



Universidad del Bío-Bío
Facultad de Ingeniería
Departamento de Ingeniería en Maderas
Escuela Ingeniería Civil Química



ESTANDARIZACIÓN DE INÓCULO PARA LA PUESTA EN MARCHA DE UNA PLANTA DE DEPURACIÓN EMPRESA FDM

Informe de Habilitación Profesional presentado en conformidad a los requisitos para obtener el título de Ingeniero Civil Químico

GIORDANO MIGUEL MUÑOZ VALDEBENITO

Profesor Tutor: Dra. Paola Bustos Gutiérrez

Ingeniero Supervisor: Sergio Rodríguez

Concepción, (31/03/2021)

RESUMEN

Con el fin de disminuir la eutrofización causada por el desarrollo de la acuicultura se han estado desarrollando diversas tecnologías, dentro de estas destaca el uso de microalgas y bacterias desnitrificantes para el tratamiento de agua residuales, ya que poseen la capacidad de remover contaminantes y además transformarlos en un producto de mayor valor.

En este trabajo el objetivo fue estudiar el efecto en la depuración de los contaminantes, en especial del nitrato, fosfato, nitrito y amonio a diferentes concentraciones de inoculo inicial de la microalga *Tetradismus obliquus* la cual se encontraba en esferas de alginato en consorcio con bacterias desnitrificantes. También se buscó cuantificar el tiempo necesario para que las esferas perdieran sus capacidades mecánicas lo que se tradujo en la exudación de las microalgas al medio. Se utilizaron tres concentraciones de microalga, T1 ($1,5 * 10^5$ cel/mL), T2 ($5,5 * 10^5$ cel/mL) y T3 ($2,2 * 10^6$ cel/mL). En los matraces se midió diariamente la concentración celular de las microalgas en las esferas, la absorbancia del medio de cultivo y la concentración de contaminantes en el medio. Al finalizar se observó que la concentración T3 fue el tamaño de inoculo inicial en donde se obtuvieron mejores resultados, obteniendo tasas de depuración máximas de 96% de amonio, 56% fosfato, 80% nitrito y 46% nitrato. Se concluye que la microalga *Tetradismus obliquus* en consorcio con bacterias, es capaz de depurar de manera eficiente los contaminantes del agua y que la concentración inicial del inoculo es un factor importante que afecta las tasas de depuración.

ABSTRACT

In order to reduce the eutrophication caused by the development of aquaculture, several technologies have been developed, among them the use of microalgae and denitrifying bacteria for wastewater treatment, since they have the capacity to remove pollutants and transform them into a product of higher value.

The objective of this work was to study the effect on the purification of pollutants, especially nitrate, phosphate, nitrite and ammonium at different concentrations of initial inoculum of the microalgae *Tetradismus obliquus* which was in alginate spheres in consortium with denitrifying bacteria. We also sought to quantify the time necessary for the spheres to lose their mechanical capacities, which resulted in the exudation of the microalgae into the medium. Three concentrations of microalgae were used, T1 ($1,5 * 10^5$ cel/mL), T2 ($5,5 * 10^5$ cel/mL) and T3 ($2,2 * 10^6$ cel/mL). In the flasks, the cell concentration of the microalgae in the spheres, the absorbance of the culture medium and the concentration of contaminants in the medium were measured daily. At the end, it was observed that the T3 concentration was the initial inoculum size where the best results were obtained, obtaining maximum purification rates of 96% ammonium, 56% phosphate, 80% nitrite and 46% nitrate. It is concluded that the microalgae *Tetradismus obliquus* in consortium with bacteria is capable of efficiently purifying water pollutants and that the initial inoculum concentration is an important factor affecting the purification rates.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a DeNOVO por darme la oportunidad de realizar mis experimentos, aprendí mucho de todo el equipo de trabajo y definitivamente seré un mejor profesional gracias a sus consejos. Me encantaría mencionar a algunos de mis profes de la universidad como la Profesora P. Bustos, el profesor J. Saavedra, el profesor G. Reyes y el profesor C. Rojas, ya que al igual que el resto de los profesores ellos son excelentes profesionales, pero se diferencian al resto por ser excelentes personas y pedagogos y definitivamente hicieron mi estancia en la universidad mejor. Además, agradecer a mis amigos que, aunque no son muchos, siempre están ahí para ayudarme, escucharme y darme ánimos, y finalmente y más importante el más grande reconocimiento y agradecimiento para mi familia, en especial a mis padres, Teresita Erices y Placido Miguel que hoy día soy quien soy gracias a su esfuerzo y sacrificio. Padres lindos, este título se lo dedico a ustedes.

CONTENIDO

Resumen	2
Abstract	3
Agradecimientos	4
Nomenclatura	7
1. Introducción	11
2. Planteamiento situación problema	12
3 Revisión bibliográfica	13
3.1 Aguas residuales de la industria de la salmonicultura.....	13
3.2 SRA-Sistema de recirculación acuícola.....	15
3.3 Consorcio micro algal-bacteriano para la remoción de nutrientes en agua residuales.	18
3.4 Eliminación de contaminantes: Nitrógeno y fósforo	20
3.5 Uso de consorcios inmovilizados en alginato para el tratamiento de agua residuales.	22
3.6 Efectos del inóculo inicial en las microalgas	23
4. OBJETIVOS	25
4.1 Objetivo General	25
4.2 Objetivos específicos	25
5. Metodología	26
5.1 ÁREA DE INVESTIGACIÓN	26
5.2 Formulación de la propuesta de trabajo	26
5.2.1 Microalga: <i>tetrademus obliquus</i>	26
5.2.2 Bacterias	27
5.2.3 Inmovilización y conteo celular de los microorganismos.....	27
5.2.4 Condiciones de Operación y diseño experimental	28
5.2.5 Diseño experimental	30
5.2.6 Análisis.....	31
6.1 RESULTADOS	32
6.1.1 crecimiento celular	32
6.1.2 Depuración de nitrato	35
6.1.3 Depuración de nitrito	36
6.1.4 Depuración de fosfato.....	37
6.1.5 Depuración de amonio.....	38
6.1.6 Tiempo de exudación de los medios.....	40

6.2	DISCUSIÓN	41
6.2.1	Velocidad específica de crecimiento y tasas de depuración	41
6.2.2	Degradación de los medios y condiciones de operación	42
7.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	44
7.1	Recomendaciones	45
8.	REFERENCIAS	46
9.	Anexos	49
9.1	Purificación de la cepa de <i>tetrademus obliquus</i>	49
9.2	Purificación de la cepa de <i>tetrademus obliquus</i> : Parte 2	52
9.3	Curvas de calibración Amonio.....	55
9.4	Curva de calibración de Nitrato	57
9.5	Curva de calibración del nitrito.....	59
9.6	Curva de calibración del fosfato	61

NOMENCLATURA

A: Es la población máxima o logaritmos de los recuentos asintóticos cuando el tiempo se incrementa Indefinidamente.

AGV: ácidos grasos volátiles.

Amp: Ampicilina

APA: Agar de alga proteico.

APB: Caldo de alga proteico.

DBO: Demanda bioquímica de oxígeno.

FAME: Metil esteres de ácidos grasos.

Fs: Fungisona.

Lamda: tiempo de fase lag

OAF: Organismos acumuladores de fosfato.

OD: Oxígeno disuelto.

SRA: Sistema de recirculación acuícola.

TAN: Nitrógeno total disponible.

TRH: Tiempo de retención hidráulica.

TRS: Tiempo de retención de sólidos.

TSA: Agar de tripticasa de soya.

μ m: velocidad máxima de crecimiento.

Lista de figuras

Figura 1. Fotografía de branquia tomada de pez muerto en piscicultura.....	14
Figura 2. Fotografía de incrustaciones salinas presentes en branquia de pez muerto de Pangué región del Bío-Bío.....	14
Figura 3. b) sistema típico de recirculación acuícola, el cual puede variar según los requerimientos del proceso, a) pasos principales a seguir para el tratamiento de aguas residuales.....	15
Figura 4. La relación entre el pH medido y la cantidad de TAN disponible para su descomposición.....	1

Figura 5. Soporte de plásticos móviles en la imagen de la izquierda y soportes fijos en la derecha	17
Figura 6. Esquema de las interacciones entre las microalgas y las bacterias en los sistemas de tratamientos de agua residual	19
Figura 7. Fases de crecimiento de cultivo microalga, en el que los números 1,2,3,4, y 5 corresponden a las etapas de lag, exponencial, lineal, estacionaria y senescencia, y la línea punteada corresponde a la concentración de nutrientes a lo largo del tiempo.....	23
Figura 8. Fotografía microscópica de microalga <i>Tetradismus obliquus</i>	26
Figura 9. Esquema del sitio experimental.....	30
Figura 10. Curva de crecimiento micro algal con una concentración T1 (baja) inicial experimental de $1,5 * 10^5 \text{ cel/mL}$ en un periodo de tiempo y curva de crecimiento micro algal con una concentración T1 (baja) inicial de $1,5 * 10^5 \text{ cel/mL}$ predicho por el modelo de Gompertz modificado	33
Figura 11. Figura 11. Curva de crecimiento micro algal con una concentración T2 (media) inicial experimental de $5,5 * 10^5 \text{ cel/mL}$ en un periodo de tiempo y curva de crecimiento micro algal con una concentración T2 (media) inicial de $5,5 * 10^5 \text{ cel/mL}$ predicho por el modelo de Gompertz modificado	33
Figura 12. Figura 12. a) Curva de crecimiento micro algal con una concentración T3 (alta) inicial de $2,2 * 10^6 \text{ cel/mL}$, b) curva de crecimiento micro algal con una concentración T3 (alta) inicial de $2,2 * 10^6 \text{ cel/mL}$ predicho por el modelo de Gompertz modificado	34
Figura 13. Depuración de nitrato en biomédios microalgas- bacterias a lo largo del tiempo	36
Figura 14. Depuración de nitrito en biomédios microalgas- bacterias a lo largo del tiempo	37
Figura 15. Depuración de nitrato en biomédios microalgas- bacterias a lo largo del tiempo	38

Figura 16. Depuración de nitrato en biomédios microalgas- bacterias a lo largo del tiempo	39
Figura 17. Tasas de depuración a diferentes concentraciones celulares	40
Figura 18. Crecimiento de microalgas inmovilizadas a diferentes concentraciones, durante un periodo de 5 días	40
Figura 19. Cámara de bioseguridad utilizada para la purificación de la cepa	50
Figura 20 y 21 . Crecimiento en medio solido y liquido de la tetrademus obliquus.....	54
Figura 22. Placa de TSA sembrada con tetrademus obliquus luego de 7 días de cultivo	54
Figura 23. a) curva de calibración del amonio con un máximo de concentración de 9,36 mg/L y b) curva de calibración de amonio con un máximo de concentración de 1,17 mg/L...57	
Figura 24. Curva de calibración del nitrato con un máximo de concentración de 20 mg/mL.....	58
Figura 25. Curva de calibración del nitrato con un máximo de concentración de 20 mg/mL.....	60
Figura 26. Curva de calibración del fosfato con un máximo de concentración de 14 mg/mL.....	62

Lista de tablas

Tabla 1: Concentraciones máximas admisibles de nitrógeno y fosforo para descargar en Lagos de Chile, con respecto al DS90

Tabla 2. Reacciones de simbiosis entre microalgas y bacterias.

