del crecimiento microalgal (cél/ml) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.8182$) en las tasas de crecimiento entre los tres tratamientos. El análisis de covarianza no detectó cambios ($P = 0.5217$) con respecto al tiempo en las tasas de crecimiento en los tratamientos. Las tasas más altas de crecimiento se registraron en el día 2 para los tratamientos de efluente sintético (0.69 ± 0.08) y efluente clorado (0.76 ± 0.019). El comportamiento de la tasa de crecimiento no es explicada en el modelo de regresión lineal ($P = 0.1704$ $R^2 = 0.0147$).

4.6.2. Remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT)

No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.0706$) en la remoción de NAT entre los tres tratamientos. El análisis de covarianza no detectó cambios ($P = 0.0567$) en la concentración de NAT (mg/l) en los tratamientos con respecto a los días de cultivo. En las primeras 24 h se registró un consumo total de NAT en los 3 tratamientos, los cuales presentaron concentraciones iniciales de 0.134 ± 0.013 (mg/l) en el efluente sintético, 0.141 ± 0.035 (mg/l) para el efluente clorado y 0.121 ± 0.006 (mg/l) para el efluente no clorado. A partir del día 3 se observó la producción de NAT en los tratamientos de

efluente clorado y no clorado. La tendencia en las concentraciones de NAT no es explicada en el modelo de regresión lineal ($P = 0.1357$ $R^2 = 0.0177$) (Figura 52).

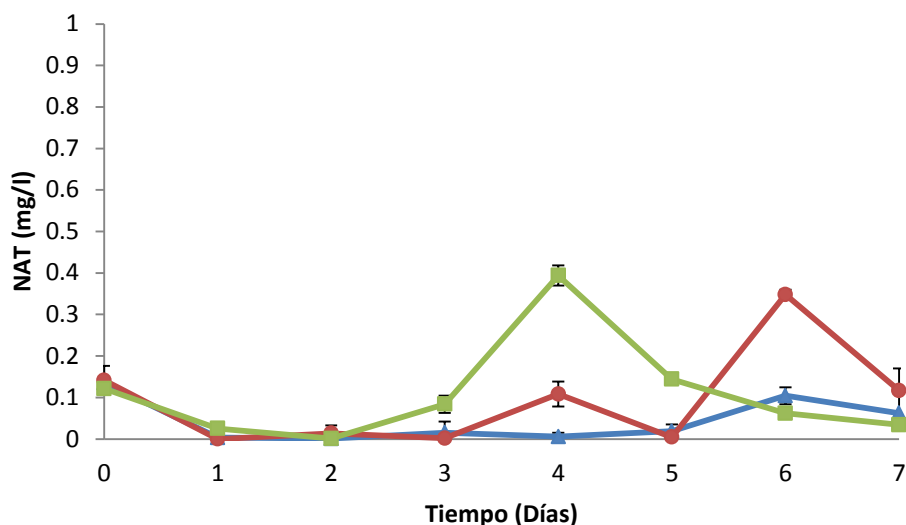


Figura 52. Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitrógeno amoniacal total (NAT) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

En los 3 tratamientos se registró una dinámica de consumo/producción. Las eficiencias de remoción más altas fueron registradas en el efluente no clorado (71.4%) y en el efluente sintético (53.5%). La eficiencia más baja se presentó en el efluente no clorado (20.2%) (Figura 53).

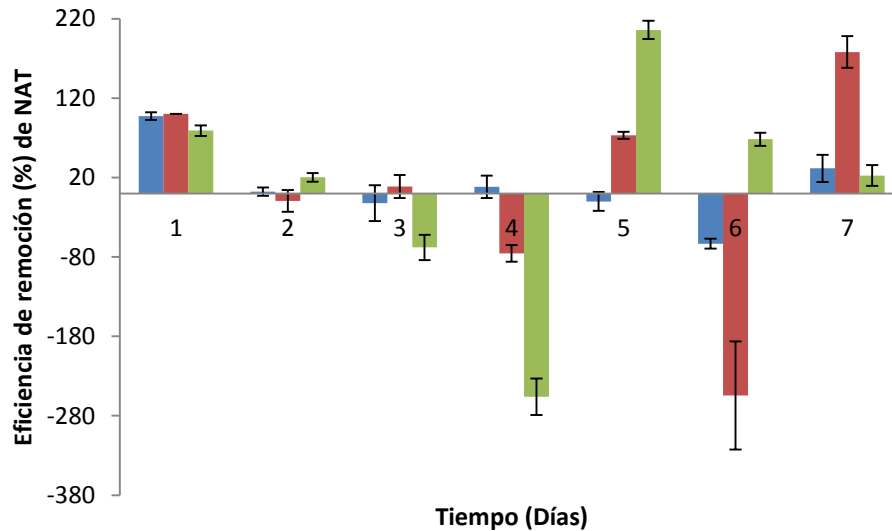


Figura 53. Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.

4.6.3. Nitritos (NO_2)

No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.3834$) en las concentraciones de NO_2 entre los tres tratamientos. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en la concentración de NO_2 (mg/l) en los tratamientos con los días de cultivo. En los 3 tratamientos se registró un aumento en la concentración de NO_2 . En el día inicial las concentraciones fueron de 0.232 ± 0.001 (mg/l) para el efluente sintético, 0.025 ± 0.005 (mg/l) en el efluente clorado y 0.260 ± 0.004 (mg/l) en el efluente clorado. Al día 7, las concentraciones más altas se encontraron en los tratamientos de efluente clorado (1 ± 0.048 (mg/l) y efluente no clorado (0.962 ± 0.088 mg/l). La tendencia en las concentraciones de NO_2 no es explicada en el modelo de regresión lineal ($P < 0.0001$ $R^2 = 0.4644$) (Figura 54).

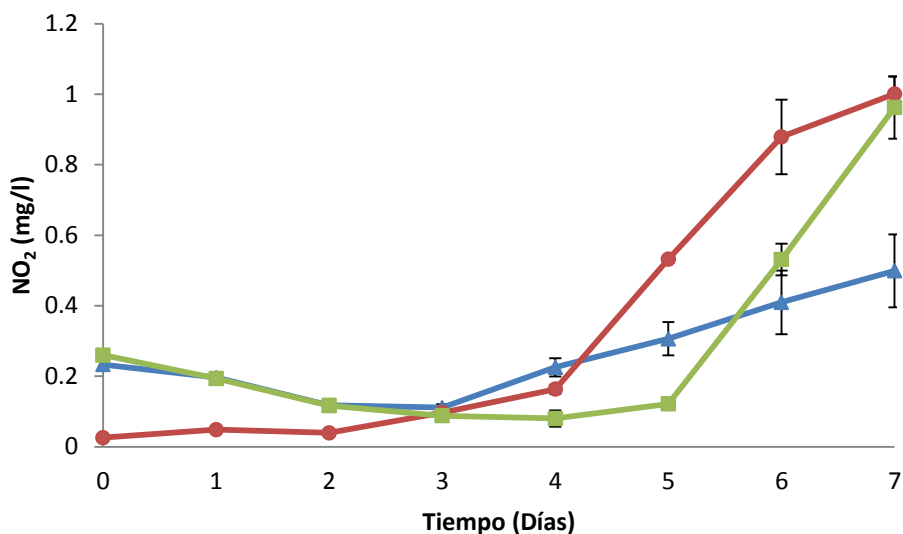


Figura 54. Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitritos (NO_2) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

La remoción de NO_2 no se registró durante el bioensayo. El aumento en la concentración de NO_2 se presentó en los 3 tratamientos, con incrementos de 114.4% (efluente sintético), 3,923% (efluente clorado) y 269.7% en el efluente no clorado (Figura 55).

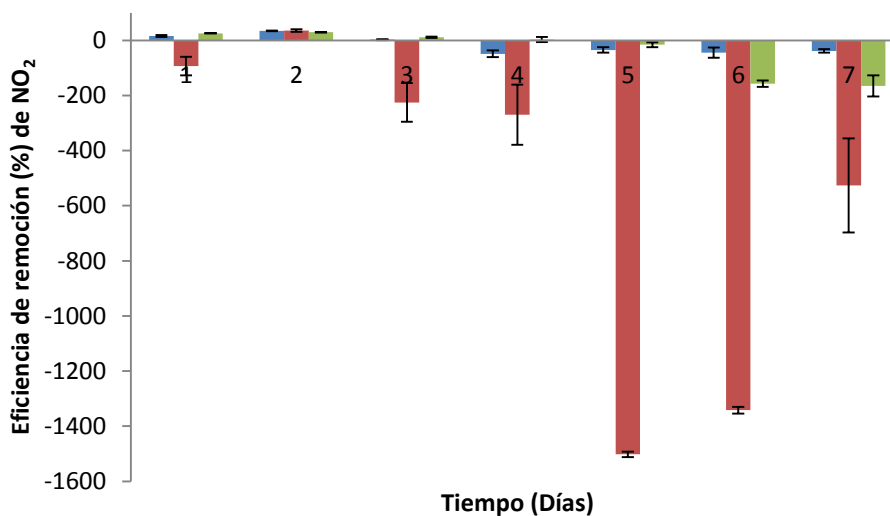


Figura 55. Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitritos (NO_2) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.

4.6.4. Remoción de nitratos (NO₃)

Se encontraron diferencias significativas ($P = 0.0035$) en la remoción de NO₃ entre los tratamientos, siendo el efluente sintético diferente a los tratamientos de efluente clorado y no clorado. El análisis de covarianza detectó cambios ($P = 0.0096$) en la concentración de NO₃ (mg/l) en los tratamientos con los días de cultivo. Se observó una dinámica de consumo y producción de NO₃ en todos los tratamientos. Las concentraciones iniciales fueron de 92.5 ± 2.8 (mg/l) en el efluente sintético, 98.1 ± 0.5 (mg/l) en el efluente clorado y 92.4 ± 1 (mg/l) para el efluente no clorado. La concentración más baja se registró en el día 6 en el tratamiento de efluente no clorado (66.6 ± 2.6 mg/l). La dinámica de los NO₃ no es explicada en el modelo de regresión lineal ($P = 0.9044$ $R^2 = -0.0141$) (Figura 56).

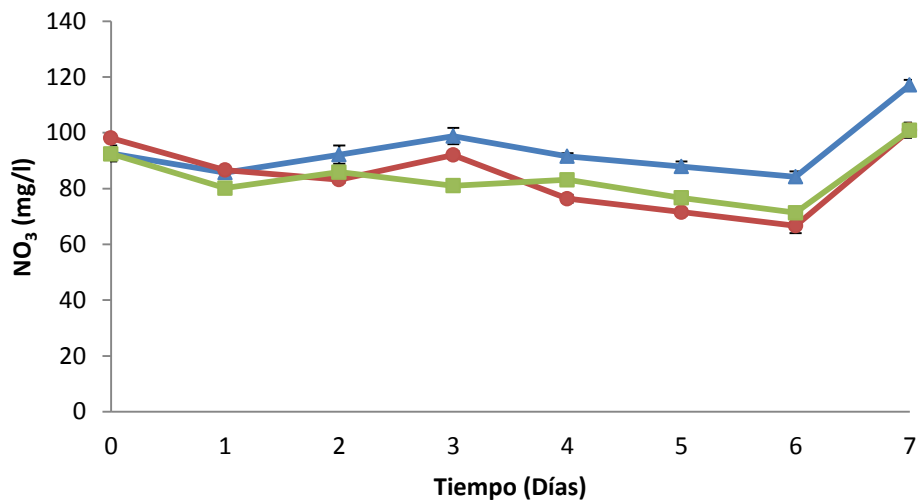


Figura 56. Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitratos (NO₃) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

La remoción de NO₃ no se llevó a cabo en los 3 tratamientos. En el día final del bioensayo se presentaron aumentos en la concentración de NO₃ de 26.5% (efluente sintético), 2.9% (efluente clorado) y 9.1% (efluente no clorado) (Figura 57).

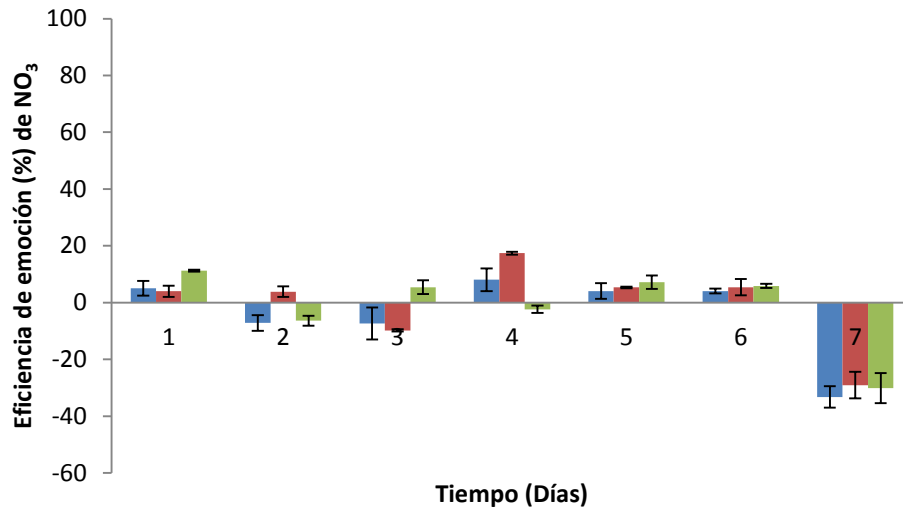


Figura 57. Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitratos (NO_3) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.

4.6.5. Remoción de fosfatos (PO_4)

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) en la remoción de PO_4 entre los tratamientos, siendo los tratamientos de efluente clorado y no clorado diferentes al efluente sintético. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en la concentración de PO_4 (mg/l) en los tratamientos con los días de cultivo. Las concentraciones iniciales registradas fueron de 3.037 ± 0.131 (mg/l) en el efluente sintético, 2.917 ± 0.074 (mg/l) en el efluente clorado y 2.959 ± 0.171 (mg/l) para el efluente no clorado. A lo largo del bioensayo se observó una disminución constante en la concentración de PO_4 en los 3 tratamientos. El consumo total se registró únicamente en el efluente sintético durante las primeras 24 h. La tendencia en las concentraciones no se explica en el modelo de regresión lineal ($P < 0.0001$ $R^2 = 0.3945$) (Figura 58).

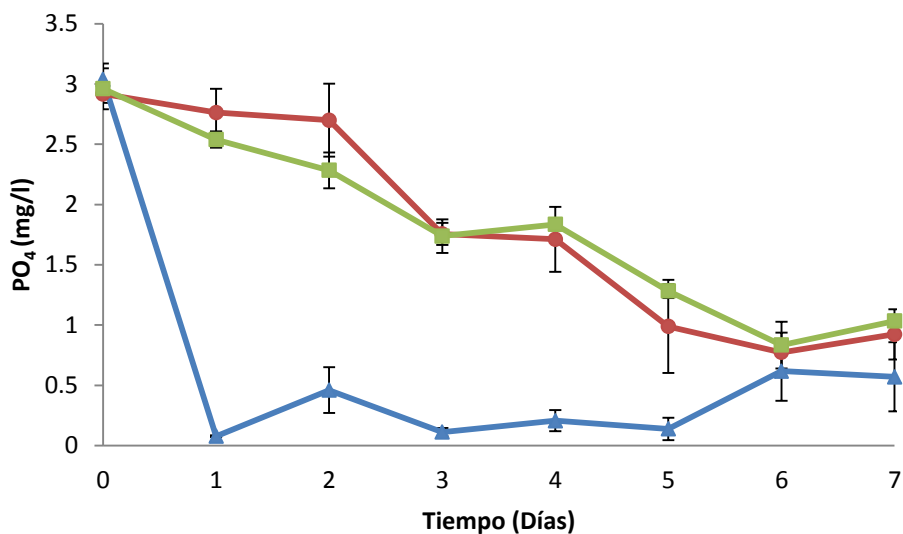


Figura 58. Valores promedio de la concentración (mg/l) de fosfatos (PO_4) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

La eficiencia de remoción más alta se registró en el tratamiento de efluente sintético con 81.2%. En los tratamientos de efluente clorado y no clorado, las eficiencias fueron de 68.2% y 64.9%, respectivamente (Figura 59).

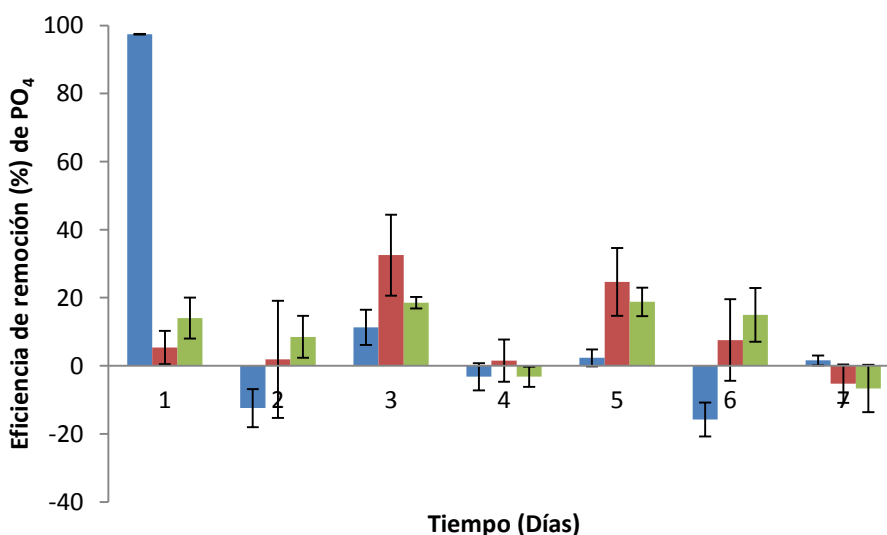


Figura 59. Valores promedio de la eficiencia de remoción de fosfatos (PO_4) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.