Tabla 3. Diferentes intensidades de luz a lo que están sometidos los ensayos. T1: Concentración baja, T2: Concentración media, T3: Concentración Alta, B: Blanco

Tabla 4. Parámetros cinéticos del modelo de Gompertz a diferente concentración celular.

Tabla 5. Medio Bristol utilizado en el cultivo de la *tetrademus obliquus*

Tabla 6. Cantidad añadida de muestra respectivamente a cada ensayo.

Tabla 7. Diluciones hechas a partir del estándar de 11.7 mg/L de amonio.

Tabla 8. Diluciones hechas a partir del estándar de 20 mg/L de nitrato.

Tabla 9. Diluciones hechas a partir del estándar de 20 mg/L de nitrato.

Tabla 10. Diluciones hechas a partir del estándar de 14.09 mg/L de fosfato.

1. INTRODUCCION

El rápido crecimiento de la población y la creciente industrialización ha provocado un aumento de la contaminación ambiental en todo el mundo (Miranda & Rosales, 2018). Según el departamento de pesca de la organización de la naciones unidas para la alimentación y la agricultura (FAO), en Chile una de las fuente de ingresos más importante proviene de la industria de la salmonicultura, la cual genera diversos impactos ambientales, es decir, la huella ecológica que se genera por la operación de una salmonera es del orden de $10.000 \frac{m^2}{m^2}$ (Oporto, Ibañez, Brieva, Espinoza, & Arqueros, 2000), es decir que por cada metro cuadrado usado en la producción de salmones se genera un impacto, en términos del consumo de recursos y de desechos al ambiente, equivalente a 10.000 metros cuadrados.

Entre los impactos ambientales a corto plazo se encuentran los desechos orgánicos de los peces, es decir, la orina y excrementos y los residuos de su alimentación cuyo efecto principal es la eutrofización de las aguas (Buschmann, 2001), la muerte de peces y problemas de olores, por otro lado, a largo plazo tenemos la muerte de la vida silvestre y la acumulación de desechos tóxicos (Miranda & Rosales, 2018).

Para revertir dicha contaminación existen diversas tecnologías que disminuyen la cantidad de contaminantes que se liberan al medio ambiente, en los que destacan los filtros mecánicos, y biofiltros compuestos por bacterias, que se encargan de degradar los compuestos en el agua. Dichas tecnologías poseen inconvenientes que han hecho a los investigadores enfocarse en el estudio de microalgas inmovilizadas en alginato, con el fin de remover dichos contaminantes del medio. La empresa FDM se centra en desarrollar esta tecnología formada por bacterias desnitrificantes y microalgas, y poder escalar este proceso a un nivel industrial, para esto en el presente trabajo se definió como objetivo estudiar el comportamiento de la tasa de crecimiento poblacional (μ), a diferentes concentraciones celulares del inóculo inicial, y a la vez analizar su efecto en las tasas de depuración de amonio, nitrato, nitrito y fosfato. La metodología utilizada se encuentra en la sección 5 y sus principales conclusiones y recomendaciones están en la sección 7.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El uso de consorcio microalga-bacteria ha resultado adecuado a escala de laboratorio para la depuración de aguas contaminadas, sin embargo, si se desea llevar a una mayor escala deben estudiarse variables que puedan asegurar un correcto desempeño, entre estas, el tamaño del inóculo inicial y la edad del mismo pareciera tener una gran relevancia de acuerdo a lo que señala la literatura, sin embargo, es un parámetro no estudiado aun en la empresa FDM. En general, se necesita mantener la microalga encapsulada en alginato para que de esta manera no se introduzca una nueva especie de microalga a los ecosistemas. Debido a esto se determinó que el consorcio microalga-bacteria debe ir encapsulado en una matriz de alginato, por lo que se necesita saber cuánto tiempo demora dicho biopolímero en perder sus propiedades mecánicas y comenzar a liberar (exudar) los microorganismos al medio. A su vez, se desconoce el tamaño de inóculo inicial en el que el consorcio microalga-bacteria es capaz de depurar de manera eficiente los contaminantes, por lo que se plantea un experimento capaz de determinar las tasas de depuración de este consorcio microalga-bacteria con diferente tamaño de inóculo inicial y además determinar mediante densidad óptica el momento en el que las esferas de alginato dejan de ser viables.

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 AGUAS RESIDUALES DE LA INDUSTRIA DE LA SALMONICULTURA

En la actualidad diversos estudios informan que las pisciculturas de salmón descargan concentraciones extremadamente altas de aguas residuales no tratadas , superando hasta 20 veces el límite permitido, que en Chile corresponden a 50 mg/L de nitrógeno y 10 mg/L de fosforo. Según el Fondo Mundial para la Naturaleza de Escocia, las pisciculturas de salmón allí producen desechos de nitrógeno iguales a una población humana de más de nueve millones de personas (MacGarvin, 2000). En este mismo contexto se estima que en que una piscicultura de 200.000 peces se libera:

- Nitrógeno igual a 20.000 personas.
- Fósforo igual a 25.000 personas.
- Materia fecal equivalente aproximadamente a una ciudad de 65.000 personas (Philip & Ian, 2014).

En Chile en los últimos años la conciencia medio ambiental ha ido en aumento y los estándares y normas de cuidado hacia el medio ambiente han sido cada vez más estrictas, pero aun así no llegan a ser los necesarios para evitar el impacto ecológico que generan estos residuos. El decreto N°90, establece que se pueden arrojar al medio ambiente agua residuales con concentraciones de nitrógeno de hasta 50 mg/L y de fósforo de hasta 10 mg/L (Presidencia, 2001). En la tabla 1 se presentan los resultados de un estudio de la calidad del agua de ocho lagos de la Décima Región en los que se practica la salmonicultura. Estos lagos son: Ranco (Provincia de Valdivia), Rupanco (Provincia de Osorno), Llanquihue (Provincia de Llanquihue) y Tepuhuico, Tarahuin, Cucao, Natri y Huillinco (todos en la Provincia de Chiloé). Al comparar la norma ambiental con los niveles de contaminación presentes en estos lagos, se pudo apreciar que los cinco lagos de la Provincia de Chiloé tienen exceso de contaminantes, particularmente los lagos Cucao y Huillinco, cuyos niveles de nitrógeno superan en 15 y 22 veces, respectivamente (Marcel Claude, 2000).

Tabla 1: Concentraciones máximas admisibles de nitrógeno y fosforo para descargar en Lagos de Chile, con respecto al DS90

	Ranco	Rupanco	Llanquihue	Tepuhuico	Tarahuin	Cucao	Natri	Huillinco
Fósforo	3,8	9,2	3	15,8	22,1	217,1	23,2	322,9
Nitrógeno	16	12	15	s/i	188,7	3.100,9	299,1	4.493,1
Clorofila	s/i	s/i	s/i	3,9	s/i	s/i	s/i	s/i

Por otro lado, a pesar de que las normas señalan que el máximo permitido es de 50 mg/L de nitrato, las empresas acuicultoras realizan malas prácticas en la descarga de las aguas residuales, que consiste en diluir la corriente de salida con el fin de disminuir la concentración de contaminantes en ella, entonces por ejemplo si una corriente de salida posee 100 mg/L de nitrato, lo que se hace es diluir la corriente por un factor de dos, entonces, la nueva concentración será de 50 mg/L que está dentro de la norma, y luego descargan todo el volumen de agua residual, lo que es igual de dañino. En los últimos años, grandes han sido los esfuerzos para encontrar nuevas técnicas para disminuir las concentraciones de contaminantes en las aguas, sobre todo en las pisciculturas ya que una alta concentración de nitrato y amonio provoca la muerte de los peces. En la figura 1 podemos apreciar una branquia extirpada de un pez muerto de una piscicultura en Pangue, en el que se intentaba encontrar la causa de muerte. En la Figura 2, se puede apreciar formaciones cristalinas, en las que se infiere que son debido a las grandes concentraciones de sales en el agua.

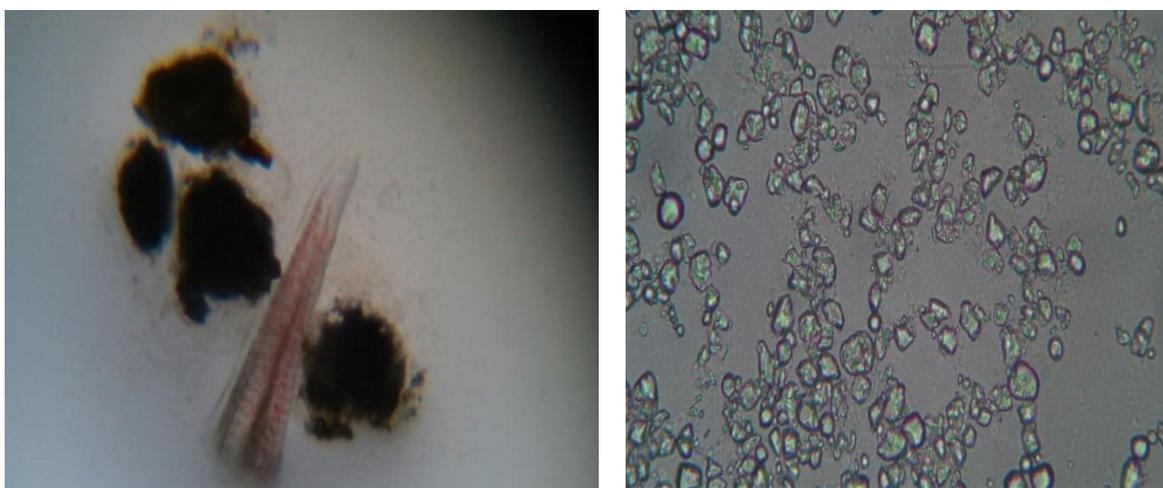


Figura 1 y 2. Fotografía de branquia tomada de pez muerto en piscicultura e incrustaciones salinas presentes en branquias de pez muertos.

3.2 SRA-SISTEMA DE RECIRCULACIÓN ACUÍCOLA.

Un sistema de recirculación acuícola es en esencia una tecnología para cultivar peces u otros organismos acuáticos reutilizando el agua en su producción. Este proceso utiliza filtros mecánicos y biológicos, y el proceso puede ser abordado en diferentes intensidades de producción dependiendo del tamaño de la planta, variando de toneladas de producción a sistemas enfocados en el abastecimiento local (Iván & Daury, 2017). Cabe mencionar que estos son tanques y similares, y es para la cría de alevines hasta unos 10 cm ya que luego se trasladan al mar. El salmón se engorda en redes de 20x20x20 m. Por eso, en estos estanques se pueden controlar los residuos fecales y exceso de alimento, en el mar es imposible, ya que el oleaje lo arrastra y luego decanta al fondo marino.

En un SRA es necesario tratar el agua constantemente con el fin de remover los desechos excretados por los peces y añadir oxígeno para mantener a los peces con vida. En general, diversas instalaciones pueden añadirse, tales como, oxigenador, luz ultravioleta, regulador de pH automático, intercambiador de calor, entre otros. dependiendo de los requerimientos del proceso. En la figura 3 podemos apreciar un sistema de tratamiento típico en un SRA en el que se hace pasar la corriente de agua por un filtro mecánico con el fin de remover la mayor cantidad de sólidos en suspensión y desechos orgánicos, usualmente se usa una tela filtrante desde los 40 a los 100 micrones.

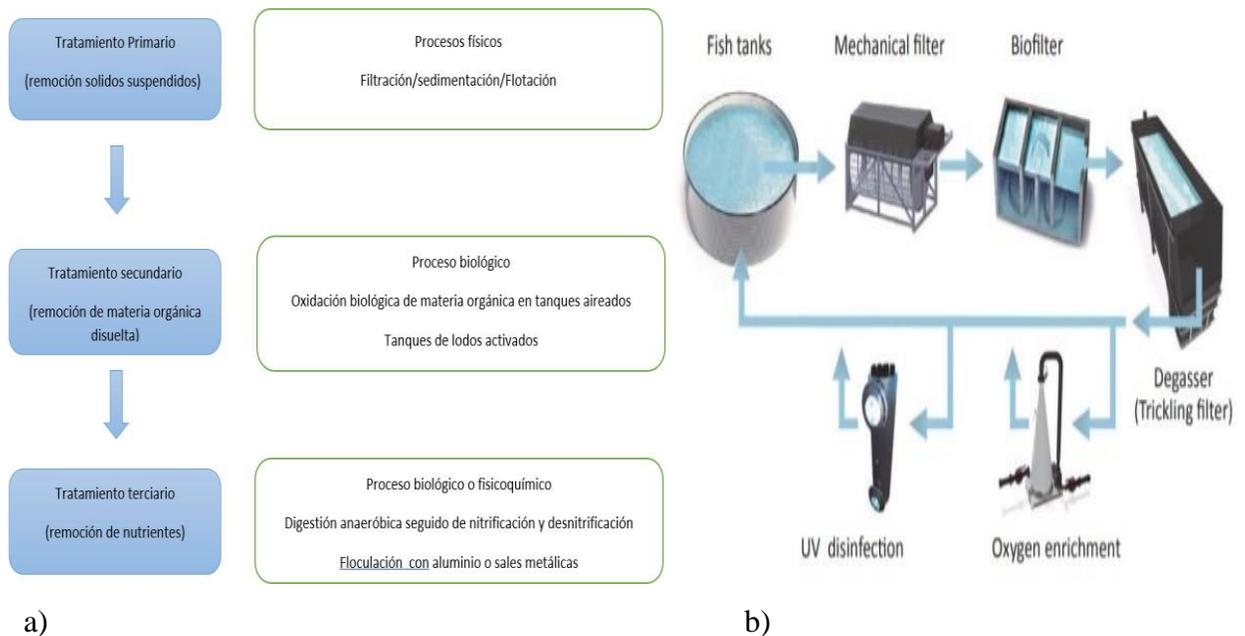


Figura 3. a) pasos principales a seguir para el tratamiento de aguas residuales b) sistema típico de recirculación acuícola, el cual puede variar según los requerimientos del proceso,

No toda la materia orgánica es capaz de ser removida por el filtro mecánico, las partículas más pequeñas de los nutrientes se transforman en compuesto disueltos que pasan a través de la tela filtrante, dichos compuestos son los nitratos en formas de amoníaco libre (NH_3), el cual es tóxico, por lo que el objetivo del biofiltro es convertir dicho amoníaco a nitrito y luego a nitrato, el cual es inofensivo. En el biofiltro el desglose de las moléculas de amoníaco a nitrato es un proceso biológico que es realizado por un consorcio bacteriano, en el que bacterias heterótrofas utilizan oxígeno y oxidan la materia orgánica transformándose en dióxido de carbono, amoníaco y lodo (Loaiza, Martinez, Carlin, & Esquivel, 2011).

En la figura 4 podemos apreciar los diferentes niveles de concentración de amoníaco (nitrato de amonio total-NAT) a diferentes pH que soportan los peces, entonces, a un pH de aproximadamente 6.8 el NAT máximo en el que pueden sobrevivir es de 10 mg/L (Feest & Briceño, 2018), cabe mencionar, que el pH se ve alterado por la orina y el excremento de los peces pero es regulado mediante la adición de una sustancia basificadora en lo posible económica, como por ejemplo el hidróxido de sodio y el cal.

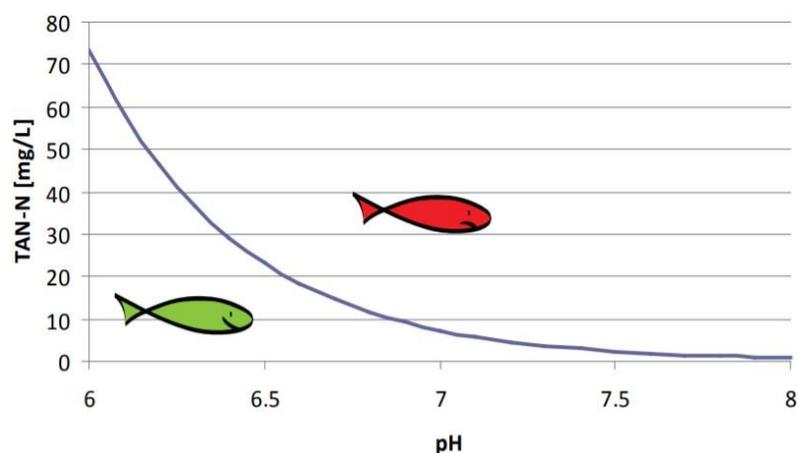


Figura 4. La relación entre el pH medido y la cantidad de NAT disponible para su descomposición.

Para que el proceso de desnitrificación en el biofiltro sea más eficiente se le añaden soportes de plásticos los cuales pueden ser móviles o fijos, variando en forma y tamaño para aumentar su área superficial, en la figura 5 se pueden apreciar soportes móviles y fijos en un biofiltro.

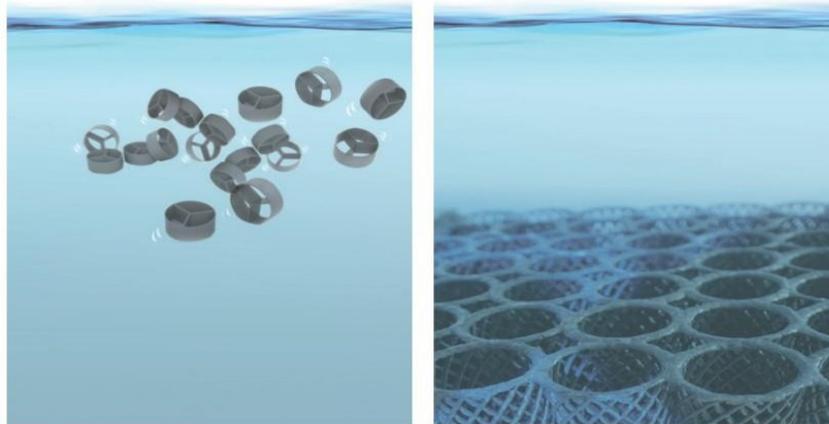


Figura 5. Soporte de plásticos móviles en la imagen de la izquierda y soportes fijos en la derecha.

Una de las principales desventajas que poseen los biofiltros, son los tiempos de espera de maduración (Loaiza, Martínez, Carlin, & Esquivel, 2011), es decir, cuando se quiere empezar a hacer funcionar un biofiltro para que el consorcio micro bacteriano sea funcional y óptimo, este se debe hacer madurar mediante la adición paulatina de amonio, este proceso puede ser de manera natural, es decir, añadiendo peces y luego sacarlos cuando se logra el nivel de amonio requerido o bien de manera química añadiendo cloruro de amonio al agua. Sea cual sea el tipo de proceso que se elija, ambos requieren de alrededor de 1 a 3 meses, dependiendo de las condiciones y requerimientos del proceso. Por otro lado, otra desventaja de los biofiltros es que las bacterias heterótrofas, las que se encargan del proceso de oxidación (remover la materia orgánica), tienen una tasa de crecimiento poblacional de 5 veces mayor que la de las bacterias nitrificantes, por lo que las bacterias heterótrofas tienen más capacidades a la hora de competir por el espacio y el oxígeno disuelto en la biopelícula, por ende, pueden llegar a inhibir la nitrificación (Su, Mennerich, & Urban, 2011)

Finalmente, el último inconveniente es el área superficial de los biomédios el cual varía dependiendo de la forma y el tamaño, que en promedio es de $600 \frac{m^2}{m^3}$ de área filtrante, por lo que al diseñar un biofiltro debemos considerar la concentración de NAT diaria y la tasa de remoción de NAT diaria. Que en conjunto con el área filtrante podemos calcular los m^3 de biomédios que necesita el biofiltro, en consecuencia, podemos inferir que a menor área filtrante mayor es el tamaño del equipo.