4.6.6. Alcalinidad (CaCO_3)

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) en las concentraciones de CaCO_3 entre los tres tratamientos. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en la concentración de CaCO_3 (mg/l) en los tratamientos con los días de cultivo. Se registró una tendencia similar en las concentraciones de PO_4 en los tratamientos de efluente clorado y no clorado y fue diferente del efluente sintético. Las mayores concentraciones de CaCO_3 se registraron únicamente en el tratamiento de efluente sintético con una concentración inicial de 167 ± 5.7 (mg/l) y una final de 230 ± 5.7 (mg/l). La tendencia en las concentraciones de CaCO_3 no es explicada en el modelo de regresión lineal ($P = 0.0024$ $R^2 = 0.1118$) (Figura 60).

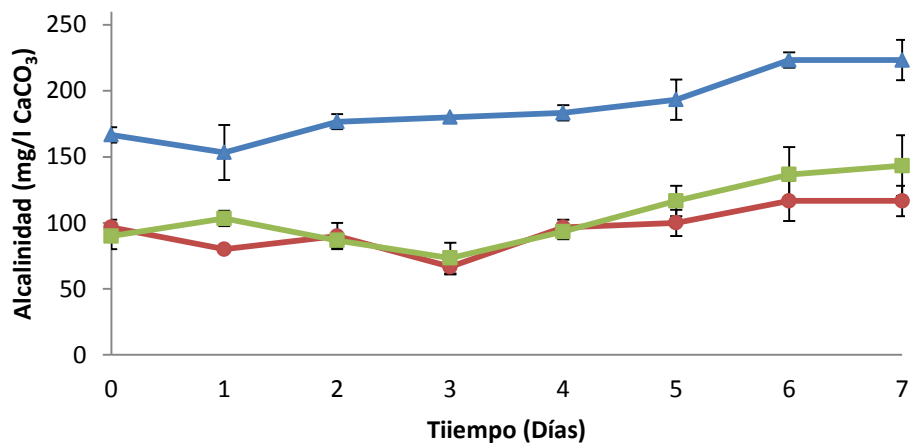


Figura 60. Valores promedio de la concentración (mg/l) de alcalinidad (CaCO_3) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

4.6.7. pH

No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.5163$) en el pH entre los tres tratamientos. El análisis de covarianza detectó cambios ($P = 0.0113$) en los valores de pH en los tratamientos con los días de cultivo. El pH inicial fue de 8.6 ± 0.01 en el efluente sintético, 8.5 ± 0.01 en el efluente clorado y 8.5 ± 0.2 para el efluente no clorado. La tendencia en los valores de pH fue similar en los 3 tratamientos, con un

incremento constante hasta el día 5 y un decremento para el día 6 y 7. La tendencia en los valores de pH no se explican en el modelo de regresión lineal ($P = 0.0017$ $R^2 = 0.1203$) (Figura 61).

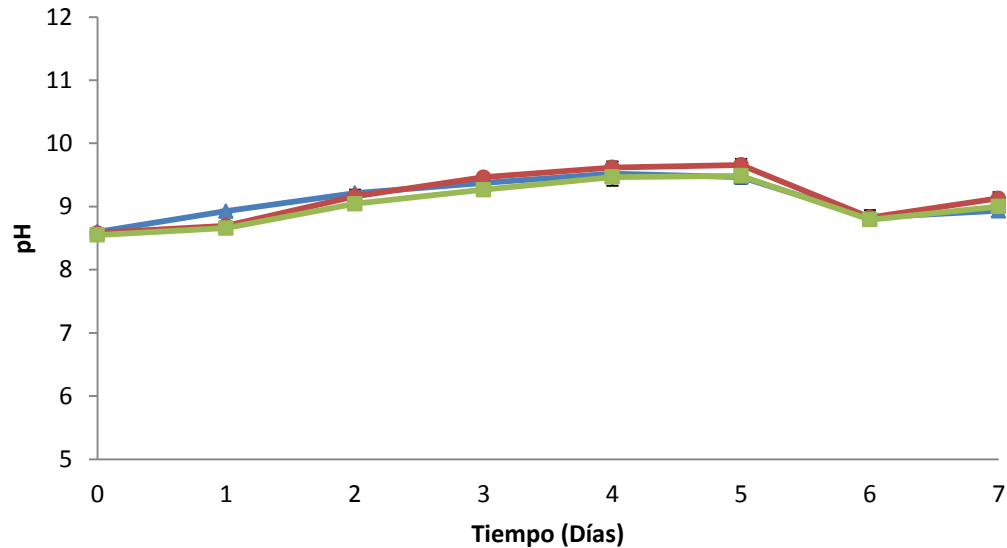


Figura 61. Valores promedio de pH en los tratamientos de efluente sintético, efluente clorado y efluente no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

4.7. Bioensayo III *Scendesmus obliquus*

4.7.1. Crecimiento microalgal (cél/ml)

No se encontraron diferencias significativas ($P < 0.4629$) en las densidades celulares entre los tres tratamientos. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en la densidad celular (cél/ml) con los días de cultivo en los tratamientos. El valor más alto de densidad celular se registró en el tratamiento de efluente no clorado ($7.6 \times 10^6 \pm 387,986$ células/ml). La densidad celular más baja se registró en el tratamiento del efluente sintético ($5.8 \times 10^6 \pm 790,021$ células/ml). La densidad celular en los tratamientos se explica en el modelo de regresión lineal ($P < 0.0001$ $R^2 = 0.9176$) (Figura 62).

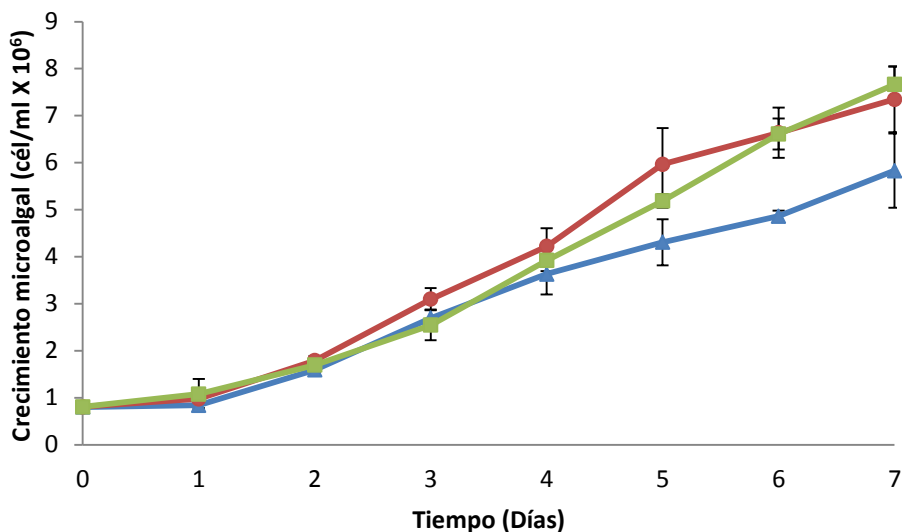


Figura 62. Valores promedio del crecimiento microalgal (cél/ml) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.7589$) en las tasas de crecimiento entre los tres tratamientos. El análisis de covarianza detectó un cambio ($P = 0.0090$) en la tasa de crecimiento en los tratamientos con los días en el bioensayo. Las tasas de crecimiento más altas se registraron en el día 2 para los 3 tratamientos de con 0.92 ± 0.07 (efluente sintético), 0.87 ± 0.06 (efluente clorado) y 0.69 ± 0.30 (efluente no clorado). El comportamiento de la tasa de crecimiento no se explica en el modelo de regresión lineal ($P = 0.0008$ $R^2 = 0.1556$).

4.7.2. Remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT)

No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.8171$) en la remoción de NAT entre los tres tratamientos. El análisis de covarianza detectó cambios ($P > 0.0001$) en la concentración (mg/l) en los tratamientos con los días de cultivo. El consumo total de NAT se llevó a cabo en las primeras 24 h. Los 3 tratamientos registraron concentraciones iniciales 0.266 ± 0.062 (mg/l) en el efluente sintético, 0.262 ± 0.013 (mg/l) para el efluente clorado y 0.235 ± 0.037 , para el efluente no clorado. La tendencia

en las concentraciones de NAT no se explica en el modelo de regresión lineal ($P < 0.0001$ $R^2 = 0.2889$) (Figura 63).

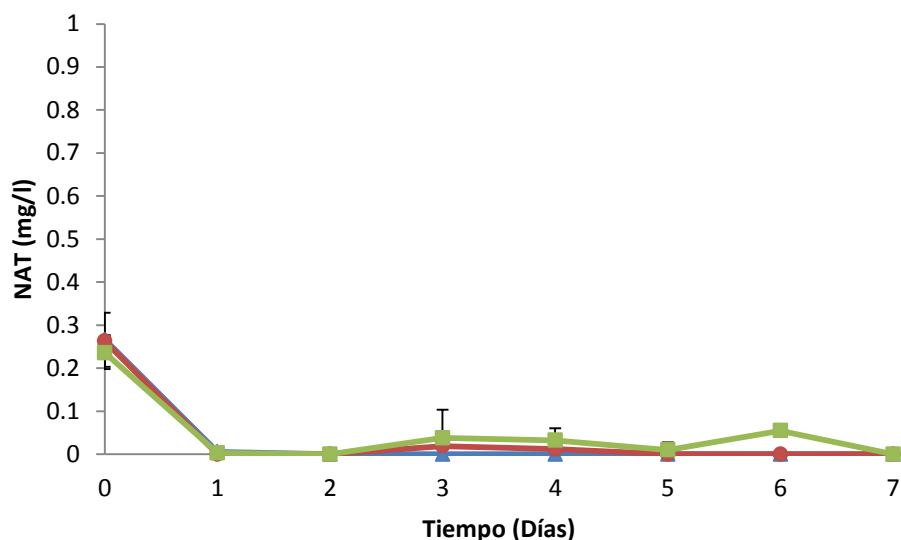


Figura 63. Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitrógeno amoniacal total (NAT) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

Las eficiencias de remoción en los 3 tratamientos fueron del 100% (Figura 64).

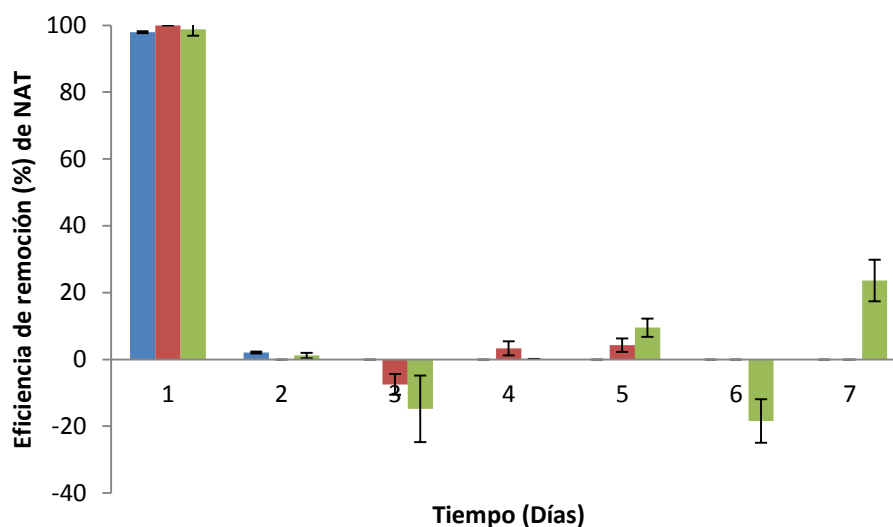


Figura 64. Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.

4.7.3. Nitritos (NO₂)

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) en las concentraciones de NO₂ entre los tratamientos, siendo el tratamiento de efluente no clorado diferente a los tratamientos de efluente sintético y clorado. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en la concentración de NO₂ (mg/l) en los tratamientos con los días de cultivo. En los 3 tratamientos se observó un aumento en la concentración de NO₂ que se prolongó hasta el día 7. Las concentraciones iniciales fueron en los tratamientos de efluente sintético (0.003 mg/l) y clorado (0.003 mg/l), mientras que para el efluente no clorado se registró en 0.211 ± 0.023 (mg/l). La tendencia en las concentraciones de NO₂ no se explica en el modelo de regresión lineal ($P < 0.0001$ $R^2 = 0.2652$) (Figura 65).

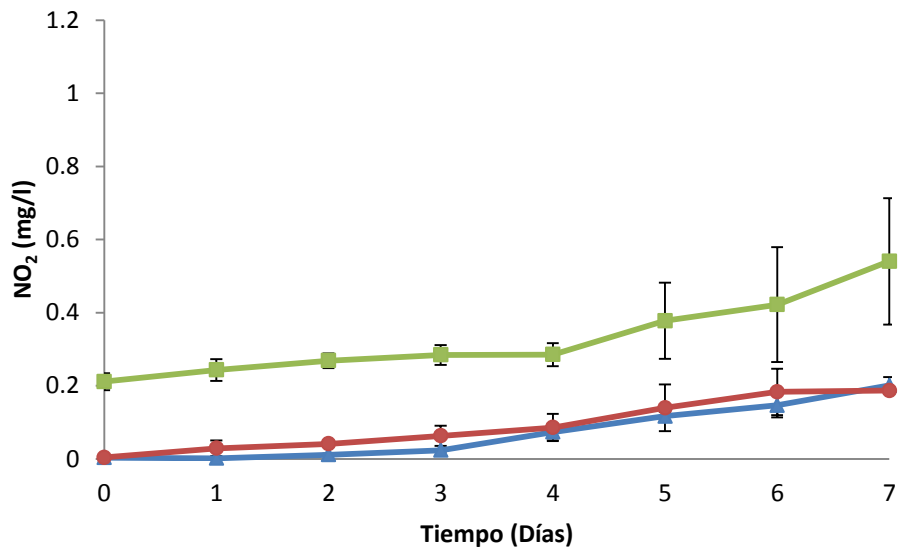


Figura 65. Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitritos (NO₂) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

En los 3 tratamientos no se presentó remoción de NO₂. Los aumentos de las concentraciones fueron de 6,274% en el efluente sintético, 4,689% en el efluente clorado y 152.7% para el efluente no clorado (Figura 66).

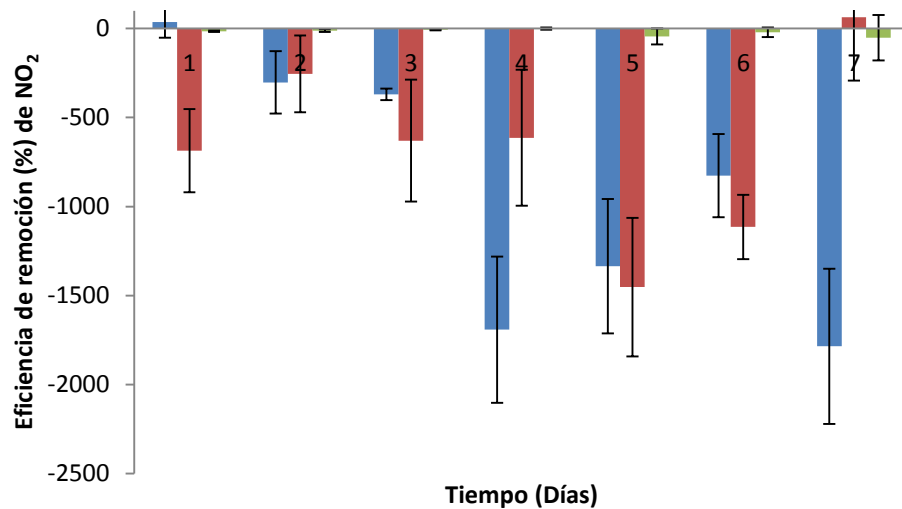


Figura 66. Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitritos (NO_2) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.

4.7.4. Remoción de nitratos (NO_3)

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) en la remoción de NO_3 entre los tratamientos, siendo el tratamiento de efluente sintético diferente al efluente no clorado. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en la concentración de NO_3 (mg/l) en los tratamientos los días de cultivo. En los 3 tratamientos se observó una disminución constante de NO_3 hasta el día 7. Las concentraciones iniciales fueron de 64.6 ± 0.9 (mg/l) en el efluente sintético, 66 ± 2.2 (mg/l) en el efluente clorado y 63.3 ± 1.1 (mg/l) para el efluente no clorado. La concentración más baja se registró en el día 7 en el efluente no clorado (36.2 ± 3.1 mg/l). La tendencia en las concentraciones de NO_3 es explicada en el modelo de regresión lineal ($P < 0.0001$ $R^2 = 0.7507$) (Figura 67).

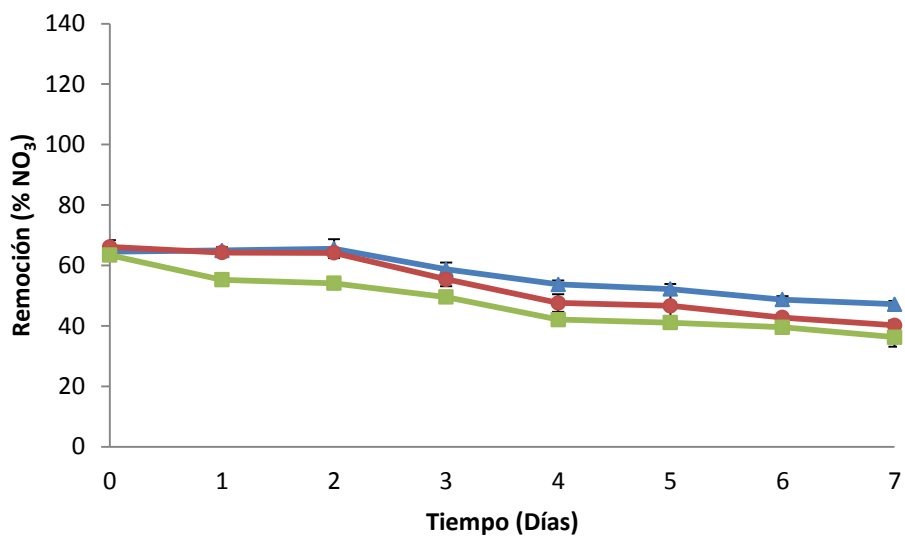


Figura 67. Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitratos (NO_3) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

La remoción de NO_3 se llevó a cabo en los 3 tratamientos durante todo el bioensayo. Las eficiencias de remoción registradas fueron de 26.9% en el efluente sintético, 39.2% en el efluente clorado y 42.7% en el efluente no clorado (Figura 68).