3.3 CONSORCIO MICRO ALGAL-BACTERIANO PARA LA REMOCIÓN DE NUTRIENTES EN AGUA RESIDUALES.

En la actualidad, diversos son las investigaciones en el que se utilizan microalgas en la remoción de nutrientes tóxicos en las aguas residuales (Tejido, Enrique, Luis, & Dominic, 2019) en los que se ha comprobado su eficiencia a la hora de ser utilizadas en SRA. Estudios realizados por Tejido-Núñez y otros (2019), comprueban la capacidad depuradora de dos diferentes cepas de microalgas en un efluente de acuicultura en donde señalan que una de las cepas depura mejor en condiciones no asépticas alcanzando tasas de remoción de hasta un 81% de nitrógeno y de un 99% de fosfato. Las microalgas además han sido objetivos de estudios por su capacidad al producir oxígeno y de remover metales pesados disueltos en el agua. Distintos autores estudiaron la capacidad de remoción de metales disueltos en el agua de una amplia gama de especies de microalgas, las cuales soportan y se adaptan a estas condiciones de estrés (Villanueva, Bocanegra, & Borja, 1999), en donde el género de *Scenedesmus* es el más ampliamente estudiado con capacidades comprobadas en la remoción de Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} y Cr^{6+} (Castro, Jeronimo, & Garcia, 2004)

Por otro lado, según literatura los biofiltros bacterianos son las principales biotecnologías empleadas en la reducción de estos contaminantes, pero el uso de estas tecnologías presenta diversas desventajas e inconvenientes, tales como tiempo de madurez del biofiltro e ineficiencia en la depuración de compuestos como el fosforo, entre otros y es en este contexto que nuevas alternativas en los procesos han llamada la atención de investigadores (Roalkvam & Dronen, 2020).

Durante las últimas décadas, numerosos trabajos han ido demostrando las ventajas que conlleva la presencia del consorcio microalgas/bacterias en determinadas áreas relacionadas con la biotecnología como es el tratamiento de agua residuales. Esto se debe a la interacciones mutualistas y simbióticas que se pueden dar entre ambos microorganismos (Subashchandrabose & Megharaj, 2011).

En esta interacción de microorganismos las microalgas proporcionan el oxígeno que necesitan las bacterias para la oxidación de materia orgánica, de esta manera se reducen los gastos asociados a la aireación en los sistemas de aguas residuales, generando una ventaja competitiva frente a tecnologías similares. En la figura 6 podemos observar las interacciones de microalgas y bacterias en el que las microalgas utilizan el amonio, fosfato, luz y CO_2 para funciones metabólicas y en el proceso como producto se obtiene O_2 , el cual es utilizada por las bacterias para oxidar la materia orgánica, como producto de este proceso, se obtiene CO_2 el cual es utilizado por las microalgas repitiendo el ciclo (Subashchandrabose & Megharaj, 2011).

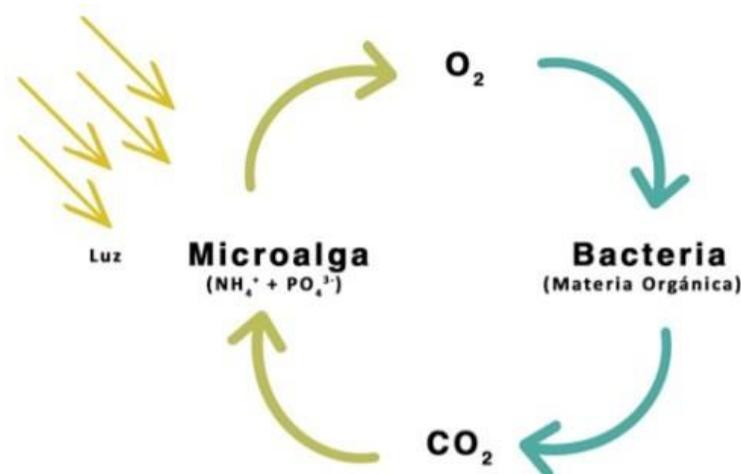


Figura 6. Esquema de las interacciones entre las microalgas y las bacterias en los sistemas de tratamientos de agua residual.

Cabe destacar que las interacciones microalga bacteria no se limitan únicamente a intercambios gaseosos de CO_2/O_2 , ya que determinadas especies de bacterias tienen la capacidad de liberar al medio factores de crecimiento y fitohormonas como las auxinas (ácido-3-indolacético) (Kazamia, Czesnick, & Nguyen, 2012) o vitaminas (biotina, tiamina o la cobalamina, B12) (Lawrence & Warren, 2014), En este contexto aquellas sustancias promueven y favorecen el crecimiento de las microalgas, además de manera inversa, las microalgas también son capaces de favorecer el crecimiento bacteriano protegiéndolos de ambientes hostiles y liberando compuestos orgánicos.

El mayor desafío de los consorcios microalgas-bacterias, son los largos tiempo de residencia hidráulica (TRH) necesarios para la remoción del nitrógeno, ya que pesar de la gran capacidad de depuración de nitrato de las microalgas son necesario los procesos de nitrificación-desnitrificación para su completa remoción (Arcilla, 2016). Como se describió anteriormente estos procesos de remoción, requieren de la presencia de bacterias nitrificantes para óptimos resultados, en donde el tiempo de residencia de solidos (TRS) necesario son de 10 días el cual es varias veces superior a los TRH que aproximadamente son de 1-3 días (Arbib, Ruiz, & Alvarez-Diaz, 2013).

3.4 ELIMINACIÓN DE CONTAMINANTES: NITRÓGENO Y FÓSFORO.

Nitrógeno

La eliminación de N es un proceso, complejo y costoso energéticamente, y por ende también económicamente, ya que requiere aplicar diversos procesos y equipos como tanques aerobios o anóxicos, sistemas de bombeo, agitación, controladores de temperatura, agitadores y controladores de pH, dependiendo de las condiciones requeridas. Para conseguir concentraciones de N que estén dentro de las normativas de legislación vigente, es necesaria una etapa de nitrificación en la que el NH_4^+ es oxidado a NO_3^- . Este proceso ocurre en 2 etapas principalmente, en la primera las bacterias del género *Nitrosomonas* convierte el NH_4^+ a NO_2^- (Reacción 1), mientras que en la segunda las bacterias del género *Nitrobacter* o *Nitrococcus*, convierten el NO_2^- en NO_3^- (Reacción 2) (Metcalf & Eddy, 2003).



Reacción 1. Reacción de la primera fase de nitrificación.



Reacción 2. Reacción de la segunda fase de nitrificación.

En la reacción general de nitrificación (Reacción 3) se puede apreciar que para oxidar un mol de NH_4^+ se necesitan dos moles de oxígeno. Por tanto, esto significa que la falta de oxígeno disuelto podría producir una inhibición en la nitrificación (Metcalf & Eddy, 2003).



Reacción 3. Reacción general de nitrificación

Por otro lado, la desnitrificación ocurre en condiciones de anoxia, es decir, condiciones en las que el oxígeno disuelto está casi agotado. en el que el NO_3^- se convierte en N_2 . Las bacterias encargadas de dicho proceso son heterótrofas, del género *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Hypomicrobium*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Paracoccus*, y *Propionibacterium*, entre otros (Metcalf & Eddy, 2003).

Fósforo

Los métodos más empleados para la eliminación de fósforo son mediante la precipitación química, siendo necesarios cationes Ca^{2+} , Al^{3+} y Fe^{3+} , pero presentan diversos inconvenientes especialmente en el aumento de costos asociados a productos químicos. Para evitar dichos problemas en la actualidad existen técnicas de eliminación biológicas. Los organismos encargados de la asimilación del fosfato se denominan organismos acumuladores de fosfato (OAF), los cuales consumen ácidos grasos volátiles (AGV) y en este mismo proceso acumulan P eliminándolo del medio. Cabe mencionar que la eliminación de P depende de la relación DBO:P, en donde, estudios demuestran que razones superiores a 20 permiten alcanzar concentración de efluentes de 1 mg/L de P (Metcalf & Eddy, 2003). En la tabla 2, podemos observar las diferentes reacciones químicas presentes en el consorcio microbiano-algal usados en el tratamiento de agua residuales.

Tabla 2. Reacciones de simbiosis entre microalgas y bacterias.

Reacciones basadas en el consorcio microalga-bacteria	Proceso biológico
$CO_2 + H_2O + NH_4^+ + PO_4^{3-} \rightarrow$ Biomasa microalgal + O_2	Fotosíntesis
$NO_3^- + 4H_2O \rightarrow NH_4^+ + 7OH^-$	Reducción de nitrato
$DBO + O_2 +$ Nutrientes \rightarrow Biomasa bacterial + CO_2	
$NH_4^+ + 2 O_2 \rightarrow NO_3^- + 2H^+ + H_2O$	Nitrificación
$8NO_3^- + 5CH_3COOH \rightarrow 8HCO_3^- + 6H_2O + 2CO_2 + 4N_2$	Desnitrificación

3.5 USO DE CONSORCIOS INMOVILIZADOS EN ALGINATO PARA EL TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUALES.

La biomasa del alga no puede ser usada directamente en un proceso de tratamiento de agua residuales. Esto debido a que la biomasa del proceso es muy difícil de separar del efluente de agua. Sin embargo, la biomasa inmovilizada dentro de una matriz inerte, posee la ventaja de que puede lograr altas tasas de flujos con mínimas obstrucciones en las columnas y se pueden obtener altas cargas de biomasa separadas de la fase líquida (Nussinovitch, 2010). La inmovilización celular se define como la confinación o localización física de células intactas a una región espacial definida en el biorreactor con la preservación de la deseada actividad catalítica (Cruz & Bashan, 2013).

Las principales ventajas de la inmovilización de las células fueron estudiadas por Karel y otros (1985), las cuales son:

- Incrementar la concentración celular y la productividad volumétrica.
- Aumentar la estabilidad biológica
- Incrementar la concentración del producto en el medio de cultivo
- Reducir la concentración de sustrato en el medio de cultivo.
- Ventajas por la proximidad entre células.
- Separación de celular del medio y fácil recuperación del producto.

Para la inmovilización de la biomasa, la matriz puede ser natural, ya sea agar, alginato o carragenina o sintética, como el gel de sílice, poliuretanos o poliacrilamida. Los polímeros naturales son ampliamente más utilizados que los sintéticos debido a su baja toxicidad, en el que destaca el uso del alginato de calcio para la inmovilización de microalgas y otros tipos de microorganismos (karel, Libicki, & Robertson, 1985). El alginato es extraído de un alga en forma de sal de sodio soluble en agua. Cuando se une con el calcio, este reemplaza al sodio, produciendo un enlace iónico entre los grupos de ácido carboxílico dando como resultado una sustancia gelatinosa.

Cabe señalar que las esferas de alginatos son vulnerables a pH tanto bajos como altos, y se mantienen estables cuando el pH del medio en que se encuentran es de alrededor de 5 a 9, por lo que tratamientos de efluentes altamente ácidos pueden resultar en una pérdida de la biomasa. Es importante

mencionar que diversos estudios realizados con diferentes cepas de microalgas, han demostrado las capacidades de depurar metales pesados como el cobre, cobalto, cadmio, entre otros (Castro, Jeronimo, & Garcia, 2004), teniendo aún mejores resultados cuando son inmovilizadas en alginato, demostrando capacidades de biosorción de metales (Gao, Guo, & Hao, 2020).

3.6 EFECTOS DEL INÓCULO INICIAL EN LAS MICROALGAS

La fase de adaptación o lag, es la primera etapa que los microorganismos presentan, y es donde la tasa de crecimiento poblacional es significativamente menor que la fase exponencial, esto se debe a diferentes factores, tales como, la edad del inóculo, es decir, si este proviene de una fase estacionaria, la fase lag será más larga. En fase lag los contenidos de coenzimas y enzimas biosintéticas son bajos, por lo que las células deben reponerlas en este nuevo medio (Bohutskyi, Kligerman, Byers, & Nasr, 2016). Otro factor importante es el tamaño del inóculo inicial, ya que una baja concentración celular implica un ajuste fisiológico mayor, en el que además se debe considerar que el inóculo puede poseer células no viables provenientes usualmente de la fase lag o de la senescencia, debido a que la edad fisiológica de la célula afecta su capacidad de multiplicación (Cheng, Wang, Osei-Wusu, & Liu, 2018). En la Figura 7 podemos apreciar las fases típicas de cinéticas de crecimiento y la concentración de nutrientes en función al tiempo, en un sistema de cultivo de microalgas batch.

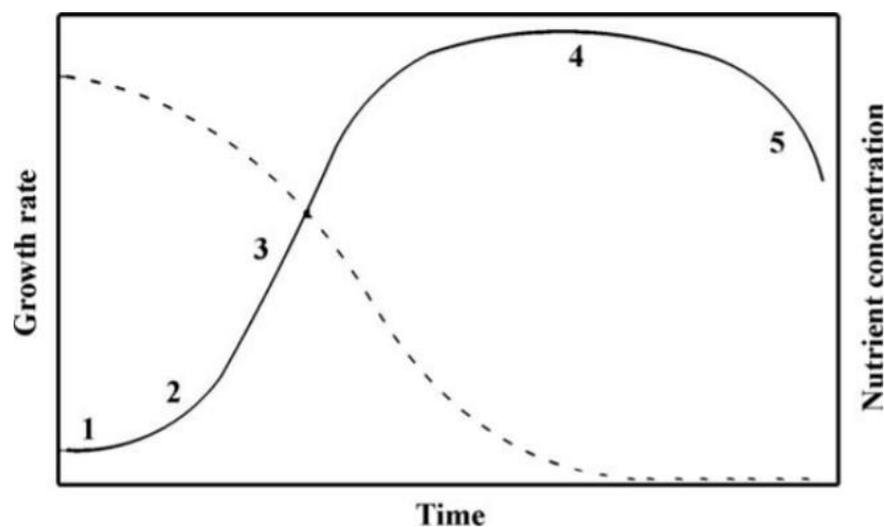


Figura 7. Fases de crecimiento de cultivo micro algal, en el que los números 1,2,3,4, y 5 corresponden a las etapas de lag, exponencial, lineal, estacionaria y senescencia, y la línea punteada corresponde a la concentración de nutrientes a lo largo del tiempo.

Estudios realizados por Bohutskyi y otros (2016), demuestran que diferentes concentraciones de inóculos obtenidos en su fase exponencial influyen en la densidad de la biomasa y en la obtención de productos, en el que $2,5 * 10^5$ cel/mL fue la concentración más favorable para la producción de Metil Ésteres de ácidos grasos (FAME) (Bohutskyi, Kligerman, Byers, & Nasr, 2016). Por otro lado, Cheng y otros (2018), realizaron estudios relacionados a la edad del inóculo y su influencia en la producción de biomasa y en la acumulación de hidrocarburos, en el que los mejores resultados se obtuvieron cuando la edad del inóculo fue de 14 días, obtenidos también en fase exponencial (Cheng, Wang, Osei-Wusu, & Liu, 2018).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar el desempeño de diferentes concentraciones de inóculo de *Tetradismus obliquus*, en la tasa de crecimiento poblacional y depuración de los consorcios microbiano-algal inmovilizado en alginato para el tratamiento de aguas residuales en la piscicultura.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar el efecto del inóculo inicial en la tasa de crecimiento poblacional (μ).
2. Evaluar el efecto de las diferentes concentraciones celular del inóculo en las tasas de depuración de amonio, nitrato, nitrito y fosfato.
3. Establecer el tiempo de vida útil máximo que podrían estar las esferas en el fotobiorreactor.

5. METODOLOGÍA

5.1 ÁREA DE INVESTIGACIÓN

La investigación se llevó a cabo en la plataforma de innovación abierta DeNOVO, ubicada en Aurelio Manzano 594, Concepción. Las muestras de agua utilizadas provinieron de la piscicultura de Pangué, Región del Bío-Bío. La puesta en marcha del experimento y los análisis de la tasa de crecimiento poblacional y depuración de nutrientes fueron realizados en el laboratorio e instalaciones de DeNOVO.

5.2 FORMULACIÓN DE LA PROPUESTA DE TRABAJO

5.2.1 MICROALGA: *TETRADESMUS OBLIQUUS*

La microalga que se empleó en los ensayos batch con recambio de agua, fueron obtenidos de biomasa procedente de un biorreactor ubicado en la piscicultura en Pangué, región del Bio-Bío. Dicho inóculo fue previamente caracterizado y aislado en los laboratorios de DeNOVO identificando a la cepa como *Tetradasmus obliquus*. Debido al uso de agua provenientes de piscinas de peces, no se garantizan las condiciones axénicas, pudiendo desarrollarse microalgas endémicas de los efluentes de la piscicultura. Los cultivos se operaron de manera abierta, pero utilizando papel parafilm para evitar la contaminación de sólidos grandes. La idea de la presente investigación es poder obtener datos cinéticos (μ , TSR) simulando las condiciones de piscicultura de Pangué, por lo que las condiciones de esterilidad están inmediatamente descartadas, ya que al ser un sistema abierto las microalgas están expuestas constantemente a estímulos ambientales y a la interacción con otros microorganismos.

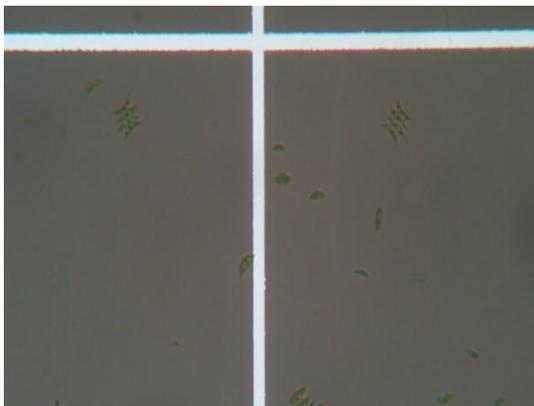


Figura 8. Fotografía microscópica de microalga *Tetradasmus obliquus*.

5.2.2 BACTERIAS

Las bacterias empleadas en los ensayos batch, fueron obtenidas de un volumen agua rico en nitrito proveniente de un biofiltro bacteriano de una piscicultura en funcionamiento en Pangue. Para conseguir dichas bacterias se obtuvieron 2 litros de agua del biofiltro bacteriano y se centrifugaron en tubos falcon de 50 mL, durante 5 min a 2500 RPM, de esta manera se logró obtener 1 L de pellet bacteriano. A dicho pellet se le midió la cantidad de nitrito en el agua y se encontró que poseía 5 mg/mL, por lo que se monitorizó durante 24 horas para observar si es que las bacterias lograban depurarlas en dicho rango de tiempo. Pasada las 24 horas se volvió a medir la concentración de nitrito en el agua observándose que la concentración disminuyó a 2,7 mg/mL, por lo que se volvió a repetir el procedimiento y esta vez se obtuvieron 500 mL de un nuevo concentrado, a dicho concentrado se aforo hasta los 1000 mL con el agua del biofiltro, y finalmente se le volvió a medir la concentración inicial de nitrito, el cual fue de 4,89 mg/mL y se monitorizó durante 24 horas. Finalmente, en la medición final se obtuvo una concentración de 1,7 mg/mL de nitrito por lo que se puede inferir que en dicho cultivo hay presencia de bacterias desnitrificantes, aunque dicho número de bacterias no fue centralizado.

5.2.3 INMOVILIZACIÓN Y CONTEO CELULAR DE LOS MICROORGANISMOS

La microalga *Tetrademus obliquus* y el consorcio de bacterias presentes en este trabajo se obtuvieron de la piscicultura. Los microorganismos fueron cultivados en el biorreactor ubicado en la piscicultura de Pangue. Para conocer la concentración celular de la muestra se extrajeron 10 uL y se le realizó un recuento celular utilizando la técnica de conteo celular descrita por Arredondo-Vega & Voltolina (2014) y luego mediante el modelo de Gompertz modificado se determinaron los parámetros cinéticos, en donde A: es la población máxima o logaritmos de los recuentos asintóticos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente, λ ; tiempo lag y μ_m constante de crecimiento, en la ecuación 1 podemos apreciar la ecuación de Gompertz modificado (Zwietering, Van, & Jogenburger, 1990).

Para la inmovilización de los microorganismos se siguió la metodología de Bashan y otros (2005), la cual consistió en preparar una solución de alginato de calcio al 2%, agitando vigorosamente por aproximadamente 30 min y a una temperatura de 100°C, luego se dejó reposar por 2 horas, evitando así la presencia de burbujas. Posteriormente se le añaden los volúmenes de inóculos de consorcio microalga-bacteria de $1,5 \times 10^5$ cel/mL, $5,5 \times 10^5$ cel/mL y $2,2 \times 10^6$ cel/mL correspondientes a T1, T2 y T3 respectivamente.