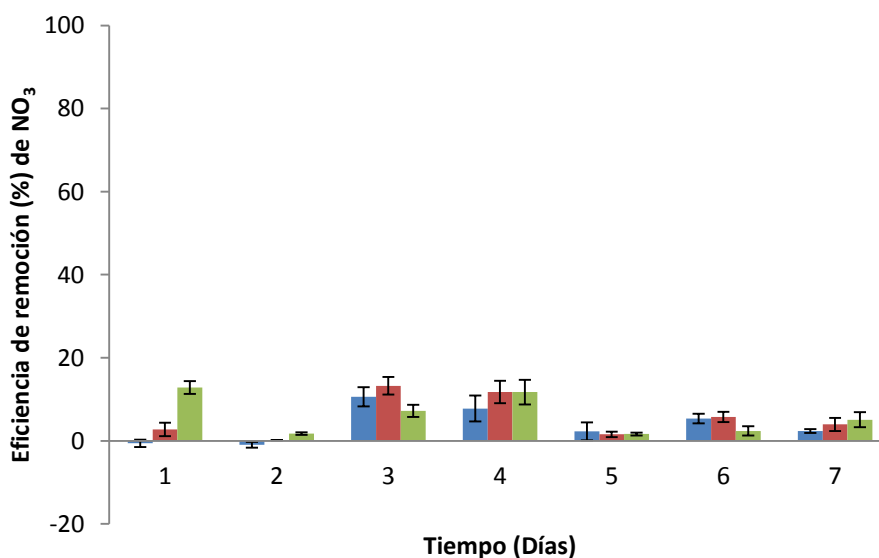


Figura 68. Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitratos (NO_3) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.

4.7.5. Remoción de fosfatos (PO₄)

No se encontraron diferencias significativas ($P < 0.1592$) en la remoción de PO₄ entre los tres tratamientos. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en la concentración de PO₄ (mg/l) en los tratamientos con los días de cultivo. La disminución en la concentración de PO₄ se registró en los tres tratamientos durante todo el bioensayo. Las concentraciones iniciales registradas fueron de 1.254 ± 0.089 (mg/l) en el efluente sintético, 1.281 ± 0.018 (mg/l) en el efluente clorado y 1.35 ± 0.036 (mg/l) para el efluente no clorado. La remoción total se llevó a cabo en los 3 tratamientos, siendo el efluente sintético donde se llevó a cabo más rápido, en el día 4. La tendencia en las concentraciones de PO₄ se explica en el modelo de regresión lineal ($P < 0.0001$ $R^2 = 0.8470$) (Figura 69).

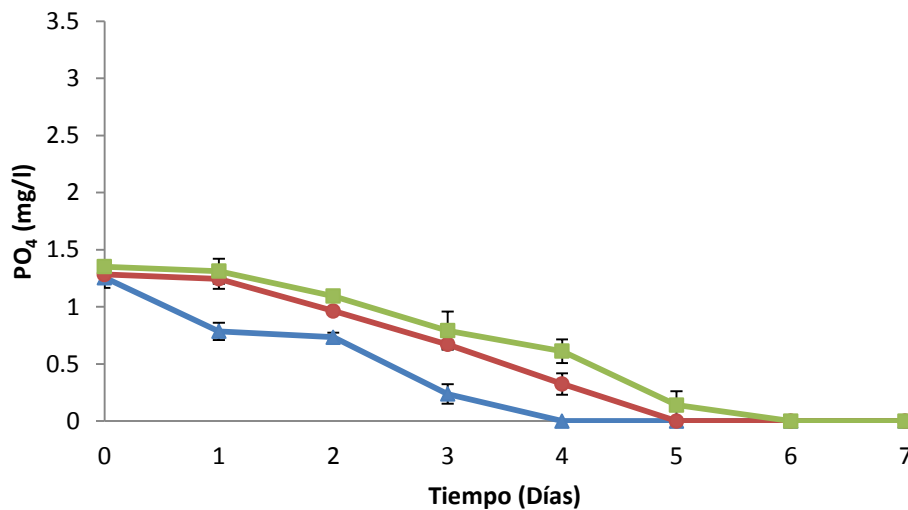


Figura 69. Valores promedio de la concentración (mg/l) de fosfatos (PO₄) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

La remoción de PO₄ se llevó a cabo en los 3 tratamientos, con una disminución constante durante el cultivo, alcanzando eficiencias de remoción de 100% para los 3 tratamientos (Figura 70).

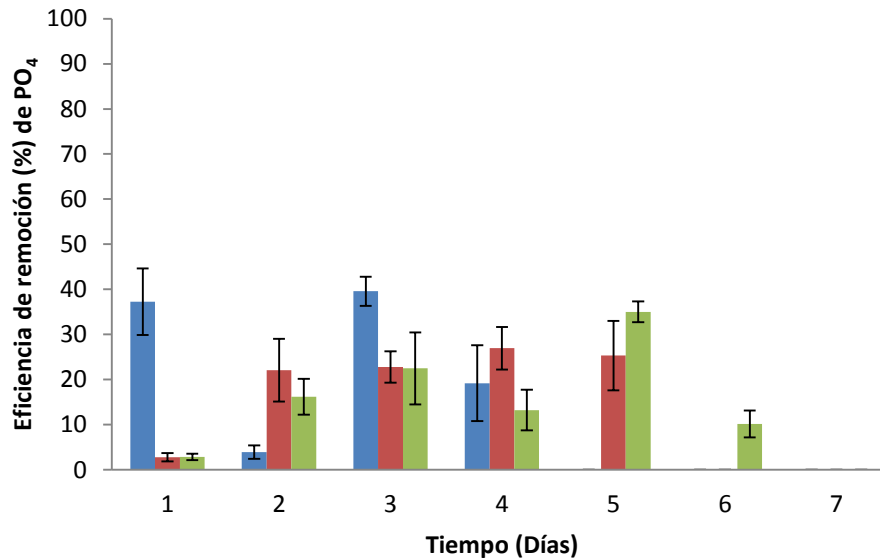


Figura 70. Valores promedio de la eficiencia de remoción de fosfatos (PO_4) en los 3 tratamientos. Barra azul, efluente sintético; barra guinda, efluente clorado y barra verde, efluente no clorado.

4.7.6. Alcalinidad (CaCO_3)

Se encontraron diferencias significativas ($P = 0.0107$) en las concentraciones de CaCO_3 entre los tratamientos, siendo el tratamiento de efluente clorado diferente al efluente sintético. El análisis de covarianza detectó cambios ($P = 0.0028$) en la concentración de CaCO_3 (mg/l) en los tratamientos con los días de cultivo. Las concentraciones iniciales fueron de 133 ± 5.7 (mg/l) en el efluente sintético, 103 ± 5.7 (mg/l) en el efluente clorado y 90 ± 10 (mg/l) en el efluente no clorado. Al día 7 de cultivo se registró una disminución en la concentración de CaCO_3 en el efluente sintético. La tendencia en las concentraciones de CaCO_3 no se explica en el modelo de regresión lineal ($P = 0.0251$ $R^2 = 0.0563$) (Figura 71).

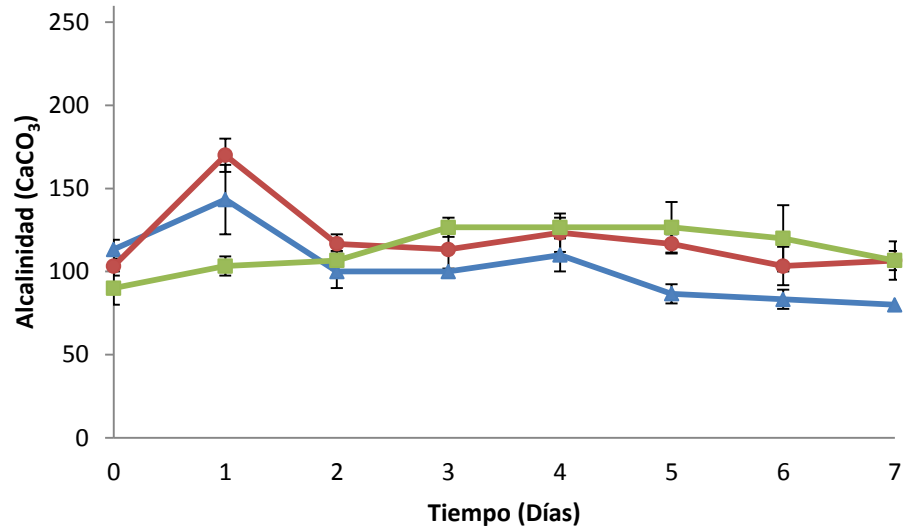


Figura 71. Valores promedio de la concentración (mg/l) de alcalinidad (CaCO_3) en los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

4.7.7. pH

No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.4824$) en el pH entre los tres tratamientos. El análisis de covarianza detectó cambios ($P = 0.0009$) en los valores de pH en los tratamientos con respecto al tiempo de cultivo. La tendencia en los valores de pH fue similar en los 3 tratamientos durante los 7 días, con un incremento constante hasta el día 3 y una disminución a partir del día 5 hasta el día 7. Los valores iniciales registrados en cada tratamiento fueron de 8.6 ± 0.02 en el efluente sintético, 8.7 ± 0.08 en el efluente clorado y 8.7 ± 0.02 para el efluente no clorado. La tendencia en los valores de pH no se explican en el modelo de regresión lineal ($P < 0.0001$ $R^2 = 0.1851$) (Figura 72).

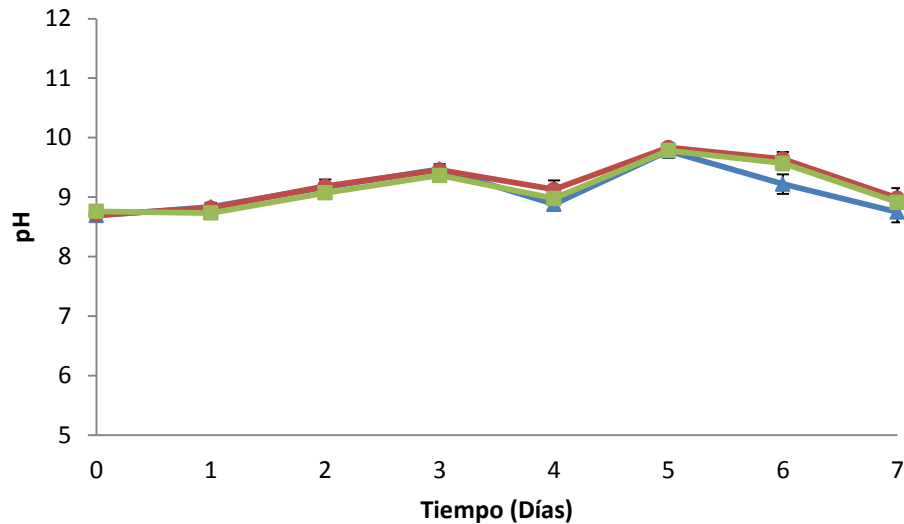


Figura 72. Valores promedio de pH en los tratamientos de efluente sintético, efluente clorado y efluente no clorado. Triángulo, efluente sintético; círculo efluente clorado y cuadro, efluente no clorado.

4.8. Composición proximal

4.8.1. Carbohidratos

No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.1204$) en el contenido de carbohidratos entre *C. vulgaris* (10-13%) y *S. obliquus* (9.2-14.2%). Se encontraron diferencias significativas ($P = 0.0037$) en el porcentaje de carbohidratos entre los diferentes tratamientos, detectándose los mayores porcentajes en los tratamientos de efluente sintético (10.1-14.4%) y efluente clorado (9.9-12.5%). Se encontraron diferencias significativas ($P = 0.0385$) en el contenido de carbohidratos entre los diferentes bioensayos, detectándose los valores más altos en los bioensayos I y II (Tabla 2).

4.8.2. Proteínas

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) en el porcentaje de proteínas entre las 2 especies, *S. obliquus* presentó una mayor concentración (31-45%) que *C. vulgaris* (23-34%). Entre los tratamientos se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) El efluente sintético (30-45%) y el efluente clorado (25-38%) registraron la

biomasa con mayor contenido de proteínas. En el efluente no clorado el contenido de proteínas fue de 23-44 %. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0020$) en el porcentaje de proteínas obtenido entre los bioensayos. Los mayores porcentajes de proteínas en la biomasa producida en las 2 especies se registraron en el bioensayo I y II. (Tabla 3).

4.8.3. Lípidos

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) en el porcentaje de lípidos entre *C. vulgaris* (34.5-55%) y *S. obliquus* (10-26%). No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.3279$) en la concentración de lípidos entre los 3 tratamientos. Se encontraron diferencias significativas ($P = 0.0001$) en el contenido de lípidos en los diferentes bioensayos (Tabla 4).

Tabla 2. Valores promedio de la composición proximal de carbohidratos de *C. vulgaris* y *S. obliquus* cultivadas en 3 tratamientos: efluente sintético, efluente clorado y efluente no clorado, con 3 bioensayos cada especie: Bio 1, Bio 2 y Bio 3.

Carbohidratos	<i>*C. vulgaris^a</i>			<i>S. obliquus^a</i>			
	***Bioensayo	Bio 1 ^k	Bio 2 ^{k,l}	Bio 3 ^l	Bio 1 ^k	Bio 2 ^{k,l}	Bio 3 ^l
**Tratamiento							
Efluente sintético ^x		11.3 ± 3.5%	10.1 ± 4.9%	13 ± 2.5%	13.7 ± 5.4%	14.4 ± 6.6%	14.2 ± 6%
Efluente clorado ^x		12.1 ± 1.1%	12.5 ± 2.4%	12.5 ± 2.9%	11.2 ± 1.6%	9.7 ± 0.9%	9.9 ± 0.8%
Efluente no clorado ^y		12.2 ± 4.9%	12.4 ± 4.2%	0	12.3 ± 4.4%	9.2 ± 2.9%	10.4 ± 3.6%

Tabla 3. Valores promedio y desviación estándar de la composición proximal de proteínas de *C. vulgaris* y *S. obliquus* cultivadas en 3 tratamientos.

Proteínas	<i>*C. vulgaris^b</i>			<i>S. obliquus^a</i>			
	***Bioensayo	Bio 1 ^k	Bio 2 ^{k,l}	Bio 3 ^l	Bio 1 ^k	Bio 2 ^{k,l}	Bio 3 ^l
**Tratamiento							
Efluente sintético ^x		31.4 ± 3.3%	30.2 ± 3.8%	34.6 ± 3%	45.6 ± 3%	37 ± 3.7%	39.4 ± 5.5%
Efluente clorado ^x		25.9 ± 3.3%	30.2 ± 5.6%	33 ± 5.4%	38.8 ± 7%	32.3 ± 8%	31.1 ± 5.8%
Efluente no clorado ^y		27.8 ± 4.6%	23.5 ± 4.8%	0	42 ± 2.9%	37 ± 2%	44.7 ± 12%

Tabla 4. Valores promedio y desviación estándar de la composición proximal de lípidos de *C. vulgaris* y *S. obliquus* cultivadas en 3 tratamientos.

Lípidos	<i>C. vulgaris^a</i>			<i>S. obliquus^b</i>			
	***Bioensayo	Bio 1 ^k	Bio 2 ^k	Bio 3 ^l	Bio 1 ^k	Bio 2 ^k	Bio 3 ^l
**Tratamiento							
Efluente sintético ^x		34.5 ± 9.4%	34.7 ± 11%	39.7 ± 7.6%	21 ± 1.7%	15.6 ± 7%	22.8 ± 11%
Efluente clorado ^x		40.9 ± 10%	39 ± 10.7%	44.7 ± 12%	14 ± 4.7%	10 ± 0.37%	14.3 ± 2.6%
Efluente no clorado ^x		45.5 ± 14%	43.9 ± 11%	0	20.4 ± 2%	26.2 ± 8.5%	20 ± 4.4%

Nota: En el bioensayo 3 de *C. vulgaris* no se obtuvieron muestras del tratamiento de efluente no clorado.

*Los suscritos (a>b) indican diferencias significativas en la concentración de carbohidratos, proteínas y lípidos entre ambas especies.

**Los suscritos (x>y) indican diferencias significativas en la concentración de carbohidratos, proteínas o lípidos entre los tratamientos de efluente sintético, clorado y no clorado.

***Los suscritos (k>l) indican diferencias significativas en la concentración de carbohidratos, proteínas y lípidos entre los bioensayos I, II y III.

4.9. Experimento II

4.9.1. Crecimiento microalgal (Cél/ml)

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) en el crecimiento entre *C. vulgaris* y *S. obliquus*. El análisis de varianza mostró diferencias significativas ($P < 0.0001$) en el crecimiento entre las 2 especies con respecto a los días de cultivo. El crecimiento fue similar durante los primeros 6 días, alcanzando una densidad de $3.9 \times 10^6 \pm 325,781$ cél/ml para *S. obliquus* y $3.1 \times 10^6 \pm 430,403$ cél/ml en *C. vulgaris*. A partir del día 11, el cultivo de *C. vulgaris* se descartó del experimento por la baja concentración celular que registró, mientras que *S. obliquus* permaneció hasta el día 17. El crecimiento no se explica en el modelo de regresión lineal ($P = 0.0766$ $R^2 = 0.0100$) (Figura 73).

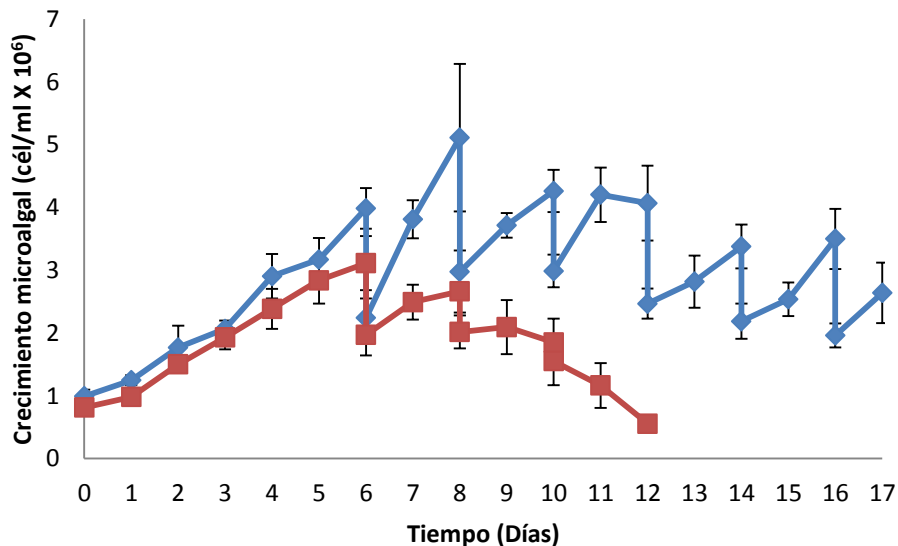


Figura 73. Valores promedio del crecimiento microalgal (cél/ml) de *S. obliquus* y *C. vulgaris* en sistema semicontinuo de cultivo. Rombo, *S. obliquus* y Cuadro, *C. vulgaris*.

No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.3842$) en la tasa de crecimiento entre los tratamientos. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en la tasa de crecimiento con respecto al tiempo. Las tasas más altas se registraron al día 2 con 0.48 ± 0.27 divisiones por día en *S. obliquus* y 0.61 ± 0.10 divisiones por día para *C. vulgaris*.

4.9.2. Remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT)

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) en la remoción de NAT entre los tratamientos. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en la concentración NAT (mg/l) en los tratamientos con los días de cultivo. Las 2 especies registraron un consumo total de NAT (0.15 ± 0.01 mg/l) en las primeras 24 h. A partir del día 6 y hasta el día 17, las concentraciones de NAT no fueron detectables en ambos tratamientos registrándose concentraciones de 0 mg/l de NAT en la mayoría de los días. La tendencia de la concentración de NAT en los tratamientos no se explica en el modelo de regresión lineal ($P < 0.0001$ $R^2 = 0.2045$) (Figura 74).

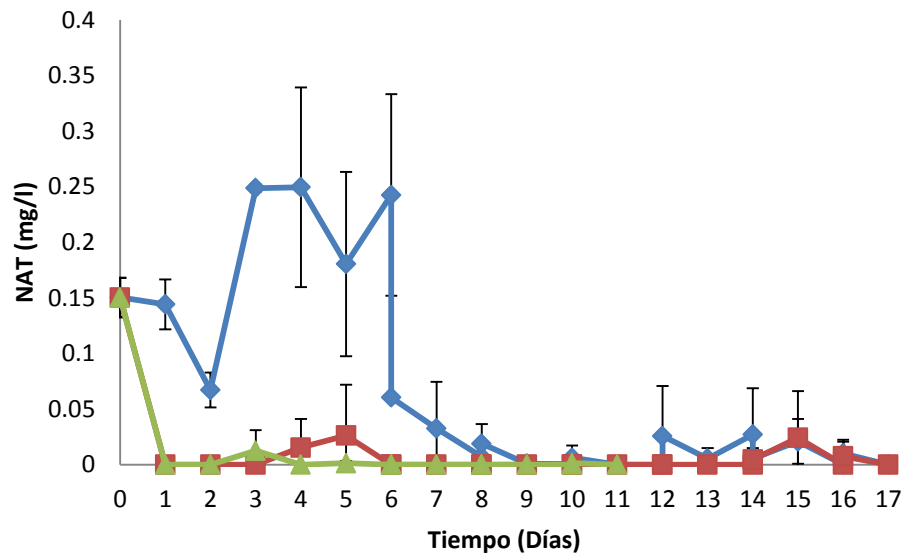


Figura 74. Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitrógeno amoniacal total (NAT). Rombo, control; cuadro, *S. obliquus* y triángulo, *C. vulgaris*.

Las eficiencias de remoción de NAT registradas en los cultivos de *C. vulgaris* y *S. obliquus* fue de 100%. En el control se presentó una dinámica de producción y consumo a los largo del bioensayo disminuyendo la concentración a partir del día 6 hasta el 17 con una eficiencia de remoción de 100% (Figura 75).

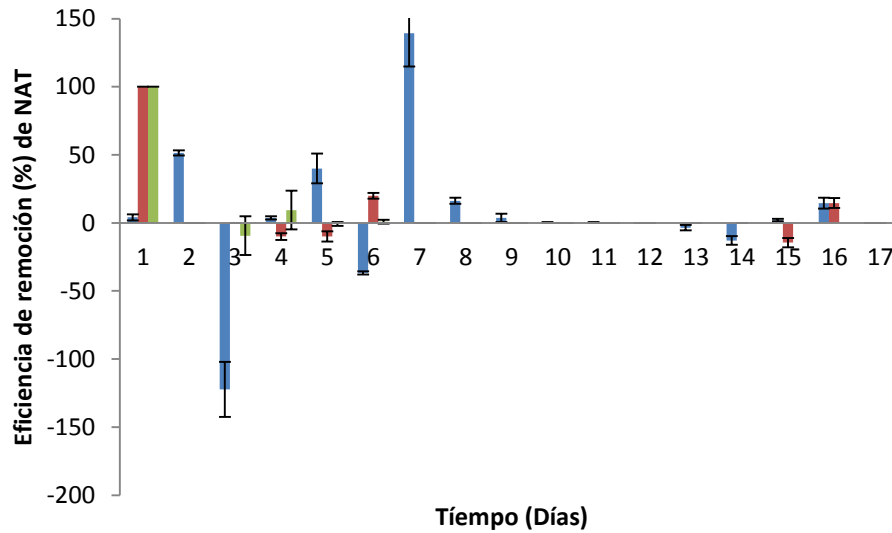


Figura 75. Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT). Barra azul, control; barra guinda, *S. obliquus* y barra verde, *C. vulgaris*.

4.9.3. Nitritos (NO₂)

Se presentaron diferencias significativas ($P < 0.0001$) en la remoción de NO₂ entre los tratamientos, siendo el tratamiento con *S. obliquus* diferente al control. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en la concentración de NO₂ (mg/l) en los tratamientos con los días de cultivo. La disminución más alta se registró en el tratamiento con *S. obliquus*, con concentraciones por debajo de 0.5 mg/l a partir del día 9. Por otro lado, se registró un aumento en la concentración de NO₂ para *C. vulgaris* en el control (0.4735 ± 0.0825 mg/l) y el tratamiento (0.5977 ± 0.1048 mg/l) en los primeros 6 días. La dinámica en las concentraciones de NO₂ no se explica en el modelo de regresión lineal ($P < 0.0001$ $R^2 = 0.1854$) (Figura 76).

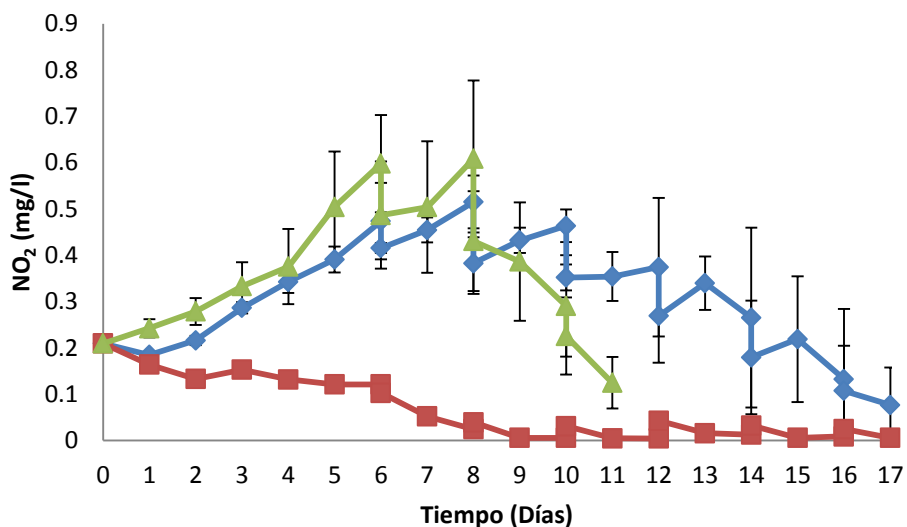


Figura 76. Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitritos (NO₂). Rombo, control; cuadro, *S. obliquus* y triángulo, *C. vulgaris*.

La mayor disminución de NO₂ se registró en el cultivo de *S. obliquus* con el 97 %. En el control se presentó una disminución del 63.4% en los 17 días de cultivo. El cultivo de *C. vulgaris* registró el menor consumo (18.7 %) durante los 11 días que permaneció (Figura 77).

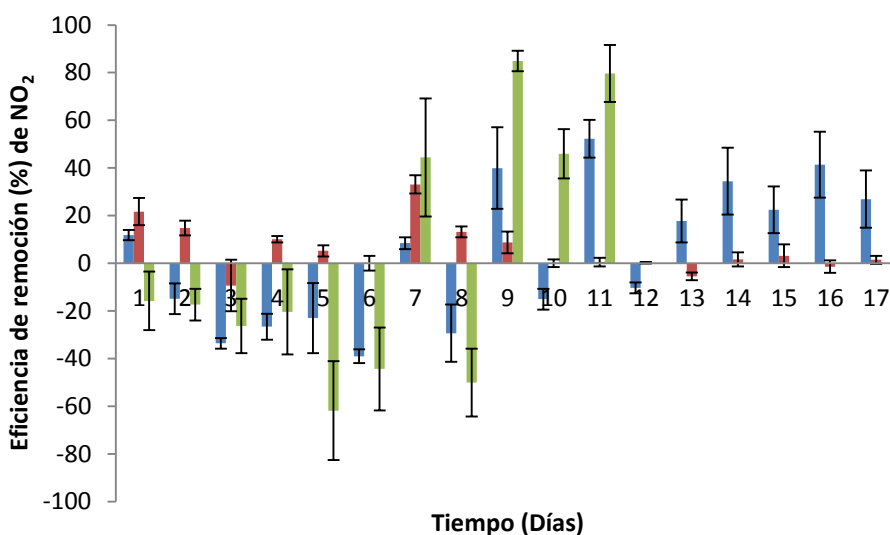


Figura 77. Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitritos (NO₂). Barra azul, control; barra guinda, *S. obliquus* y barra verde, *C. vulgaris*.

4.9.4. Remoción de nitratos (NO₃)

Se presentaron diferencias significativas ($P < 0.0001$) en la remoción de NO₃ entre los tratamientos. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en las concentraciones de NO₃ (mg/l) en los tratamientos con los días de cultivo. Durante los 17 días del bioensayo las concentraciones de NO₃ en el control fueron más altas y diferentes que las registradas en los tratamientos con *S. obliquus* y *C. vulgaris*, con la mayor concentración (103.4 ± 2.53) el día 8. El tratamiento con *S. obliquus* registró una concentración inicial 77.08 ± 3.29 mg/l y una final de 49.36 ± 1.759 mientras que *C. vulgaris* en su último día de cultivo registró una concentración de 67.11 ± 1.60 . La dinámica de la concentración de NO₃ en los tratamientos no se explica en el modelo de regresión lineal ($P < 0.0001$ $R^2 = 0.2518$) (Figura 78).

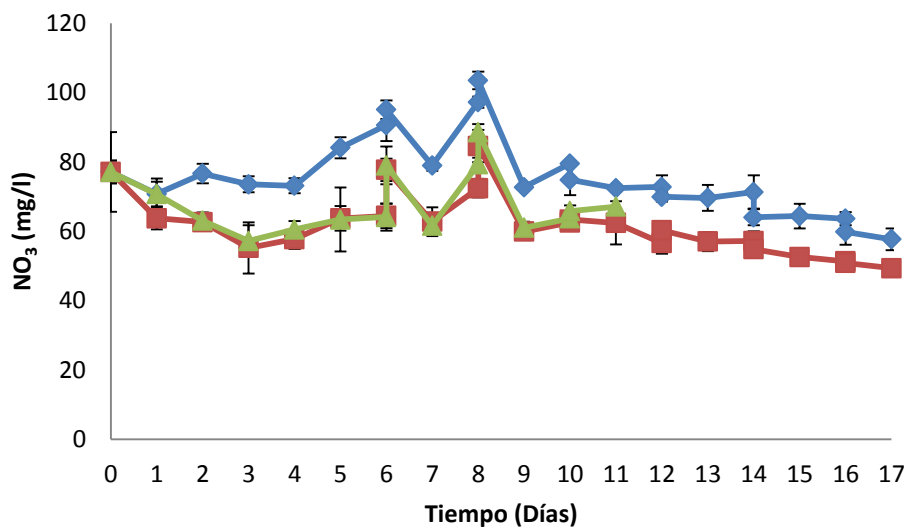


Figura 78. Valores promedio de la concentración (mg/l) de nitratos (NO₃). Rombo, control; cuadro, *S. obliquus* y triángulo, *C. vulgaris*.

En el tratamiento de *S. obliquus* se registró una eficiencia de remoción de 35.8 % y de 25 % en el control. El tratamiento de *C. vulgaris* no registró remoción de NO₃ durante los 11 días del bioensayo (Figura 79).

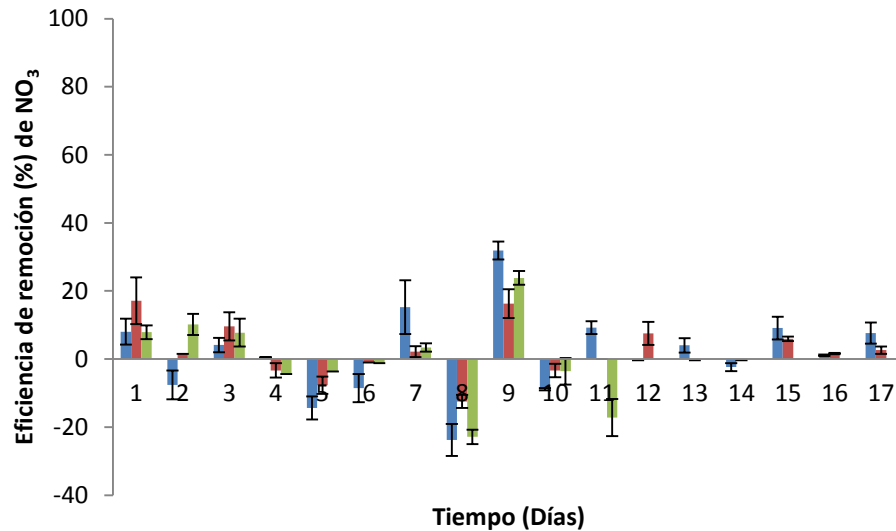


Figura 79. Valores promedio de la eficiencia de remoción de nitratos (NO₃). Barra azul, control; barra guinda, *S. obliquus* y barra verde, *C. vulgaris*.

4.9.5. Remoción de fosfatos (PO₄)

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) en la concentración de PO₄ entre los tratamientos, siendo diferente el control de los tratamientos con *S. obliquus* y *C. vulgaris*. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en las concentraciones de PO₄ (mg/l) en los tratamientos con el tiempo de cultivo. Las concentraciones iniciales para los 3 tratamientos fueron de 1.31 ± 0.089 mg/l. En los primeros 6 días se registró consumo de PO₄ en los tratamientos con *S. obliquus* y *C. vulgaris*, la concentración más baja se detectó día 6, con *S. obliquus* (0.11 ± 0.18 mg/l). *C. vulgaris* registró la concentración más baja en el día 5 (0.41 ± 0.061 mg/l). Las concentraciones de PO₄ en el control fueron superiores, presentado una dinámica de disminución y aumento. El consumo de PO₄ se llevó a cabo constantemente por *S. obliquus* hasta el día 12, a partir del día 13 hasta el 17 el consumo disminuyó. La dinámica de la concentración de PO₄ en los tratamientos con respecto al tiempo no se explica en el modelo de regresión lineal ($P = 0.2154$ $R^2 = 0.0014$) (Figura 80).

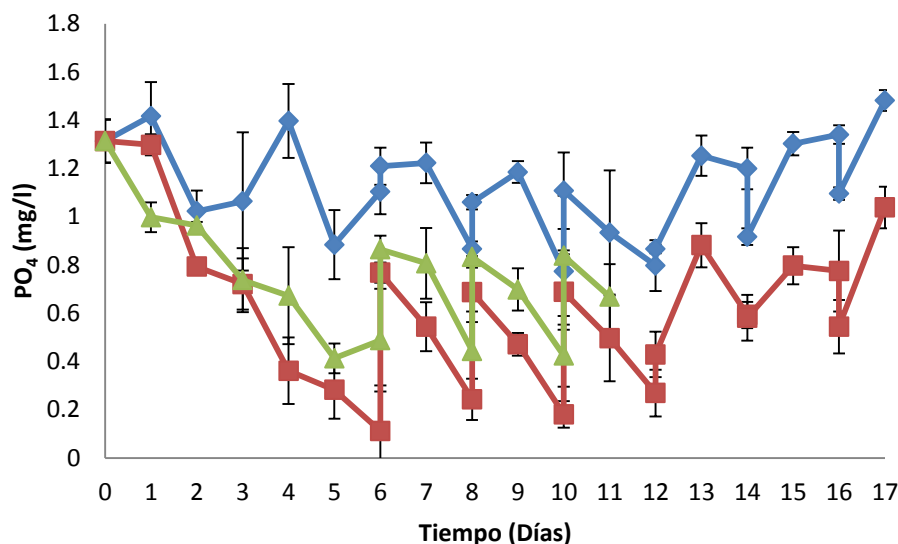


Figura 80. Valores promedio de la concentración (mg/l) de fosfatos (PO₄). Rombo, control; cuadro, *S. obliquus* y triángulo, *C. vulgaris*.