El volumen de inóculo debe ser del 7% respecto al de alginato, para evitar que la solución pierda consistencia, por lo tanto, como se desea realizar ensayos de 400 mL de volumen, son necesarios inocular una cantidad de esferas equivalente al 10% del volumen del medio, es decir, se requieren 40 mL de una solución de alginato+ inóculo de microalgas. Como se sabe de manera empírica que la relación de alginato y microalga debe ser del 7%, para obtener 40 ml de solución de (alginato+consorcio) microalga-bacteria se requieren 2,8 mL de inóculo para cada concentración. La solidificación de gel se realizó goteando la solución de alginato+consorcio microbiano-algal mediante pipetas de plástico de 3 mL en una solución de CaCl al 2%. Cabe mencionar que se hizo una selección de aquellas esferas que estuviesen en mejor estado ya que no contábamos con un rotador para agitar la solución mientras las esferas decantaban en la solución. Finalmente se dejó reposar durante 2 horas para lograr que las esferas de alginato solidificaran.

$$y = A * \exp \left\{ -\exp * \left\{ \frac{\mu m * \exp(1)}{A} * (\lambda - t) + 1 \right\} \right\}$$

Ecuación 1. Ecuación de Gompertz modificada.

5.2.4 CONDICIONES DE OPERACIÓN Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Las condiciones de operación en los ensayos fueron una simulación de las condiciones de la piscicultura de Pangue, en el que la temperatura presente en la piscicultura es de alrededor 10°C por lo que previo a este trabajo se debió adaptar a la cepa de la microalga a una temperatura que rodean los 10°C ± 3 °C.

El medio en el que se dispondrán las esferas de alginato proviene del agua de los peces alimentados en la piscicultura. La principal justificación de esto es que la composición química del agua no es estable en la industria acuícola, esto se debe a que los peces son organismos vivos y sus heces y orines no son siempre las mismas, y al tratarse de sistemas abiertos, la presencia de otros microorganismos genera competencias entre ellos por la presencia de oxígeno disuelto (OD) y nutrientes en el medio. Por todo lo anteriormente mencionado, los ensayos se realizaron con recambios de agua diaria, con el fin de simular las interacciones de microorganismos y cambios en la composición química del agua.

La fuente de luz a utilizar fue un foco led dispuesto sobre los matraces con el fin de que la iluminancia sea similar para todos los ensayos. En el caso del fotobiorreactor de Pangué la iluminación es por los costados, mediante 4 tubos led. En nuestro caso se utilizará un foco sobre los matraces disponiendo los matraces de manera tal que la distribución de luz sea lo más homogénea posible.

A continuación, se presenta una matriz, en la que se dispuso de doce matraces los cuales están expuesto a un foco led sobre ellos. Se midió el Lux en cada ubicación, procurando que a cada matraz le llegue la misma intensidad lumínica.

Tabla 3. Diferentes intensidades de luz a lo que están sometidos los ensayos. T1: Concentración baja, T2: Concentración media, T3: Concentración Alta, B: Blanco.

3500 Concentración celular T1	3930 Concentración celular B	4000 Concentración celular T3	3550 Concentración celular B
3650 Concentración celular T1	4200 Concentración celular T1	4300 Concentración celular T2	3700 Concentración celular T3
3500 Concentración celular T3	3850 Concentración celular T2	3900 Concentración celular B	3450 Concentración celular T2

5.2.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

En total doce fueron los matraces Erlenmeyer de 500 mL utilizados, con tres concentraciones distintas, tres matraces por concentración, y tres matraces adicionales para el experimento control, compuesto únicamente de esferas de alginato. Se utilizó un volumen de trabajo de 400 mL en total, abiertos al ambiente e iluminado constantemente por luz artificial, a través de un foco led localizado sobre los matraces con una intensidad lumínica en la superficie de ellos de aproximadamente 4000 Lux (tabla 3). Cada matraz fue inoculado con 40 mL de alginato + consorcio microbiano algal, a diferentes concentraciones T1, T2 y T3 equivalentes a $1,5 * 10^5 \text{ cel/mL}$, $5,5 * 10^5 \text{ cel/mL}$ y $2,2 * 10^6 \text{ cel/mL}$. Para la medición del volumen se colocaron 40 ml de esferas de alginato + consorcio en una probeta, y se aforó con agua de pangué hasta los 400 mL. Principalmente tres fueron los resultados obtenidos en este ensayo. La tasa de crecimiento poblacional (μ), la cual se obtuvo mediante conteo celular midiendo diariamente hasta que empiecen a exudar las microalgas al medio, utilizando la técnica de conteo celular de Voltolina y otros (2007). Se utilizaron cuatro esferas de alginato de cada matraz, la que posteriormente se disolvieron en una solución de bicarbonato al 10% por 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, de dicha solución se obtienen muestra de 10 uL para ser contadas en el microscopio. En la figura 9, podemos observar un esquema del sitio experimental.

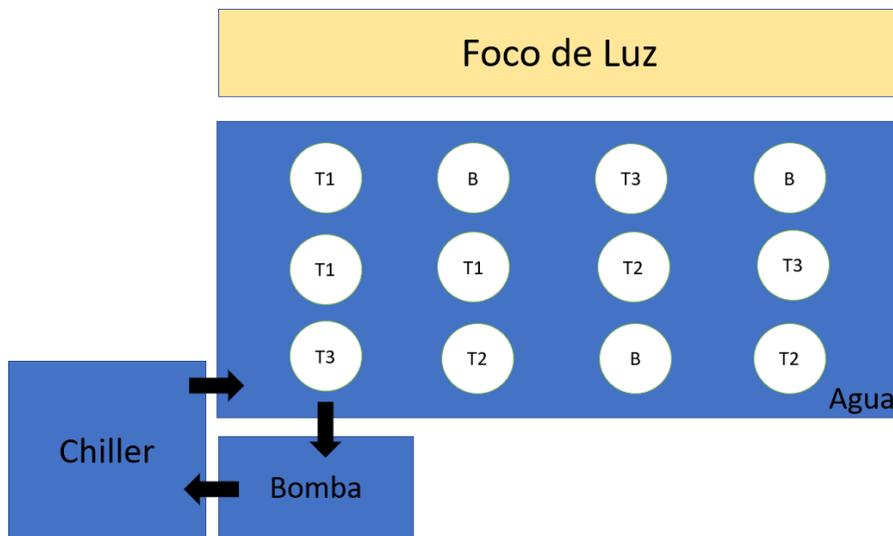


Figura 9. Esquema del sitio experimental

5.2.6 ANÁLISIS

Para la tasa de depuración de los nutrientes, el uso de curvas de calibración fueron necesarias para la correcta monitorización de los compuestos de nitrato, nitrito, amonio y fosfato. Se utilizó el equipo espectrofotómetro multi volúmenes epoch para poder medir de manera simultánea la depuración en los nutrientes en los matraces.

El principio utilizado para hacer las curvas de calibración fue de extrapolar el uso de los reactivos HANNA usados en el fotómetro al espectrofotómetro multivolumenes, mediante una conversión de los volúmenes de reactivos utilizados.

Las ecuaciones obtenidas se presentan a continuación, y para más información de cómo se obtuvieron revisar anexo 9.3.

$$C \text{ PO}_4^{3-}: 63,7 * \text{Abs} - 3,83 \text{ (mg/L)}.$$

Ecuación 2. Ecuación de concentración de fosfato.

$$C \text{ NO}_2^-: 3,69 * \text{Abs} - 0,223 \text{ (mg/L)}.$$

Ecuación 3. Ecuación de concentración de nitrito

$$C \text{ NH}_4^+: 15,7 * \text{Abs} - 2,2 \text{ (mg/L)}.$$

Ecuación 4. Ecuación de concentración de amonio.

$$C \text{ NO}_3^-: 121 * \text{Abs} - 1,62 \text{ (mg/L)}.$$

Ecuación 5. Ecuación de concentración de nitrato. .

Para determinar el tiempo de residencia de sólidos (TRS), diariamente se midió la absorbancia a 681 nm en el medio de todos los matraces, en donde a cualquier cambio de absorbancia del agua estableció el inicio del tiempo en que los biomédios comienzan a exudar, lo que significa que las esferas de alginato liberan al medio las microalgas encapsuladas.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 RESULTADOS

6.1.1 CRECIMIENTO CELULAR

El crecimiento celular se observó en la concentración T1 (baja), T2 (media), y T3 (alta), fueron en orden ascendente respecto al control (esfera de alginato sin consorcio). La concentración T1 que inicio con una concentración celular de $1,5 * 10^5$ cel/mL fue la que presento un menor crecimiento celular con un tiempo de adaptación o lag de 4 días, alcanzando al quinto día una concentración celular de $9,31 * 10^5$ cel/mL. La concentración T2 que inicio con una concentración celular de $5,5 * 10^5$ cel/mL fue la que presento un crecimiento más consistente respecto a las muestras T1 y T3, con un tiempo de adaptación o lag de 3 días, alcanzando al quinto una concentración celular de $7,23 * 10^6$ cel/mL. La concentración T3 que inicio con una concentración celular de $2,21 * 10^6$ cel/mL fue la que alcanzo un mayor crecimiento al quinto día con $6,9 * 10^7$ cel/mL. Cabe mencionar que en la muestra T3 el crecimiento fue exponencial desde el día 0 hasta el día 3 en el que se produjo un breve periodo lag, esto se puede deber a la necesidad de neutralizar sustancia toxicas presentes en el medio, las cuales se generaron en la concentración T3 y no estaban presentes en las concentraciones T1 y T2 debido a que la concentración de bacterias desnitrificantes era muy inferior en estos últimos casos.