Se presentó una remoción constante de PO₄ durante los primeros 6 días de cultivo en *C. vulgaris* y *S. obliquus*. En el control se presentó una producción de PO₄ del 13 %. En el tratamiento con *S. obliquus* la eficiencia de remoción fue de 20.4 % en los 17 días. En los 11 días que se mantuvo *C. vulgaris* se registró una remoción de 48.6 %. En la figura 81 se muestran las eficiencias de remoción en los 3 tratamientos.

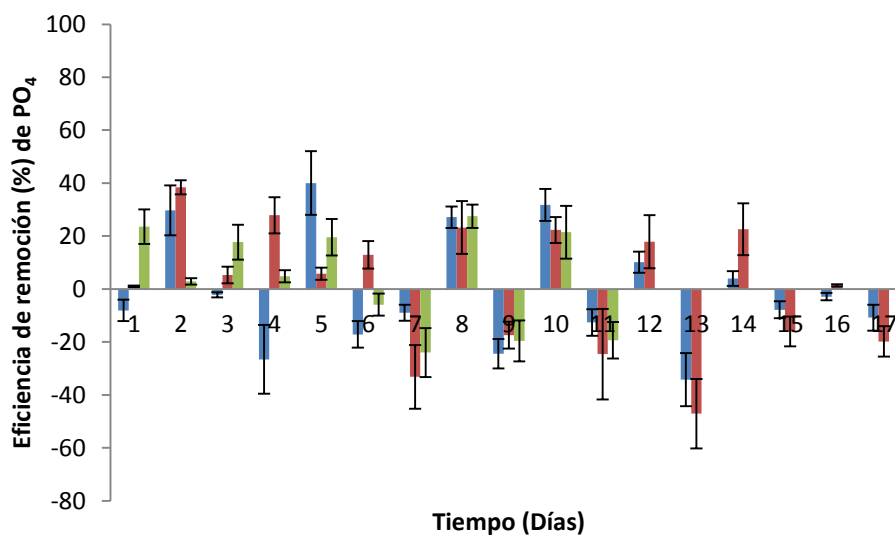


Figura 81. Valores promedio de la eficiencia de remoción de fosfatos (PO₄). Barra azul, control; barra guinda, *S. obliquus* y barra verde, *C. vulgaris*.

4.9.6. Alcalinidad (CaCO₃)

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) en las concentraciones de CaCO₃ entre los tratamientos. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en las concentraciones de CaCO₃ (mg/l) en los tratamientos con los días de cultivo. La alcalinidad fue mayor en *S. obliquus* y *C. vulgaris* y diferente que en el control. En *S. obliquus* y *C. vulgaris* se registró un aumento en la concentración de CaCO₃ en cada uno de los días del bioensayo. Las concentraciones iniciales de CaCO₃ fueron de 30 (mg/l) para los 3 tratamientos, las finales fueron de 40 mg/l (control), 76.6 ± 5.7 mg/l (*S. obliquus*) y 60 mg/l (*C. vulgaris*). La dinámica en la concentración de CaCO₃ de los tratamientos no se explica en el modelo de regresión lineal ($P = 0.8001$ $R^2 = -0.0058$) (Figura 82).

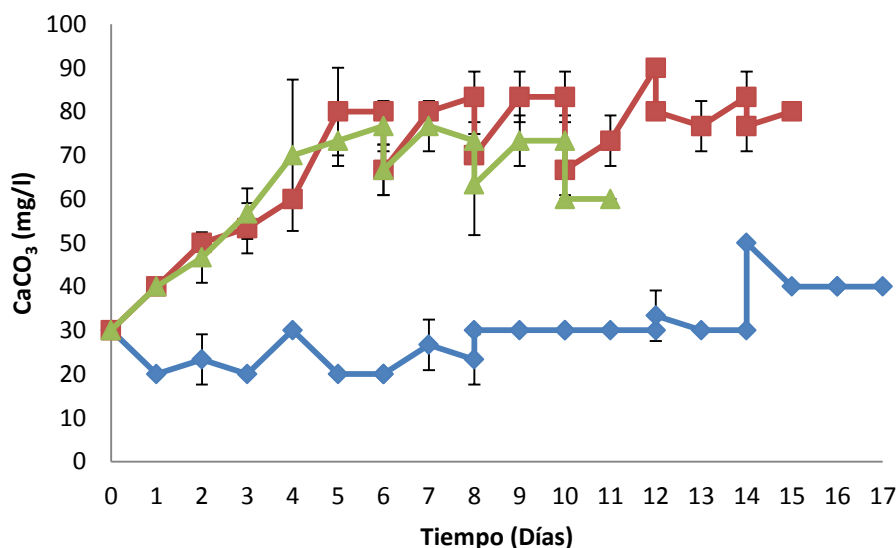


Figura 82. Valores promedio de la concentración (mg/l) de alcalinidad (CaCO₃). Rombo, control; cuadro, *S. obliquus* y triángulo, *C. vulgaris*.

4.9.7. pH

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) en los valores de pH entre los tratamientos. El análisis de covarianza detectó cambios ($P < 0.0001$) en los valores de pH, entre los tratamientos con los días de cultivo. El pH en el cultivo de *S. obliquus* y *C.*

vulgaris fueron mayores y diferentes al control durante el bioensayo. Durante los primeros 4 días se registró un incremento constante en los tratamientos de *S obliquus* y *C vulgaris*. A partir del inicio de las diluciones (día 6) se observaron decrementos en el pH hasta el final de bioensayo. El valor inicial de pH se registró en 6.66 en los 3 tratamientos, y valores finales de 7.91 ± 0.0173205 en el control, 8.89 ± 0.01 en el tratamiento con *S. obliquus* y 8.58 ± 0.0984886 en el cultivo con *C. vulgaris*. El comportamiento de pH en los tratamientos no se explica en el modelo de regresión lineal ($P < 0.001$ $R^2 = 0.1311$) (Figura 83).

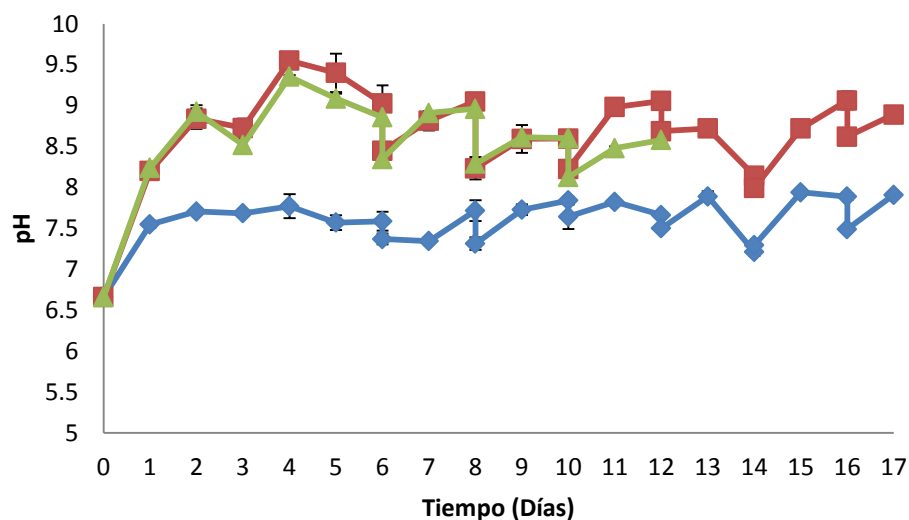


Figura 83. Valores promedio de pH en los 3 tratamientos. Rombo, control; cuadro, *S. obliquus* y triángulo, *C. vulgaris*.

Capítulo 5. Discusión, conclusiones y recomendaciones

5.1. Experimento I, *Chlorella vulgaris*

5.1.1. Crecimiento microalgal

En los 3 bioensayos el crecimiento microalgal fue mayor en los tratamientos de efluente sintético y efluente clorado que en el tratamiento de efluente no clorado. A pesar de que *Chlorella* es uno de los géneros de microalgas que se encuentran con más frecuencia en los estanques de estabilización de efluentes (Palmer, 1969) y se puede ver afectada por las características químicas del efluente acuícola tal como se registró en el efluente no clorado. En el tratamiento de efluentes crudos con microalgas, se recomienda la filtración y esterilización del efluente, con el objetivo de retirar la materia suspendida para permitir la transmisión de luz, eliminar el carbono orgánico disuelto, protozoarios y bacterias que pueden afectar el crecimiento de las microalgas (González *et al.*, 1997; Dumas *et al.*, 1998).

Lo anterior, también pudo tener un efecto en las fases “lag” prolongadas en los 3 bioensayos de *C. vulgaris*, las cuales coinciden con curvas de crecimiento de *C. vulgaris* registradas en el tratamiento de efluentes de tipo urbano (Ruiz-Marin *et al.*, 2010). Los períodos prolongados “lag” también han sido reportados con *S. obliquus* en el tratamiento de efluentes como los generados en la industria cervecera (Mata *et al.*, 2012). Estas variaciones en las fases de crecimiento de las microalgas utilizadas para el tratamiento de efluentes se atribuyen a las variaciones diarias de temperatura, intensidad luminosa, pH y baja concentración de nutrientes, que pueden ocasionar condiciones de estrés a la microalga (Olguin *et al.*, 2003; Rodolfi *et al.*, 2009). En los bioensayos, las condiciones de temperatura, intensidad luminosa (irradiancia), pH y la presencia de nutrientes (compuestos nitrogenados) no fueron controladas. Las temperaturas registradas fueron mayores a 35 °C, mientras que las temperaturas óptimas de crecimiento para *C. vulgaris* se reportan entre 20-30 °C (Singh y Thomas, 2012). La intensidad luminosa en la cual se mantuvieron los bioensayos fue la de ciclo natural luz: oscuridad, lo que pudo llevar a las microalgas a una fotoinhibición. En condiciones naturales, los cultivos microalgales enfrentan cambios drásticos en la

intensidad luminosa, para esto la microalga ha desarrollado mecanismos de aclimatación, como el aumento o reducción de la pigmentación. En el caso de intensidades bajas de luz (región limitante de luz) la tasa fotosintética de la microalga se incrementa llegando a un punto máximo de utilización, mientras que en condiciones naturales con intensidades luminosas por arriba de 10000 lux la eficiencia fotosintética se reduce hasta llegar a un punto de fotoinhibición (Hall y Rao, 1999). En nuestros bioensayos se registraron intensidades luminosas >25,000 lux, esto pudo ocasionar un efecto de fotoinhibición y daño en el sistema fotosintético como consecuencia de los largos períodos de estrés causado por la intensidad luminosa durante los 7 días de cada bioensayo. Las variaciones del pH en los bioensayos estuvieron entre 8.5 – 9, sin embargo, el pH para el cultivo de microalgas de agua dulce es aproximadamente 8, por arriba de este valor la productividad microalgal se ve afectada (Kong *et al.*, 2010). Por otro lado, la baja concentración de nutrientes provocó condiciones de estrés en las microalgas, ya que la forma de nitrógeno predominante en el efluente eran los NO_3 y no el NAT. En los cultivos de *C. vulgaris* se han reportado preferencias por el consumo de NAT, en vez de NO_3 (Lee y Lee, 2001), debido a que el primero es la forma de nitrógeno más reducido, mientras que el segundo es la forma más oxidada. En nuestros bioensayos las concentraciones de NAT siempre fueron bajas (< 0.5 mg/l) con altas concentración de NO_3 (> 70 ml/l). Al ser los NO_3 la fuente principal de nitrógeno, *C. vulgaris* necesita invertir más energía en metabolizar este compuesto, con el consecuente efecto negativo en el crecimiento por su dificultad en su asimilación (Becker, 1994; Lee y Lee, 2001).

Los resultados de densidad celular de *C. vulgaris* nos mostraron que es una especie con dificultades para crecer en efluentes acuícolas crudos y no presenta gran resistencia a condiciones de estrés como las diatomeas *Skeletonema costatum* y *Chaetoceros* spp., especies cultivadas exitosamente en efluente crudos provenientes de granjas acuícolas (Lefebvre, 1996). En trabajos anteriores se han reportado densidades celulares similares en efluentes sintéticos y efluentes crudos filtrados usando *C. vulgaris* con efluentes de origen urbanos (Ruiz-Marin *et al.*, 2010). Sin embargo, en nuestros 3 bioensayos, las densidades celulares obtenidas en el efluente sintético fueron más altas a las obtenidas en un efluente no clorado de origen acuícola. Esto pudo ser debido a que el efluente crudo de SRA no fue filtrado.

5.1.2. Remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT)

El consumo de NAT se llevó a cabo en los 3 bioensayos en todos los tratamientos alcanzando eficiencias de remoción del 100 % en las primeras 24 h. La principal razón del consumo preferente de NAT por la microalga radica en que este nutriente no necesita ser reducido en el proceso de asimilación, lo que significa un menor gasto de energía para ser convertido a nitrógeno orgánico al no requerir de una enzima (Maestrini *et al.*, 1986; Oh-Hama y Miyachi, 1992). Por esta razón, el NAT es la forma de nitrógeno preferido por las microalgas y a esto se atribuye la remoción de este nutriente en las primeras 24 h en estos bioensayos. Se ha reportado la eficiencia de remoción de nutrientes de *Chlorella* sp. de hasta un 86% para el NH_4 (Lau *et al.*, 1996). En trabajos anteriores realizados con *C. vulgaris* y *Phormidium bonheri* se reportaron eficiencias de hasta un 95% de remoción de NH_4 (De la Noüe y Proulx 1988; González *et al.*, 1997). Las altas eficiencias de remoción son similares a las reportado para *Platymonas subcordiformis* (87% - 95%) en efluentes provenientes de un cultivo de lenguado (Guo *et al.*, 2013). Sin embargo, en ese experimento el efluente fue filtrado y esterilizado para eliminar cualquier tipo de materia particulada y evitar el proceso de degradación y amonificación de la materia orgánica con la consecuente producción de NAT.

5.1.3. Nitritos (NO_2)

En los 3 bioensayos, en todos los tratamientos se registró un aumento constante en la concentración de NO_2 , lo anterior también fue reportado con la especie de *Arthospira máxima* (Cruz-Fraga, 2003). El efluente con el que se llevaron a cabo los 3 bioensayos con *C. vulgaris* proviene del retrolavado de los filtros biológicos, el efluente producto del retrolavado se compone de exceso de biopelícula (bacterias autótrofas y heterótrofas), sólidos particulados y disueltos, bacterias y protozoarios (Metcalf y Eddy, 1991; Malone, 1993; Crab, 2007). Las bacterias nitrificantes que se encuentran en el efluente siguen utilizando el NAT como fuente de electrones, lo que explica el aumento en la concentración de NO_2 . El proceso de conversión de NO_2 a NO_3 se ve inhabilitado

debido a que las bacterias del grupo filogenético que llevan a cabo la segunda parte de la nitrificación (nitrición) se inhiben por efecto de la luz (fotoinhibición) y por en ausencia de un sustrato para fijarse (Timmons y Losordo, 1994; Hagopian y Riley, 1998). Al inhibirse el proceso de nitrición, hay como consecuencia un aumento en la concentración de NO_2 . En los bioensayos se trabajó en condiciones no estériles (no axénicas), así mismo el área donde se colocaron los garrafones de los diferentes tratamientos estuvieron expuestos a condiciones ambientales.

5.1.4. Remoción de nitratos (NO_3)

Las eficiencias más altas de remoción se obtuvieron en los bioensayos I (25.5%) y III (45.7%) en el tratamiento de efluente clorado. Las concentraciones iniciales de NO_3 fueron diferentes en los 3 bioensayos por la naturaleza de los efluentes de SRA. La variabilidad en la concentración de NO_3 se ha reportado también en experimentos donde se utilizó *S. dimorphus* para la remoción de nutrientes en efluentes de origen industrial (González *et al.*, 1997). En nuestros bioensayos I y III los resultados mostraron la capacidad de *C. vulgaris* para consumir el NO_3 después del agotamiento del NAT, aun cuando es una especie que prefiere el NAT como fuente de nitrógeno (Lee y Lee, 2001). Estos resultados coinciden con lo reportado por Kaplan *et al.*, (1986), quienes establecen que al agotarse el NAT la microalga comienza a absorber NO_3 por medio de la activación de la enzima nitrato reductasa, la cual cumple con una doble función: transporte y reducción de NO_3 . La preferencia del consumo de NAT en vez del NO_3 radica en que el NAT se encuentra en su forma más reducida, mientras que el NO_3 es la forma más oxidada, lo que implica más electrones (8) en el proceso de asimilación (Oh-Hama y Miyachi, 1992; Syrett, 1981). Las eficiencias de remoción obtenidas en este trabajo fueron más bajas que las reportadas por Attasat *et al.*, (2012), quienes evaluaron la remoción de NO_3 con *C. vulgaris* (> 80 %) utilizando efluentes de un cultivo de tilapia bajo condiciones controladas de luz y temperatura usando un efluente diluido y esterilizado. Los autores explican que estas altas eficiencias de remoción se atribuyen a que los efluentes fueron formulados sintéticamente con NO_3 como única fuente de N. En estos bioensayos la dinámica de consumo/producción de NAT a lo largo de los 7

días del bioensayo tuvo en efecto en la inhibición de la nitrato reductasa y por lo tanto en el consumo de NO_3 .