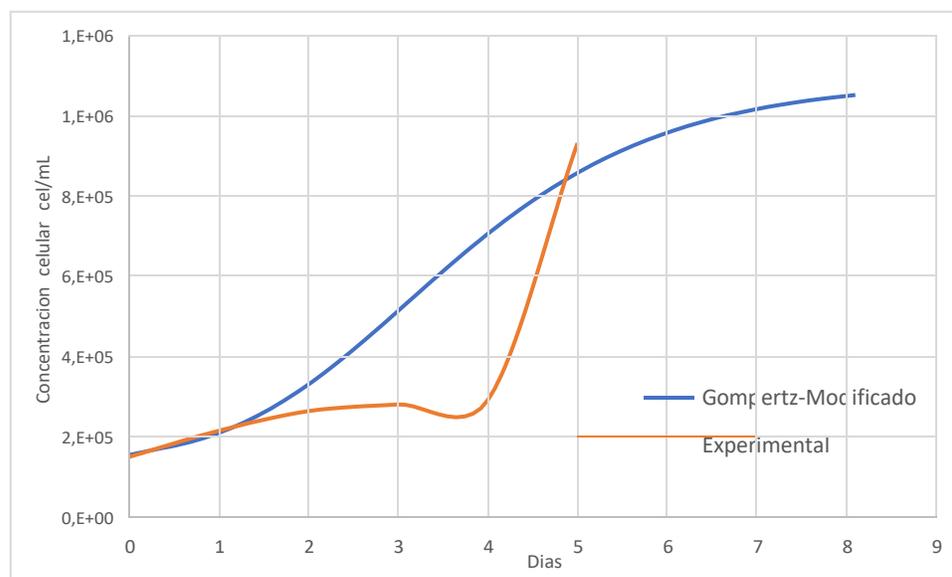


Figura 10. Curva de crecimiento micro algal con una concentración T1 (baja) inicial experimental de $1,5 \times 10^5 \text{ cel/mL}$ en un periodo de tiempo y curva de crecimiento micro algal con una concentración T1 (baja) inicial de $1,5 \times 10^5 \text{ cel/mL}$ predicho por el modelo de Gompertz modificado.

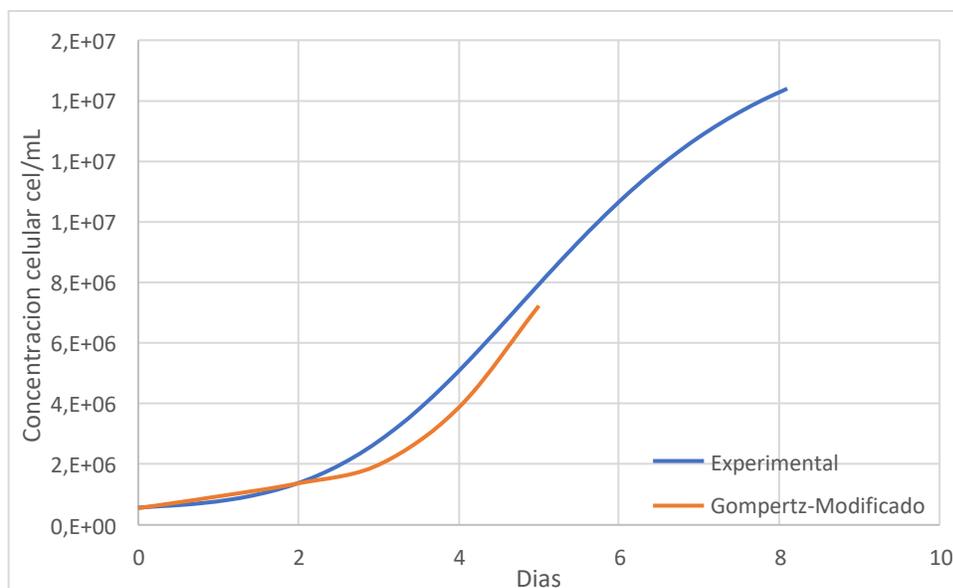


Figura 11. Curva de crecimiento micro algal con una concentración T2 (media) inicial experimental de $5,5 \times 10^5 \text{ cel/mL}$ en un periodo de tiempo y curva de crecimiento micro algal con una concentración T2 (media) inicial de $5,5 \times 10^5 \text{ cel/mL}$ predicho por el modelo de Gompertz modificado.

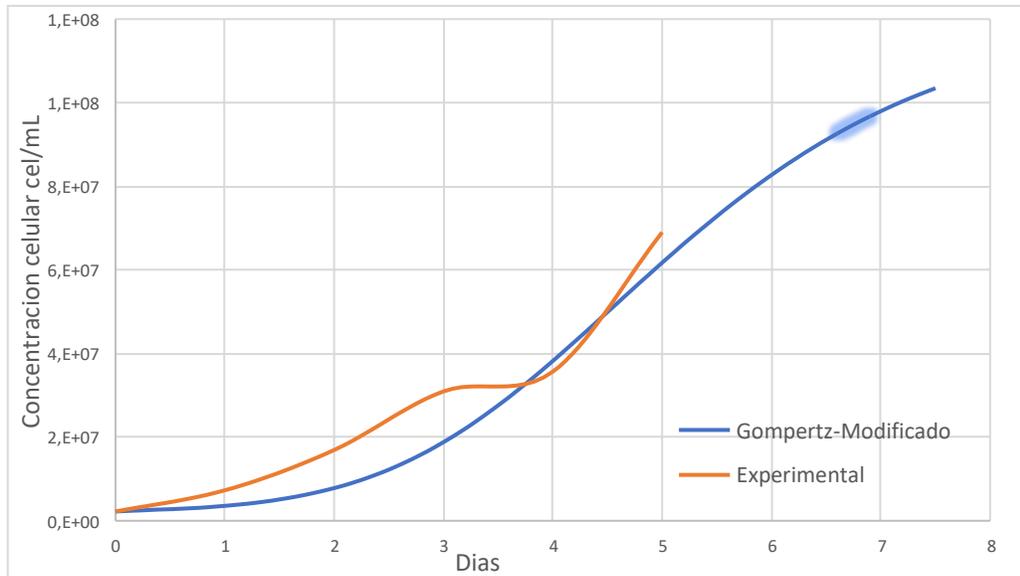


Figura 12. a) Curva de crecimiento micro algal con una concentración T3 (alta) inicial de $2,2 * 10^6$ cel/mL, b) curva de crecimiento micro algal con una concentración T3 (alta) inicial de $2,2 * 10^6$ cel/mL predicho por el modelo de Gompertz modificado.

En la tabla 4, podemos ver los parámetros cinéticos obtenidos mediante el modelo de Gompertz, en el que podemos observar que, a una concentración celular menor, la tasa de crecimiento se ve directamente afectada. Lo mismo pasa con la población máxima, es decir, se estima que en un futuro la máxima población alcanzada por las concentraciones depende directamente del tamaño del inoculo inicial. Cabe señalar que, a una mayor concentración celular, mayor es la tasa de depuración de los compuestos tal y como se muestra en la figura 17. Para las condiciones evaluadas en el presente estudio, el mejor caso para obtener los mejores parámetros cinéticos y por consecuencia aumentar las tasas de depuración están dados por la concentración T3, con una población máxima de $6,2 * 10^9$ cel/mL y una velocidad de crecimiento máxima de 0,9 días.

Tabla 4. Parámetros cinéticos del modelo de Gompertz a diferente concentración celular.

Parámetros cinéticos	T1	T2	T3
A (cel/mL)	$1,1 * 10^6$	$1,4 * 10^7$	$1 * 10^8$
λ (días)	3,79	2,93	1,6
μ (días)	0,35	0,76	0,9

6.1.2 DEPURACIÓN DE NITRATO

Todas las concentraciones presentan una disminución en la concentración de nitrato presente en la muestra respecto al blanco. En el caso de T1 que inicio con una concentración de $26,21 \pm 1,68$ mg/mL la depuración fue lenta y regular hasta el día 3 que se logró disminuir hasta un $23,42 \pm 1,50$ mg/mL, y no fue hasta el cuarto día que se observó un aumento en la tasa de depuración logrando una disminución de hasta $21,24 \pm 1,36$ mg/ml, obteniéndose al quinto día $19,79 \pm 1,27$ mg/mL. Respecto al caso de T2 las tasas de depuración se mantuvieron prácticamente iguales que T1 y no es hasta el quinto día en que se pudo apreciar una leve disminución en la concentración de nitrato hasta los $18,34 \pm 1,18$ mg/mL, en la figura 17 podemos apreciar el porcentaje de remoción de los nutrientes a lo largo del tiempo. Por otro lado, T3 durante los días 0 y 3, la depuración se mantuvo constante y sin grandes cambios, con una concentración alrededor de $21,73 \pm 1,39$ mg/mL y no es hasta el cuarto que día que logra un aumento importante en la disminución de nitrato con una concentración de $15,32 \pm 0,98$ mg/mL. Finalmente, respecto al blanco podemos apreciar que, en las mediciones, las concentraciones se mantuvieron constantes con variaciones de $2,01 \pm 0,12$ mg/mL que se pueden deber al error en las mediciones o por la presencia de compuestos orgánicos presentes en el medio (escamas de pescados). Además, mencionar que como no hubo grandes diferencias en las concentraciones podemos inferir que el nitrato no es capaz de ser adsorbido por las esferas de alginato en este rango de tiempo.

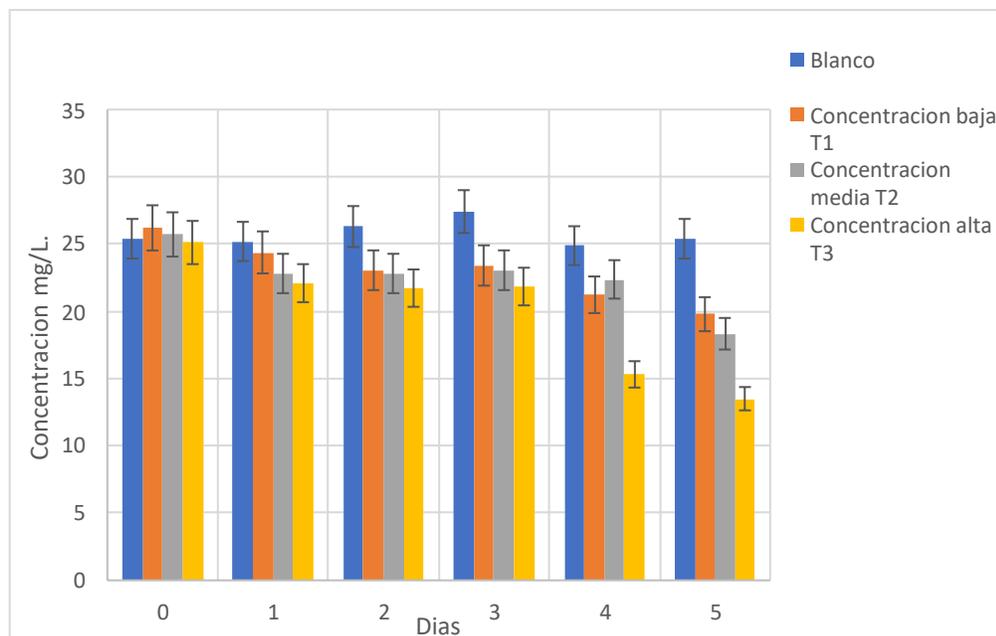


Figura 13. Depuración de nitrato en biomédios microalgas- bacterias a lo largo del tiempo.