5.1.5. Remoción de fosfatos (PO_4)

El PO_4 se consumió rápidamente en el efluente sintético en los 3 bioensayos con eficiencias entre 98.8 - 100%. El consumo de PO_4 en los tratamientos de efluente clorado y no clorado fue constante durante los días de cultivo pero menor al registrado en el efluente sintético el cual presentó eficiencias máximas de absorción de hasta 100% para el bioensayo III y 60.1 % para el bioensayo I al día 7 de bioensayo. Estas eficiencias de remoción han sido reportadas con diferentes cepas de *C. vulgaris* (Rasoul-Amini *et al.*, 2014). El consumo de PO_4 se atribuye a las microalgas, por ser un nutriente inorgánico del cual las microalgas adquieren fósforo, el cual requieren para su crecimiento y formación de ácido nucleicos (Becker, 1994).

Las eficiencias de remoción obtenidas en estos bioensayos en los tratamientos de efluente clorado y no clorado se encuentran por debajo a las reportadas en remoción de nutrientes con *S. obliquus* de 97 % (Aslan y Kapdan, 2006), *S. obliquus* (71 %) y *Phormidium* (90 %) (De la Noüe y Proulx, 1988), pero similares a *S. dimorphus* y *C. vulgaris* (55 %) (Ruiz-Marin *et al.*, 2010). En trabajos donde se obtuvieron eficiencias de remoción superiores al 90%, generalmente esto sucedió cuando el tiempo de cultivo fue superior a los 7 días. En nuestro caso los bioensayos tuvieron una duración de 7 días.

5.1.6. Alcalinidad (CaCO_3)

La alcalinidad registrada en el tratamiento sintético en los 3 bioensayos se mantuvo por encima de los 130 mg/l, mientras que en los tratamientos de efluente clorado y no clorado fueron de 80 mg/l aproximadamente. En los 3 bioensayos, en los 3 tratamientos se observaron pequeñas variaciones (incrementos y disminuciones) de la alcalinidad con respecto al tiempo. El aumento de la alcalinidad se debe a que existe una relación directa entre la alcalinidad consumida y el NAT que se consume, 3.13 g de alcalinidad son consumidos por cada g de NAT utilizado por bacterias quimioautótrofas en el proceso de nitrificación (Stumm y Morgan, 1996). Por lo que, el aumento en la alcalinidad en cada uno de los tratamientos se atribuye a que la única fuente de nitrógeno disponible en mayor concentración en cada uno de los cultivo fue el NO_3 .

Stumm y Morgan (1996), establecieron que se producen 4.02 g de alcalinidad por cada g de NO_3 consumido.

5.1.7. pH

Los valores de pH aumentaron en los 3 bioensayos, en los 3 tratamientos con el tiempo de cultivo con valores mayores de 8. Este aumento en el pH se debe a que las microalgas, para llevar a cabo la fotosíntesis consumen CO_2 como fuente de carbono inorgánico (Feachem *et al.*, 1983; Olgúin *et al.*, 2003). El CO_2 en el agua, es parte integral del sistema de alcalinidad y este al ser consumido por las microalgas hace que el sistema busque el equilibrio entre los iones hidronio HCO_3^- , CO_3^{2-} , $[\text{CO}_2]^*$, (H^+) e hidroxilo (OH^-) . El consumo de CO_2 por las microalgas implica una disminución del ion H^+ y $[\text{CO}_2]^*$ lo que implica que incrementen las concentraciones de OH^- y CO_3^{2-} provocando un aumento en el pH. Estos aumentos en pH son similares a los registrados en estanques de cultivo de microalgas que son asociados a la productividad microalgal (Stumm y Morgan, 1996). Así se tiene, que cuando el CO_2 se consume durante el día para llevar a cabo la fotosíntesis, se presenta la disminución de H^+ y HCO_3^- generando un incremento en el pH (Becker, 1994). Además, los cambios de pH son debido a que las microalgas no pueden utilizar igualmente todas las fuentes de carbono inorgánico disuelto. En nuestros 3 bioensayos, en los 3 tratamientos el aumento del pH se explica porque el CO_2 fue fácilmente consumido, mientras que el HCO_3^- y el CO_3^{2-} no fueron consumidos ya que estos solo se asocian o disocian con los iones H^+ en función de la alcalinidad presente (Prins y Elzenga, 1989; Becker, 1994).

5.2. Experimento I, *Scenedesmus obliquus*

5.2.1. Crecimiento microalgal

En *S. obliquus* las densidades celulares fueron mayores a 4×10^6 en los 3 bioensayos, en cada uno de los 3 tratamientos. El crecimiento de *S. obliquus* se caracterizó por una fase "lag" de 24-48 h, con un crecimiento constante hasta el día 7, sin registrar una fase de muerte en los 3 tratamientos en todos los bioensayos. La fase "lag" corta de *S. obliquus* se atribuyó a que el género *Scenedesmus* se encuentra ampliamente

distribuido con mayor abundancia y frecuencia en estanques de tratamiento de efluentes (Mohamed, 1994). La ubicuidad atribuida a esta especie nos indica que posee una mayor capacidad de adaptación a condiciones de estrés ocasionadas por la variabilidad de la temperatura, intensidad luminosa (irradiancia) y pH, además de que posee la capacidad de asimilar nitrógeno en forma de NAT y NO_3 (Palmer, 1969; Mohamed, 1994). La capacidad de esta especie para adaptarse a estas condiciones significó una ventaja para *S. obliquus* ya que el efluente que se utilizó en los bioensayos tenía una concentración de NO_3 mayor ($> 60 \text{ mg/l}$) que NAT ($< 0.3 \text{ mg/l}$). Esto lo atribuimos a que *S. obliquus* utilizada en nuestros bioensayos es especie aislada de un ambiente hipertrófico (agua residual), por lo que el tipo de cepa seleccionada que se utilice en el tratamiento de efluentes se convierte en un factor determinante para la eficiente remoción de nutrientes y el consecuente crecimiento microalgal (Larsdotter, 2006).

La capacidad de crecimiento de *S. obliquus* en los 3 bioensayos fue similar a la presentada por las diatomeas *Skeletonema costatum* y *Chaetoceros* spp en efluentes acuícolas sintéticos (Lefevbre *et al.*, 1996). En nuestros bioensayos, el comportamiento de las curvas de crecimiento obtenidas con *S. obliquus* fueron similares en efluentes sintéticos y efluente crudo, resultados similares a los reportados con *S. obliquus* utilizada en el tratamiento de efluentes urbanos (Ruiz-Marin *et al.*, 2010).

5.2.2. Remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT)

Las concentraciones de NAT (0.1 mg/l mínima - 0.25 mg/l máximas) fueron bajas en los 3 bioensayos, en los 3 tratamientos y se atribuyen al origen del efluente proveniente del retrolavado de los filtros biológicos (Crab, 2007). Las eficiencias de remoción de 100% en las primeras 24 h, se atribuye a que el NAT es la forma de nitrógeno más reducida que no implica gasto de energía metabólica para su asimilación directa por parte de la microalga (Armbrust *et al.*, 2004; Ganuza *et al.*, 2008). Esta asimilación rápida de NAT como fuente de nitrógeno significa para la microalga la formación de moléculas orgánicas sin el gasto de energía que se requiere con otras fuentes de nitrógeno como los NO_3 , esto por la reducción del NO_3 hasta NAT mediante la enzima nitrato reductasa

(Syrett, 1981; Becker, 1994). En trabajos anteriores, las eficiencias de remoción de NAT por la microalga *S. obliquus* se reportaron de hasta un 97%, similar a las reportadas con *S. dimorphus* (95%) en efluentes agroindustriales (González *et al.*, 1997; Aslan y Kapdan, 2006; Rasaoul-Amini *et al.*, 2014). Las altas eficiencias obtenidas en nuestros bioensayos refuerzan lo reportado por Oswald (1998), al mencionar la gran capacidad de las microalgas y en especial por *S. obliquus* para remover el nitrógeno inorgánico en forma de NAT presente en el efluente, en respuesta a la asimilación directa de este nutriente por la microalga.

5.2.3. Nitritos (NO₂)

En los 3 bioensayos en los 3 tratamientos se observó un incremento en las concentraciones de NO₂ en todos los tratamientos. Este aumento también se reportó en cultivos de *Arthospira maxima* como resultado de acción de las bacterias nitrificantes (Hagopian y Riley, 1998; Cruz-Fraga, 2003). En nuestros bioensayos, el uso de efluentes crudos con el que se llevaron a cabo los tres bioensayos se obtuvieron del retrolavado de los filtros biológicos, este efluente contiene un exceso de biopelícula (bacterias autótrofas y heterótrofas), sólidos particulados y disueltos (Malone, 1993; Crab, 2007). Las bacterias nitrificantes que se mantuvieron en el efluente siguen utilizando el NAT, con un aumento en la concentración de NO₂. Mientras que en el proceso de conversión de NO₂ a NO₃ se inhabilita debido a que las bacterias son inhibidas por la luz y por en ausencia de un sustrato para fijarse (Timmons y Losordo, 1994; Hagopian y Riley, 1998). Esta inhibición en el proceso de nitrificación, tiene como consecuencia un aumento en la concentración de NO₂. En los bioensayos se trabajó en condiciones no estériles, en condiciones ambientales.

5.2.4. Remoción de nitratos (NO₃)

El consumo de NO₃ en los 3 bioensayos, en los 3 tratamientos durante los 7 días de cultivo fue consecuencia de las bajas concentraciones de NAT (< 0.3 mg/l), que al ser asimilados en las primeras 24 horas pasaron a ser la única fuente nitrógeno en el

efluente. Aunque en nuestros bioensayos se registró la remoción de los NO_3 , esta no se llevó a cabo en un período corto como en el caso del NAT. Este retraso en el consumo de NO_3 por parte de la microalga se debió a que en el proceso de asimilación los NO_3 deben ser reducidos hasta NAT en 2 fases. La primera es mediante la intervención de la enzima nitrato reductasa que lleva a cabo transformación del NO_3 a NO_2 , mientras que en la segunda los NO_2 son reducidos a NAT con la enzima nitrito reductasa (Becker, 1994). Este proceso de reducción implica un gasto de energía metabólica por parte de la microalga. Por lo que, cuando el NAT y NO_3 están presentes en el efluente, la microalga consume primero el NAT por ser la fuente de nitrógeno más reducida y ser asimilado directamente (Lee y Lee, 2001).

El consumo de NO_3 en nuestros bioensayos fue afectado por la presencia de NAT, debido a que las microalgas prefieren el consumo de NAT por ser asimilado directamente sin gasto de energía metabólica (Maestrini *et al.*, 1986; Bhaya *et al.*, 2002). Lo anterior puede explicar porque las eficiencias en nuestros bioensayos son menores a las reportadas en otros trabajos con la microalga *Platymonas subcordiformis* (98%) en efluentes generados en el cultivo de lenguado durante un tratamientos de 14 días. (Guo *et al.*, 2013) y *C. vulgaris* (> 80%) en efluentes de tilapia (Attasat *et al.*, 2012). En ambos casos la única fuente de nitrógeno fue en forma de NO_3 , evitando que la presencia de NAT afectara el consumo de NO_3 .

5.2.5. Remoción de fosfatos (PO_4)

Las disminución constante en la concentración de PO_4 en los 3 bioensayos en todos los tratamientos, se debió a la absorción directa por parte de la célula en condiciones aeróbicas, siendo el consumo PO_4 por la microalga necesario, ya que este nutriente está implicado en procesos celulares como la biosíntesis de ácidos nucleicos (Chevalier y De la Noüe, 1985; Becker, 1994) El consumo de PO_4 en la célula también reflejó la resistencia de *S. obliquus* a condiciones de estrés como la ocasionada por la intensidad luminosa. Las eficiencias de remoción obtenidas en nuestros bioensayos nos indican que *S. obliquus* fue una especie con la capacidad de remover más del 65% de PO_4 en un período de 7 días aun cuando las condiciones de luz, temperatura y pH no fueron las

óptimas. Las eficiencias de remoción registradas en este estudio coinciden a lo reportado por Voltolina *et al.*, (1999), quien reporta que más del 50% de los fosfatos fue removido por *Scenedesmus* en efluentes artificiales en condiciones controladas. Otros trabajos reportaron eficiencias de remoción del 71% - 90% para *Phormidium* y 75% para *Scenedesmus obliquus* en efluentes urbanos (De la Noüe y Proulx, 1988), 76% para *Scenedesmus* sp. cultivada en efluentes artificiales (Xin *et al.*, 2010) y > 70% para *Spirulina* en efluentes porcícolas diluidos (Olguín *et al.*, 2003).

5.2.6. Alcalinidad (CaCO₃)

La alcalinidad registrada en los 3 bioensayos, en el efluente sintético fue mayor de 140 mg/l. En los tratamientos de efluente clorado y no clorado, las concentraciones registradas fueron menores a 100 mg/l en los 3 bioensayos. Los CO₃⁻² presentaron una dinámica diaria de aumento y disminución con respecto a los días de cultivo. Esta dinámica es explicada por Stumm y Morgan (1996), que atribuyen los aumentos de CaCO₃ al consumo de NO₃ presentes en el medio y las disminuciones a causa del consumo de NAT disponible por las microalgas, como fuentes de nitrógeno. En este sentido Stumm y Morgan (1996) establecieron que existe un consumo de 3.13 g de alcalinidad por cada g de NAT consumido y 4.02 g de alcalinidad es producida por cada g de NO₃ consumido. Por lo que, los aumentos registrados en este trabajo se deben a que el NO₃, en la mayoría de los bioensayos fue la única fuente de nitrógeno presente y disponible en el medio.

5.2.7. pH

Los aumentos constantes en los valores de pH en los 3 bioensayos, en los 3 tratamientos son consecuencia del consumo de CO₂ por las microalgas como principal fuente de carbono inorgánico para llevar a cabo la fotosíntesis (Garcia *et al.*, 2000; Park y Craggs, 2010; Riano *et al.*, 2011). El CO₂ es parte del sistema de alcalinidad y cuando este se consume por las microalgas el sistema busca un equilibrio entre los iones hidronio (H⁺) e hidroxilo (OH⁻). En los bioensayos, cuando las microalgas consumieron

el CO_2 hubo el ion H^+ disminuyó, lo que implicó que las concentraciones de OH^- incrementaran provocando un aumento en el pH. Estos aumentos en pH se registraron en estanques de cultivo de microalgas asociados a la actividad fotosintética de las microalgas microalgal (Stumm y Morgan, 1996). Los cambios de pH son debido a que las microalgas no pueden utilizar igualmente todas las fuentes de carbono inorgánico disuelto. En nuestros 3 bioensayos, en los 3 tratamientos el aumento del pH se explica porque el CO_2 fue fácilmente consumido, mientras que el HCO_3^- y el CO_3^{2-} no fueron consumido (Prins y Elzenga, 1989).

5.3. Composición proximal

5.3.1. Carbohidratos

En los 3 bioensayos, el porcentaje de carbohidratos para *C. vulgaris* fue de $10 \pm 4.1\%$ y de $11.7 \pm 2\%$ para *S. obliquus*. El bajo contenido de carbohidratos se ha mencionado que es consecuencia de un aumento en la concentración de nitritos en los cultivos afectando la actividad fotosintética de las microalgas, lo que contribuye a una disminución de las reservas de los carbohidratos en la célula (Reyes *et al.*, 1993). En los 3 bioensayos con cada especie se registró un incremento constante de los NO_2^- , confirmando que el posible efecto de los nitritos en el contenido de carbohidratos (Reyes *et al.*, 1993). Los porcentajes obtenidos en este estudio son menores a los obtenidos para *Scenedesmus* sp (27.4%) cultivada en sistemas semicontinuos, donde se controlaron todas las variables fisicoquímicas (Voltolina *et al.*, 1999) y nuestros resultados fueron similares a los obtenidos en otros trabajos con *Scenedesmus* sp. (12% y 13%) utilizadas para la depuración de efluentes en medios sintéticos (Flores-Páez, 2012). Andrade *et al.*, (2009), también reportaron concentraciones bajas de carbohidratos (10%) en *Scenedesmus* sp. cultivada con efluentes sintéticos.

5.3.2. Proteínas

En este trabajo los porcentajes de proteínas encontrados fueron más altos en *S. obliquus* ($38.7 \pm 5\%$) que en *C. vulgaris* ($26.3 \pm 7\%$). Las diferencias entre porcentajes

podieron ser debidas a las respuestas específicas de las especies a las condiciones a las que fueron mantenidos los cultivos y al diferente tipo de crecimiento de cada especie, con una mayor concentración de proteínas cuando la microalga se mantiene en su curva de crecimiento en una fase de exponencial o en un crecimiento constante (Becker, 1994, Granum *et al.*, 2002). En nuestro trabajo este mayor contenido de proteínas en *S. obliquus* se puede atribuir al crecimiento constante que registró en su curva, en donde durante los 7 días de bioensayo siempre presentó un crecimiento, caso contrario registrado en la curva de crecimiento de *C. vulgaris*, debido a que nuestros bioensayos se realizaron en condiciones no controladas de luz y temperatura bajo condiciones naturales, con variabilidad en la concentración de nutrientes. En otros trabajos, los cambios en el contenido de proteínas se atribuyeron a factores como la luz y los nutrientes (nitrógeno en forma de NAT o NO₃) (Ruiz-Marin *et al.*, 2010), mientras que Flores-Páez (2012) atribuyó las altas concentraciones de proteínas a un posible mayor contenido de clorofila a en la fase estacionaria. Los porcentajes obtenidos en este trabajo son similares a los reportados para *Scenedesmus* sp. (33.5%) cultivada en sistemas semicontinuos para la remoción de nutrientes (Voltolina *et al.*, 1999) y para *Scenedesmus* sp (47% y 58%) utilizada en la remoción de nutrientes en efluentes sintéticos (Flores-Páez, 2012).

5.3.3. Lípidos

Los porcentajes de lípidos en los 3 bioensayos fueron mayores en *C. vulgaris* (35.9 ± 14%) que *S. obliquus* (18.4 ± 5.1%). Los porcentajes considerablemente altos de lípidos en *C. vulgaris* y en algunos casos para *S. obliquus*, se atribuyen a las bajas concentraciones de nutrientes como PO₄, lo que puede inducir a un incremento en los niveles de triacilglicerolos (Khozin y Cohen, 2006) o a una disminución en la concentración de nitrógeno (NAT y NO₃) en el efluente (Cooksey *et al.*, 1987; Tillet, 1988; Di Martino *et al.*, 1998).

En los 3 bioensayos con las 2 especies el consumo de nitrógeno en forma de NAT se llevó a cabo en las primeras 24 h, quedando el NO₃ como única fuente de nitrógeno, el cual no es de fácil asimilación para la microalgas, principalmente para *C. vulgaris* lo que

constituye un factor de estrés (Lee y Lee, 2001). Voltolina *et al.*, (1999) obtuvieron 12.8 % de lípidos en *Scenedesmus* sp cultivada en sistemas semicontinuos en un efluente formulado sintéticamente. Otros trabajos con similitud en el contenido de lípidos fue con *Scenedesmus* sp. en medios de cultivos artificiales estériles (22% - 35%) (Xin *et al.*, 2010). Illman *et al.*, (2000), reportaron aumentos en las concentraciones de lípidos en tres especies de *Chlorella* (*C. emersonii*, *C. minutissima* y *C. vulgaris*) alcanzando un contenido de lípidos de hasta 63% utilizando como factor de estrés bajos niveles de nitrógeno (NO₃) en cultivos bajo condiciones controladas.

5.4. Experimento II, Cultivo semicontinuo

5.4.1. Crecimiento microalgal

En el bioensayo semicontinuo, se observó que ambas especies (*S. obliquus* y *C. vulgaris*) mostraron una fase “lag” corta (24 h). Las curvas de crecimiento de ambas especies tuvieron un comportamiento similar hasta antes de iniciar las diluciones al día 6 (30% del volumen total), con densidades celulares de 3.1×10^6 (*C. vulgaris*) y 3.9×10^6 (*S. obliquus*). Los resultados en este bioensayo mostraron un cambio en la curva de crecimiento de *C. vulgaris* diferente al registrado en los bioensayos del experimento I, en el cual las condiciones de luz y temperatura no fueron controlados. Estos cambios indican que durante los bioensayos del experimento I, *C. vulgaris* fue afectada por la variabilidad diaria de la intensidad luminosa (irradiancia) y de la temperatura registradas en las condiciones no controladas en las que se realizaron los bioensayos. El principal factor en el cambio en la curva de crecimiento de *C. vulgaris* se atribuyó a la intensidad luminosa que provoca daños en el aparato fotosintético de la microalga en intensidades mayores de 10000 lux. En estas condiciones la actividad fotosintética disminuye hasta llegar a un punto de fotoinhibición, mientras que en intensidades menores de 10000 lux la actividad fotosintética puede alcanzar su punto máximo, con una mejora en el crecimiento microalgal (Richmond, 1986; Hall y Rao, 1999). En los bioensayos del experimento I, la intensidad de luz fue > 25000 lux, mientras que en el experimento II la intensidad luminosa fue de 7500 lux. En el experimento II la irradiancia y la temperatura no tuvieron un efecto en el crecimiento

En el bioensayo II cuando los cultivos se diluyeron al 30%, se registró una disminución constante en la densidad celular de *C. vulgaris* con respecto al tiempo iniciando una disminución desde el día 8. En contraste, *S. obliquus* presentó una mayor capacidad de crecimiento, aunque para el día 12 inició la disminución de la densidad celular, la cual fue constante hasta el día 17. La capacidad de crecimiento de *S. obliquus* en efluentes crudos registrada en sistema semicontinuo, también se comprobó en los bioensayos del experimento I en sistemas estáticos, donde se obtuvieron densidades celulares similares en los 3 tratamientos (efluente sintético, clorado y no clorado).

Los resultados obtenidos en este bioensayo mostraron que *S. obliquus* tiene mayor capacidad que *C. vulgaris* para crecer en efluentes crudos bajo condiciones de luz y temperatura controladas, tal como lo reportado para esta especie cultivada en efluentes urbanos para la remoción de nutrientes (Ruiz-Marin *et al.*, 2010). Las condiciones estables de luz y temperatura no tuvieron un efecto en el crecimiento de las microalgas, sin embargo, el efecto de las diluciones causó una disminución mayor en la densidad celular de *C. vulgaris* que *S. obliquus*. Las diluciones del 30% del volumen total reemplazado con efluente nuevo se convirtieron en un factor de estrés debido a los cambios generados en los cultivos resultado de la variabilidad de las condiciones como pH, temperatura, nutrientes y sólidos suspendidos (Metcalf y Eddy, 1991; Malone, 1993; Crab, 2007).

5.4.2. Remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT)

En el bioensayo, el nitrógeno en forma de NAT se encontró en bajas concentraciones y los NO_3 eran la principal fuente de nitrógeno, esto debido a la naturaleza del efluente (Crab, 2007). Los resultados del bioensayo nos mostraron que las bajas concentraciones de NAT en el efluente fueron consumidos por las 2 especies en las primeras 24 h. El consumo rápido de NAT se debe a que en su asimilación la microalga no requiere un gasto de energía metabólica para la formación de nitrógeno orgánico. En trabajos anteriores esto se comprobó con las mismas especies *C. vulgaris* y *S. obliquus* en el tratamiento de efluente primarios (Lau *et al.*, 1996). Las altas eficiencias obtenidas en este bioensayo son similares a las obtenidas con especies como *Phormidium*

bohneri (82 %) en efluentes acuícolas de truchas arcoíris (Dumas, 1998), *S. obliquus* (97%), eficiencia similar a la obtenida con *S. dimorphus* (95%) en remoción de efluentes agroindustriales artificiales (González *et al.*, 1997; Rasaoul-Amini *et al.*, 2014).

Los resultados de nuestro bioensayo el NAT este fue consumido por las microalgas, en contraste en el tratamiento control concentraciones fluctuaron durante los primeros 6 días (consumo/producción), pero en ningún momento las concentraciones de NAT fueron tan bajas o inexistentes como en los tratamientos con *C. vulgaris* y *S. obliquus*.

5.4.3. Nitritos (NO₂)

La disminución de la concentración de NO₂ en los efluentes a partir del día 6 fue consecuencia de las diluciones. Sin embargo, antes de las diluciones (primeros 5 días), en el control y en el cultivo de *C. vulgaris* hubo un aumento constate de los NO₂ que se atribuyó a la naturaleza del efluente. El efluente obtenido de los biofiltros contiene un exceso de biopelícula compuesta de bacterias autótrofas y heterótrofas, además de sólidos particulados y disueltos (Metcalf y Eddy, 1991; Malone, 1993). En el efluente, las bacterias nitrificantes siguen transformando el NAT a NO₂ aumentando su concentración Esta concentración también puede aumentar cuando en el proceso de transformación de los NO₂ se inhibe por efecto de la luz y temperatura provocando también un aumento en la concentración de NO₂. En otros trabajos utilizando especies como *C. vulgaris* y *S. dimorphus* para la remoción de nutrientes en efluente agroindustriales diluidos, se registraron incrementos en las concentraciones de NO₂ en los efluentes, por efecto del proceso de nitrificación (González *et al.*, 1997). Esto también se registró en cultivo de la microalga *Arthospira máxima* usada en la remoción de nutrientes acuícolas (Cruz-Fraga 2003).

5.4.4. Remoción de nitratos (NO₃)

En este bioensayo, en el tratamiento de *S. obliquus* y *C. vulgaris* se presentó un consumo constante de NO₃ en los primeros 6 días de cultivo. En estos seis días, las concentraciones registradas en el control permanecieron similares a la concentración

inicial. La dinámica de la concentración de los NO_3 registrada en el control nos indica que la disminución en las concentraciones de NO_3 en los tratamientos de *S. obliquus* y *C. vulgaris* en los primeros 6 días de cultivo se debieron al consumo celular (González *et al.*, 1997). El consumo de NO_3 fue debido a que este nutriente se presentó como la única fuente de nitrógeno (Cannons y Pendleton 1994; Dumas, 1998). Sin embargo, el lento consumo de NO_3 se debe a que en su asimilación debe transformarse a NAT mediante la enzima nitrato reductasa y nitrito reductasa, con un gasto energético metabólico para la microalga.

El consumo de NO_3 por parte de *S. obliquus* y *C. vulgaris* a lo largo del bioensayo mostró la capacidad para adaptarse al consumo de NO_3 como fuente nitrógeno. En otros trabajos esta capacidad no es reportada para *C. vulgaris*, debido a su preferencia por el NAT (Morris, 1974; Bhaya *et al.*, 2002). Las eficiencias de remoción reportadas en este trabajo son menores a las reportadas para *Scenedesmus* sp. (50% - 66%) en sistemas semicontinuos bajo condiciones controladas (Voltolina *et al.*, 1999). Sin embargo estas diferencias en eficiencias se debieron a la utilización de un medio formulado sintéticamente, en el cual la única fuente nitrógeno fue en forma de NO_3 y a que los cultivos se mantuvieron en condiciones controladas.

5.4.5. Remoción de fosfatos (PO_4)

El consumo de PO_4 durante los primeros 6 días de cultivo fue similar para *C. vulgaris* y *S. obliquus*, mientras que en el control se presentó una dinámica de consumo/producción. La disminución en las concentraciones de PO_4 en los cultivos de *C. vulgaris* y *S. obliquus* se atribuyeron al consumo celular, esto se comprobó con la dinámica registrada en el control, donde las concentraciones no fueron bajas como en los tratamientos de *C. vulgaris* y *S. obliquus*. Además, el consumo de PO_4 se atribuye a las microalgas porque este es un nutriente esencial para la formación de constituyentes celulares como fosfolípidos, nucleótidos y ácidos nucleótidos (Richmond, 1986; Becker, 1994). En trabajos en estanques de estabilización de efluentes, el consumo de PO_4 y su acumulación en la célula en forma de polifosfatos se atribuyeron a una sobrecompensación de las microalgas después de que fueron mantenidas en un estado

de limitación de PO_4 (Aitchison y Butt, 1973; Chopin *et al.*, 1997). Mientras Eixler *et al.*, (2006), mencionaron que el consumo de PO_4 y la acumulación de polifosfatos se puede llevar cabo mediante un “consumo de lujo”, el cual no requiere que las microalgas hayan estado limitadas de PO_4 .

Los aumentos en las concentraciones de PO_4 en los 3 tratamientos fueron atribuidos a las diluciones, debido a que el efluente utilizado mantuvo concentraciones que no son eliminadas en el proceso de biofiltración. Las eficiencias de remoción obtenidas en nuestro bioensayo con *C. vulgaris* (68.4%) y *S. obliquus* (91.2) fueron similares a las reportadas para *P. bohneri* (82 %) en efluentes provenientes de cultivo de trucha arcoíris (Dumas, 1998). Los trabajos de Andrade *et al.*, (2009) y Xin *et al.*, (2010) reportaron eficiencias de remoción con *S. obliquus* y *Scenedesmus* sp. entre 77 y 76 % en efluentes sintéticos.

5.4.6. Alcalinidad (CaCO_3)

La alcalinidad registró un incremento de 30 a 90 mg/l de CaCO_3 en el bioensayo en los cultivos de *C. vulgaris* y *S. obliquus*. En el control, la alcalinidad se mantuvo por debajo de los 30 mg/l durante los 14 días. En la mayoría de los estudios pocas veces se habla de la dinámica del CaCO_3 (y por ende del sistema CO_2 -carbonatos) en los tratamientos de efluentes con microalgas. El aumento en la alcalinidad se debió al consumo de NO_3 que era la mayor fuente de nitrógeno disponible en el efluente. El aumento en la alcalinidad fue reportado por Stumm y Morgan (1996), quienes explicaron la estequiometría del consumo de los efluentes de nitrógeno en sistemas fotoautotróficos. En los sistemas fotoautotróficos el consumo de 1 g de NAT requiere 3.13 g de alcalinidad, mientras que el consumo de 1 g de NO_3 produce 4.02 g de alcalinidad. Esto explica el aumento en los cultivos con *C. vulgaris* y *S. obliquus*, mientras que en el control al no haber consumo de NO_3 la producción de alcalinidad permaneció estable.

5.4.7. pH

El aumento de en los valores de pH en los tratamientos con *C. vulgaris* y *S. obliquus* durante el bioensayo se debieron al consumo de CO_2 por las microalgas al usarlo como

una fuente de carbono inorgánicos. El consumo de CO_2 implica la disminución de los iones HCO_3^{-1} y ion H^+ , lo que genera un aumento en la concentración de los iones CO_3^{-2} y OH^- aumentando el pH. En contraste, los valores registrados en el control se mantuvieron por debajo de 8, esto se debe al nulo consumo de CO_2 para actividad fotosintética, al ser un tratamiento sin inóculo de microalgas. El pH en los tratamientos con *C. vulgaris* y *S. obliquus* presentaron un comportamiento similar al registrado en estanques de estabilización en el tratamientos de efluentes con microalgas (*Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. y *Spirulina máxima*) los cuales se asocian a la productividad algal (Syrett, 1981). Los aumentos en el día son resultado de la disminución H^+ y a que las microalgas no consumen todas las fuentes de carbono inorgánico disuelto (Feachem *et al.*, 1983; García *et al.*, 2000; Olguín *et al.*, 2003; Craggs, 2005; Heubeck *et al.*, 2007).

5.5. Conclusiones

- La especie *C. vulgaris* presentó una baja capacidad de crecimiento en efluentes no clorados en sistemas estáticos (experimento I). Esta capacidad fue mayor en *S. obliquus* resistiendo las condiciones de estrés ocasionadas por la naturaleza del efluente de SRA.
- En los cultivos semicontinuos con *C. vulgaris*, el crecimiento fue afectado por las condiciones de estrés ocasionadas por la naturaleza del efluente y las diluciones, causando la caída del cultivo al día 12.
- En los efluentes provenientes de un SRA el principal compuesto nitrogenado se registró en forma de NO_3 y no como NAT.
- Durante los días de bioensayo del experimento I y II, se determinó que la dinámica de los compuestos nitrogenados (NAT, NO_2 y NO_3) en los efluentes no clorados se debió al proceso de nitrificación.
- En la dinámica de nutrientes se observó que la ausencia de NAT provocó que las microalgas llevaran a cabo un consumo obligado de NO_3 .

- El consumo de PO_4 (> 60 %) se pudo llevar a cabo con *C. vulgaris* y *S. obliquus* en sistemas estáticos (experimento I). En los sistemas semicontinuos (experimento II) el consumo fue menor debido a la disminución constante de la densidad celular en los cultivos por efecto de la dilución.
- La composición proximal se caracterizó por una mayor producción de lípidos en *C. vulgaris* (35.9 ±14) que en *S. obliquus* (18 % ±5.1). En carbohidratos fue de 10.7 % ±4.1 (*C. vulgaris*) y 11.7 % ±2 (*S. obliquus*). El contenido de proteínas fue menor en *C. vulgaris* (26.3 % ±7) que en *S. obliquus* (38.7 % ±5).

5.6. Recomendaciones

- Utilizar en los sistemas de cultivos estáticos (experimento I) un control (efluente crudo) sin inóculo, para evaluar la dinámica de nutrientes sin la adición de microalgas.
- Determinar la concentración de carbono orgánico disuelto en los efluentes crudos utilizados para evaluar el efecto en el crecimiento microalgal.
- Medir la turbidez de los efluentes crudos y el sintético, para llevar a cabo la evaluación del efecto en el crecimiento celular.
- Registrar la temperatura a través de un datalogger, en el tratamiento de efluentes en condiciones no controladas.
- Determinar el tiempo y el porcentaje de dilución óptimo para cada especie en los cultivos semicontinuos.
- Considerar el uso de nuevo inóculo en los cultivos semicontinuos (experimento II) para evitar la disminución celular con respecto al tiempo por efecto de las diluciones.
- Realizar bioensayos de cultivos mixtos en sistemas estáticos y semicontinuos para evaluar el crecimiento microalgal y la eficiencia de remoción de *C. vulgaris* y *S. obliquus* cuando son cultivadas juntas.

Lista de referencias

- Adams, V. D. (1989). Water and wastewater examination manual. CRC Press. pp. 247.
- Aitchison, P. A., and Butt, V. S. (1973). The relation between the synthesis of inorganic polyphosphate and phosphate uptake by *Chlorella vulgaris*. Journal of Experimental Botany, 24(3), 497-510.
- Alvarez Torres, P., Ramírez Martínez, C. y Orbe Mendoza, A. (1999). Desarrollo de la Acuicultura en México y Perspectivas de la Acuicultura Rural. México. Reporte, Dirección General de Investigación en Acuicultura-SEMARNAP.
- APHA. American Public Health Association. Water Environment Federation (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater.
- Andrade R.C.E., Alexandra L., Vera B., Ever D., Morales A. y C.H. Cárdenas. (2009). Biomass production of microalga *Scenedesmus* sp. with wastewater from fishery. Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería. Universidad del Zulia. 32(2), 126-14.
- Armbrust, E.V. (2004). The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*, evolution, and metabolism. Science 306(5693), 79-86.
- Aslan, S., and Kapdan, I. K. (2006). Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. Ecological Engineering, 28(1), 64-70.
- Attasat, S., Wanichpongpan, P. and Ruenglerpanyakul, W. (2012). Cultivation of microalgae (*Oscillatoria okeni* and *Chlorella vulgaris*) using tilapia-pond effluent and a comparison of their biomass removal efficiency. Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research, 67(2), 271-277.
- Avault, J. W. (1996). Fundamentals of aquaculture. A Step by Step Guide to Commercial Aquaculture. AVA Publ. Baton Rouge.
- Avilés Quevedo, S., y Vásquez Hurtado, M. (2006). Fortalezas y debilidades de la acuicultura en México. En: P. Guzmán Anaya y D.F. Fuentes Castellanos. (Eds.). Pesca, Acuicultura e Investigación en México. México. Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria.
- Becker, E. W. (1994). Microalgae: biotechnology and microbiology (Vol. 10). Cambridge University Press.
- Benjamas, C., Sorawit, P. and Piamsak, M. (2003). Water quality control using *Spirulina platensis* in shrimp culture tanks. Aquaculture 220, 355-366.
- Bernal, T. (2007). Comisión Nacional del Agua. 2007. Estadísticas del Agua en México.
- Beveridge, M. C. (1984). Cage and pen fish farming: carrying capacity models and environmental impact (No. 255-259). Food & Agriculture Org.

- Bhaya, D., Schwarz, R., and Grossman, A. R. (2002). Molecular responses to environmental stress. In *The ecology of cyanobacteria* (pp. 397-442). Springer Netherlands.
- Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911-917.
- Borowitzka, M. A., and Borowitzka, L. J. (1988). *Micro-algal biotechnology*. Cambridge University Press.
- Calzada, J. F., Zabala, J., González, J. G., and Pineda, R. (1991). Combined biological wastewater treatment anaerobic digestion and algal growth. In *Paper Preprints, Sixth International Symposium on Anaerobic Digestion* (pp. 12-16).
- Cañizares, R. O., Rivas, L., Montes, C., Dominguez, A. R., Travieso, L., and Benitez, F. (1994). Aerated swine-wastewater treatment with K-carrageenan-immobilized *Spirulina maxima*. *Bioresource technology*, 47(1), 89-91.
- Cannons, A. C., and Pendleton, L. C. (1994). Possible role for mRNA stability in the ammonium-controlled regulation of nitrate reductase expression. *Biochem. J*, 297, 561-565.
- Chevalier, P., and De la Noüe, J. (1985). Efficiency of immobilized hyperconcentrated algae for ammonium and orthophosphate removal from wastewaters. *Biotechnology letters*, 7(6), 395-400.
- Chopin, T., Lehmal, H., and Halcrow, K. (1997). Polyphosphates in the red macroalga *Chondrus crispus* (Rhodophyceae). *New phytologist*, 135(4), 587-594.
- Colak, O., and Kaya, Z., (1998). A study on the possibilities of biological wastewater treatment using algae. *Doga Biyoli Serisi* 12 (1), 18-29.
- Cooksey, K. E., Guckert, J. B., Williams, S. A., & Callis, P. R. (1987). Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile Red. *Journal of Microbiological Methods*, 6(6), 333-345.
- Crab, R., Avnimelech, Y., Defoirdt, T., Bossier, P., and Verstraete, W. (2007). Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture*, 270(1), 1-14.
- Craggs, R. J. (2005). *Advanced integrated wastewater ponds. Pond treatment technology*. IWA scientific and technical report series. IWA, London, pp. 282-310.
- Cruz-Fraga, C.E. (2003). *Uso de la cyanobacteria *Arthrospira maxima* para remover macronutrientes de efluentes producidos por cultivos*. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. pp.83
- De la Noue, J., and de Pauw, N. (1988). The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae. *Biotechnology advances*, 6(4), 725-770.

- De la Noüe, J., and Proulx, D. (1988). Biological tertiary treatment of urban wastewaters with chitosan-immobilized *Phormidium*. *Applied microbiology and biotechnology*, 29(2-3), 292-297.
- De la Noüe, J., Laliberté, G., and Proulx, D. (1992). Algae and waste water. *Journal of applied phycology*, 4(3), 247-254.
- De la Noüe, J., Lessard, P., and Proulx, D. (1993). Tertiary treatment of secondarily treated urban wastewater by intensive culture of *Phormidium bohneri*. *Environ. Technol*, 15, 449-458.
- Di Martino Rigano, V., Vona, V., Esposito, S., Carillo, P., Carfagna, S., and Rigano, C. (1998). The physiological significance of light and dark NH₄⁺ metabolism in *Chlorella sorokiniana*. *Phytochemistry*, 47(2), 177-181.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P., and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- Dumas, A., Laliberte, G., Lessard, P., and De La Noüe, J. (1998). Biotreatment of fish farm effluents using the cyanobacterium *Phormidium bohneri*. *Aquacultural Engineering*, 17(1), 57-68.
- Dvir, O., van Rijn, J., and Neori, A. (1999). Nitrogen transformations and factors leading to nitrite accumulation in a hypertrophic marine fish culture system. *Marine ecology. Progress series*, 181, 97-106.
- Eixler, S., Karsten, U., and Selig, U. (2006). Phosphorus storage in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) cells and its dependence on phosphate supply. *Phycologia*, 45(1), 53-60.
- FAO. (2012). El estado mundial de la pesca y la acuicultura (SOFIA). FAO Departamento de Pesca y Acuicultura.
- Feachem, R., Mara, D. D., and Bradley, D. J. (1983). *Sanitation and disease*. John Wiley and Sons.
- Fitzsimmons, K. (2000). *Tilapia aquaculture in Mexico*. *Tilapia aquaculture in the Americas*, 2, 171-183.
- Flores-Páez, L. (2012). *Microalgas inmovilizadas con distintos tipos de recubrimiento para su potencial uso en la remoción de nutrientes en efluentes de cultivos acuícolas*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California México. p. 91.
- Ganuja, E., Anderson, A. J., and Ratledge, C. (2008). High-cell-density cultivation of *Schizochytrium* sp. in an ammonium/pH-auxostat fed-batch system. *Biotechnology letters*, 30(9), 1559-1564.
- Garcia, J., Mujeriego, R., and Hernandez-Marine, M. (2000). High rate algal pond operating strategies for urban wastewater nitrogen removal. *Journal of Applied Phycology*, 12(3-5), 331-339.

- Gonzalez, L. E., Cañizares, R. O., and Baena, S. (1997). Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresource Technology*, 60(3), 259-262.
- Granum, E., Kirkvold, S. y Myklestad, S.M. (2002). Cellular and extracellular production of carbohydrates and amino acids by the marine diatom *Skeletonema costatum*: diel variations and effects of N depletion. *Marine Ecology and Progress Series*, 242: 83-94.
- Guillard, R. R., and Ryther, J. H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Husted, and *Detonula confervacea* (Cleve) Grun. *Canadian journal of microbiology*, 8(2), 229-239.
- Guo, Z., Liu, Y., Guo, H., Yan, S., and Mu, J. (2013). Microalgae cultivation using an aquaculture wastewater as growth medium for biomass and biofuel production. *Journal of Environmental Sciences*, 25, S85-S88.
- Hagopian, D. S., and Riley, J. G. (1998). A closer look at the bacteriology of nitrification. *Aquacultural engineering*, 18(4), 223-244.
- Hall, D. O., and Rao, K. K. (1999). *Photosynthesis*. (6th ed). Cambridge University Press. pp. 214.
- Henze, M. (Ed.). (2002). *Wastewater treatment: biological and chemical processes*. Springer. pp. 428.
- Hernandez-Caraballo, E. A., and M Marcó-Parra, L. (2003). Direct analysis of blood serum by total reflection X-ray fluorescence spectrometry and application of an artificial neural network approach for cancer diagnosis. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 58(12), 2205-2213.
- Heubeck, S., Craggs, R., and Shilton, A. (2007). Influence of CO₂ scrubbing from biogas on the treatment performance of a high rate algal pond. *Water Science & Technology*, 55(11), 193-200.
- Illman, A. M., Scragg, A. H., and Shales, S. W. (2000). Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and microbial technology*, 27(8), 631-635.
- Kang, C. D., An, J. Y., Park, T. H., and Sim, S. J. (2006). Astaxanthin biosynthesis from simultaneous N and P uptake by the green alga *Haematococcus pluvialis* in primary-treated wastewater. *Biochemical engineering journal*, 31(3), 234-238.
- Kaplan, D., Richmond, A. E., Dubinsky, Z., and Aaronson, S. (1986). Algal nutrition. *Handbook of microalgal mass culture*, pp.147-198.
- Kong, Q. X., Li, L., Martinez, B., Chen, P., and Ruan, R. (2010). Culture of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in wastewater for biomass feedstock production. *Applied biochemistry and Biotechnology*, 160(1), 9-18.

- Khozin-Goldberg, I., and Cohen, Z. (2006). The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry*, 67(7), 696-701.
- Laliberte, G., Lessard, P., De La Noüe, J., and Sylvestre, S. (1997). Effect of phosphorus addition on nutrient removal from wastewater with the cyanobacterium *Phormidium bohneri*. *Bioresource technology*, 59(2), 227-233.
- Larsdotter, K. (2006). Wastewater treatment with microalgae-a literature review. *Vatten*, 62(1), 31.
- Lau, P. S., Tam, N. F. Y., and Wong, Y. S. (1996). Wastewater nutrients removal by *Chlorella vulgaris*: optimization through acclimation. *Environmental technology*, 17(2), 183-189.
- Lee, K., and Lee, C. G. (2001). Effect of light/dark cycles on wastewater treatments by microalgae. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 6(3), 194-199.
- Lefebvre, S., Hussenot, J., and Brossard, N. (1996). Water treatment of land-based fish farm effluents by outdoor culture of marine diatoms. *Journal of Applied phycology*, 8(3), 193-200.
- Lekang, O. I. (2007). *Aquaculture engineering*. UK. Blakwell Publishing Ltd, pp. 340.
- Li, Y., Chen, Y. F., Chen, P., Min, M., Zhou, W., Martinez, B., and Ruan, R. (2011). Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. *Bioresource technology*, 102(8), 5138-5144.
- Lin, C. K., Jaiyen, K., and Muthuwan, V. (1989). Integration of intensive and semi-intensive aquaculture: Concept and example. *Thai Fisheries Gazette*, 43, 425-430.
- Losordo, T. M., Masser, M. P., and Rakocy, J. (1998). Recirculating aquaculture tank production systems. An overview of critical considerations. SRAC, USDA, USA.
- Maestrini, S. Y., Robert, J. M., Leftley, J. W., and Collos, Y. (1986). Ammonium thresholds for simultaneous uptake of ammonium and nitrate by oyster-pond algae. *Journal of experimental marine Biology and Ecology*, 102(1), 75-98.
- Mallick, N. (2002). Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review. *Biometals*, 15(4), 377-390.
- Malone, R. F., Chitta, B. S., and Drennan, D. G. (1993). Optimizing nitrification in bead filters for warmwater recirculating aquaculture systems. *Techniques for Modern Aquaculture*. American Society Aquaculture Engineering, St. Joseph, MI, 315-325.
- Masser, M. P., Rakocy, J., and Losordo, T. M. (1999). Recirculating aquaculture tank production systems. Management of recirculating systems. SRAC Publication, pp. 452.

- Mata, T. M., Melo, A. C., Simões, M., and Caetano, N. S. (2012). Parametric study of a brewery effluent treatment by microalgae *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource technology*, 107, 151-158.
- Metcalf, L., Eddy, H. P., and Tchobanoglous, G. (1972). *Wastewater engineering: treatment, disposal, and reuse*. McGraw-Hill.
- Miranda-Baeza, A. (2002). La acuicultura y su entorno: productivo, ambiental, socioeconómico y normativo. Tesina de doctorado. Centro de investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México. pp. 75.
- Mohamed, N.A., (1994). Application of algal ponds wastewater treatment and algal production. M.Sc. Thesis, Fac.of Sci. (Cairo Univ.) Bani-Sweef Branch.
- Morris, I. (1974). Nitrogen assimilation and protein synthesis. *Algal physiology and biochemistry*, 10, 583-609.
- Oh-Hama, T., Miyachi, S., Chlorella, B. M., and Borowitzka, L. J. (1992). Micro-algae biotechnology. pp. 3-26.
- Olguín, E. J., Galicia, S., Mercado, G., and Pérez, T. (2003). Annual productivity of *Spirulina (Arthrospira)* and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions. *Journal of Applied Phycology*, 15(2-3), 249-257.
- Oswald, W. J. (1998). Micro-algae and wastewater treatment. En: *Micro-algal Biotechnology* (Borowitzka, M.A. and Borowitzka L. J., eds.). Cambridge University Press, New York. pp. 305-328.
- Oswald, W. J., and Golueke, C. G. (1960). Biological transformation of solar energy. *Advances in applied microbiology*, 2, 223-262.
- Palmer, C. M. (1969). A composite rating of algae tolerating organic pollution. *Journal of Phycology*, 5(1), 78-82.
- Pande, S.V., R.P. Khan y T.A. Venikitasubramanian. (1963). Microdetermination of lipids and serum total fatty acid. *Analytical Biochemistry*. 6:415-423.
- Park, J., and Craggs, R. (2010). Wastewater treatment and algal production in high rate algal ponds with carbon dioxide addition.
- Peng YJ, Li C, Zhang DW (2011) Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. *Bioresour Technol* 102(1),101-105
- Piedrahita, R. H. (2003). Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. *Aquaculture*, 226(1), 35-44.
- Pillay, T. V. R., and Kutty, M. N. (2005). *Aquaculture: principles and practices* (2a. ed.). Blackwell publishing. pp. 624.

- Pires, J. C. M., Alvim-Ferraz, M. C. M., Martins, F. G., and Simões, M. (2013). Wastewater treatment to enhance the economic viability of microalgae culture. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(8), 5096-5105.
- Ponce Palafox, J. T., Romero Cruz, O., Castillo Vargasmachuca, S., Arteaga Nochebuena, P., Ulloa García, M., González Sala, R., & Esparza Leal, H. (2006). El desarrollo sostenible de la acuicultura en América Latina. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*, 7(07).
- Prins, H. B. A., and Elzenga, J. T. M. (1989). Bicarbonate utilization: function and mechanism. *Aquatic Botany*, 34(1), 59-83.
- Rasoul-Amini, S., Montazeri-Najafabady, N., Shaker, S., Safari, A., Kazemi, A., Mousavi, P., and Ghasemi, Y. (2014). Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae free cells in bath culture system. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(2), 126-131.
- Reyes, J.C., S. Chávez, M.I. Muro-Pastor, P. Candau y F.J. Florencio. 1993. Effect of glucose utilization on nitrite excretion by the intracelular cyanobacterium *Synechocistis* sp. Strain PCC 6803. *Applied and Environmental Microbiology* 59(9), 3161-3163.
- Riaño, B., Molinuevo, B., and García-González, M. C. (2011). Treatment of fish processing wastewater with microalgae-containing microbiota. *Bioresource technology*, 102(23), 10829-10833.
- Richmond, A. (1986). Microalgae of economic potential. *Handbook of microalgal mass culture*, 199-243.
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., & Tredici, M. R. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low- cost photobioreactor. *Biotechnology and bioengineering*, 102(1), 100-112.
- Ruiz-Marin, A., Mendoza-Espinosa, L. G., and Stephenson, T. (2010). Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology*. 101(1), 58-64.
- Serodes, J. B., Waligora, J. J., and De la Noüe, J. (1986). Traitement tertiaire des eaux usees domestiques por microalgues. In *Comptes-Rendus 9 symposium sur le traitement des eaux usees au Canada* pp. 11-12.
- Singh, G., and Thomas, P. B. (2012). Nutrient removal from membrane bioreactor permeate using microalgae and in a microalgae membrane photoreactor. *Bioresource technology*, 117, 80-85.
- Sorokin, C. (1973). Dry weight, packed cell volume and optical density. *Handbook of phycological methods: Culture methods and growth measurements*, 321-343.
- Stumm, W., and Morgan, J. J. (1996). *Aquatic chemistry: Chemical equilibria and rates in natural waters*, JohnWiley and Sons. Inc., New York, pp. 1022.

- Su HY, Zhang YL, Zhang CM, Zhou XF, Li JP. (2011). Cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* in soybean processing wastewater. *Bioresour Technol* 102(21):9884-9890
- Sugiura, S. H., Marchant, D. D., Kelsey, K., Wiggins, T., and Ferraris, R. P. (2006). Effluent profile of commercially used low-phosphorus fish feeds. *Environmental pollution*, 140(1), 95-101.
- Sydney, E. B., Da Silva, T. E., Tokarski, A., Novak, A. C., De Carvalho, J. C., Woiciechowski, A. L., ... and Soccol, C. R. (2011). Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. *Applied Energy*, 88(10), 3291-3294.
- Syrett, P. J. (1981). Nitrogen metabolism of microalgae. *Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences*.
- Tillet, D.M. (1988). Lipid productivity and species competition in laboratory models of algae mass culture. Ph.D: Thesis: The School of Chemical Engineering. Georgia Institute of Technology.
- Timmons, M. B., and Ebeling, J. M. (2010). *Recirculating Aquaculture Cayuga Aquaculture Ventures*. Ithaca, NY, USA.
- Timmons, M.B., Ebeling, J.M., Wheaton, F.W., Summerfelt, S.T., and Vinvi, B.J. (2002) *Recirculating aquaculture systems*. (2a. ed.). Ithaca, NY, USA. Cayuga Aqua Ventures.
- Timmons, M. B., and Losordo, T. M. (1994). *Aquaculture water reuse systems: engineering design and management*. Elsevier Science Publishers.
- Voltolina, D., Cordero, B., Nieves, M., and Soto, L. P. (1999). Growth of *Scenedesmus* sp. in artificial wastewater. *Bioresource technology*, 68(3), 265-268.
- Wang, B., and Len, C. Q. (2011). Biomass production and nitrogen and phosphorus removal by the green alga *Neochloris oleoabundans* in simulated wastewater and secondary municipal wastewater effluent. *Bioresource technology*, 102(10), 5639-5644.
- White, J.N.C. (1987). Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*. 60:231-241.
- Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., and Ying-xue, S. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*, 101(14), 5494-5500.
- Yun, Y. S., Lee, S. B., Park, J. M., Lee, C. I., and Yang, J. W. (1997). Carbon dioxide fixation by algal cultivation using wastewater nutrients. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 69(4), 451-455.
- Zar, J. H. (1984). *Biostatistical analysis*. (2a. ed.). Prentice Hall USA.