6.1.3 DEPURACIÓN DE NITRITO

No todas las concentraciones demuestran una disminución en la concentración de nitrato respecto al blanco. En el caso de T1, se observa que la concentración inicial de nitrato presente en el mediono varía al pasar los días y se mantiene constante en alrededor de $5,59 \pm 0,11$ mg/mL. Esto se debe a que la concentración de bacterias desnitrificantes en los biomédios no fue la requerida para que se lograra crear un consorcio entre microalgas y bacterias. En el caso de T2 ocurrió algo similar que en T1, y la concentración de nitrato se mantuvo constante en $5,6 \pm 0,11$ mg/mL. Por otro lado, la concentración T3 no demostró una variación significativa en los días 0 hasta el día 3, y no fue hasta el cuarto día que se logró una disminución significativa en la depuración de nitrato alcanzando una concentración de $2,99 \pm 0,059$ mg/mL, y al quinto día de $1,14 \pm 0,022$ mg/mL. Cabe señalar que la gran diferencia entre T3 y T1, T2, es que la cantidad de inóculo de bacterias desnitrificantes es varias veces menor en T1 y T2, provocando que no tuviesen una concentración celular inicial adecuada para la conformación del consorcio microalga bacterias. Finalmente, respecto al blanco podemos observar que no hubo mayores cambios en las tasas de depuración permaneciendo

constantes en $5,6 \pm 0,11$ mg/mL e infiriendo que las esferas de alginato no son capaces de adsorber nitrito en este rango de tiempo.

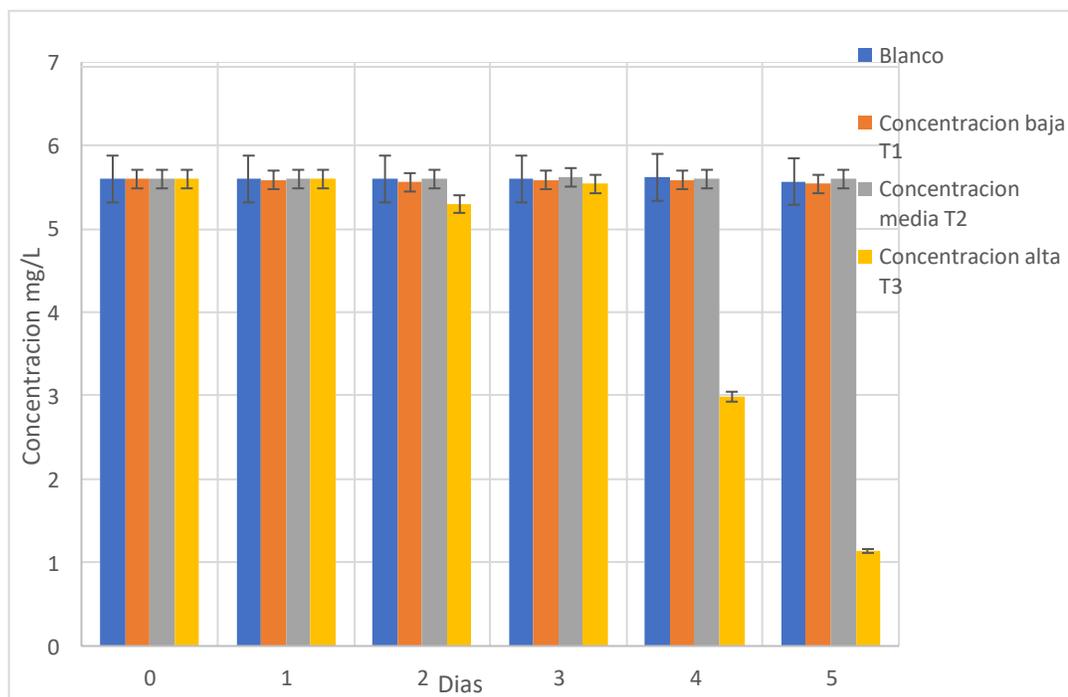


Figura 14. Depuración de nitrito en biomédios microalgas- bacterias a lo largo del tiempo.

6.1.4 DEPURACIÓN DE FOSFATO

No todas las concentraciones muestran un cambio significativo en la depuración de fosfato respecto al blanco. En el caso de T1, se observa que la depuración de fosfato no muestra grandes variaciones en el tiempo y permanece constante alrededor de $8,2 \pm 0,622$ mg/mL, esto se puede deber a la baja concentración celular inicial de T1 la cual genera un mayor tiempo de fase lag o de adaptación. Respecto al caso de T2 podemos apreciar que hasta el día 3 no hubo cambios significativos en la depuración de fosfato, permaneciendo relativamente constantes en $7,91 \pm 0,589$ mg/mL y no fue hasta el cuarto día que se observa una disminución significativa en la depuración de fosfato alcanzando una concentración de $6,7 \pm 0,499$ mg/mL. Por otra parte, la concentración T3 muestra un comportamiento regular en las tasas de depuración hasta el día 3, permaneciendo relativamente constante en $7,5 \pm 0,558$ mg/mL. Luego en el cuarto y quinto día se aprecia un

notable aumento en la depuración de fosfato con una concentración de $5,12 \pm 0,381$ y $3,68 \pm 0,27$ respectivamente. Cabe mencionar que el blanco se mantuvo constante a lo largo del tiempo, por lo que podemos inferir que el fosfato no es capaz de ser adsorbido por las esferas de alginato.

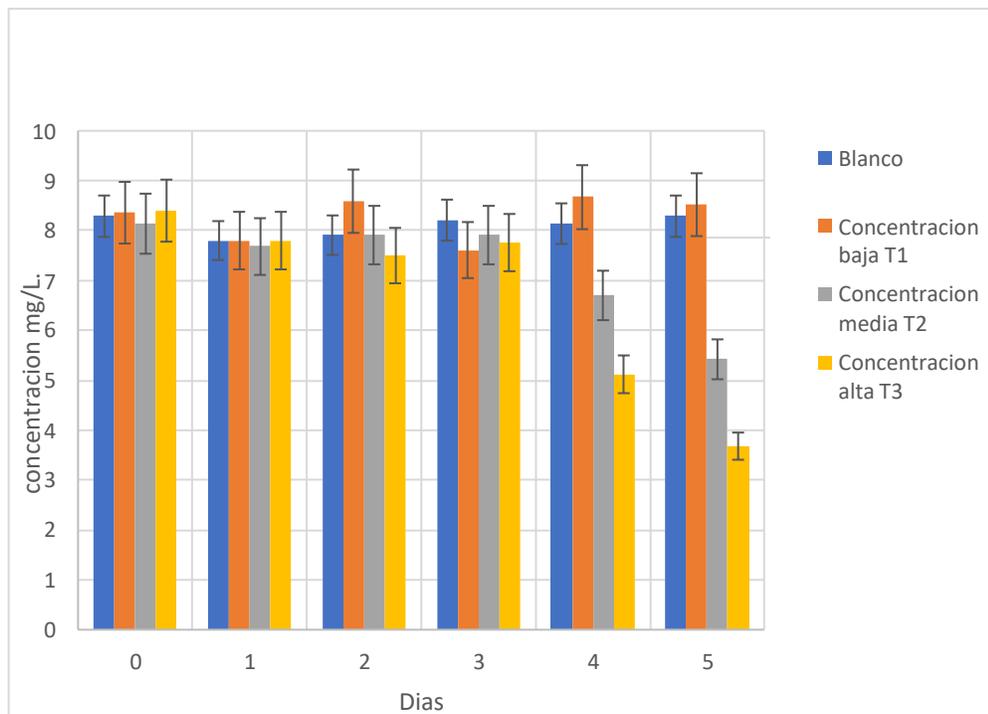


Figura 15. Depuración de nitrato en biomédios microalgas- bacterias a lo largo del tiempo

6.1.5 DEPURACIÓN DE AMONIO

Todas las concentraciones muestran cambios en las tasas de depuración de amonio en comparación al blanco. En el caso de T1, se puede apreciar tasas de depuración constantes con una concentración de $3,3 \pm 0,291$ mg/mL hasta el tercer día en que se aprecia un leve aumento de amonio de un $3,85 \pm 0,339$ mg/mL, luego al cuarto y quinto día vuelve a disminuir las concentraciones alcanzando $2,96 \pm 0,26$ y $2,93 \pm 0,25$ mg/mL. En el caso de T2 se puede apreciar una disminución constante en los días 0 al 3, alcanzando una concentración de $3,12 \pm 0,275$ mg/mL. Luego al cuarto día se puede apreciar un leve aumento en la concentración, para luego volver a disminuir en el quinto día hasta los $1,3 \pm 0,114$ mg/mL. Por otro lado, en el caso de T3, se puede observar que hubo una disminución de amonio significativa entre el día 0 y el día 2, con una

concentración de $1,82 \pm 0,16$ mg/mL. Luego en el tercer y cuarto día se aprecia un leve aumento en la concentración, para luego volver a disminuir en el quinto día hasta los $0,165 \pm 0,014$ mg/mL. Cabe mencionar que en el blanco hubo una leve disminución de amonio en el medio, por lo que se puede inferir que el amonio es capaz de ser adsorbido por las esferas de alginato, aunque en bajas cantidades.

En la figura 17 podemos observar las tasas de depuración en porcentaje de todos los compuestos a las diferentes concentraciones celulares iniciales, en el que destaca desempeño de T3 depurando el 96% de amonio, 56 % de fosfato, 80% de nitrito y 46,2 % de nitrato. Cabe señalar que, en el caso del blanco, todos los compuestos se mantuvieron en 0% de depuración excepto el amonio el cual fue depurado casi el 30% de amonio presente. Esto se puede deber a que las esferas de alginato de calcio tienen la capacidad de adsorción y el amonio fue adsorbido en ellas.

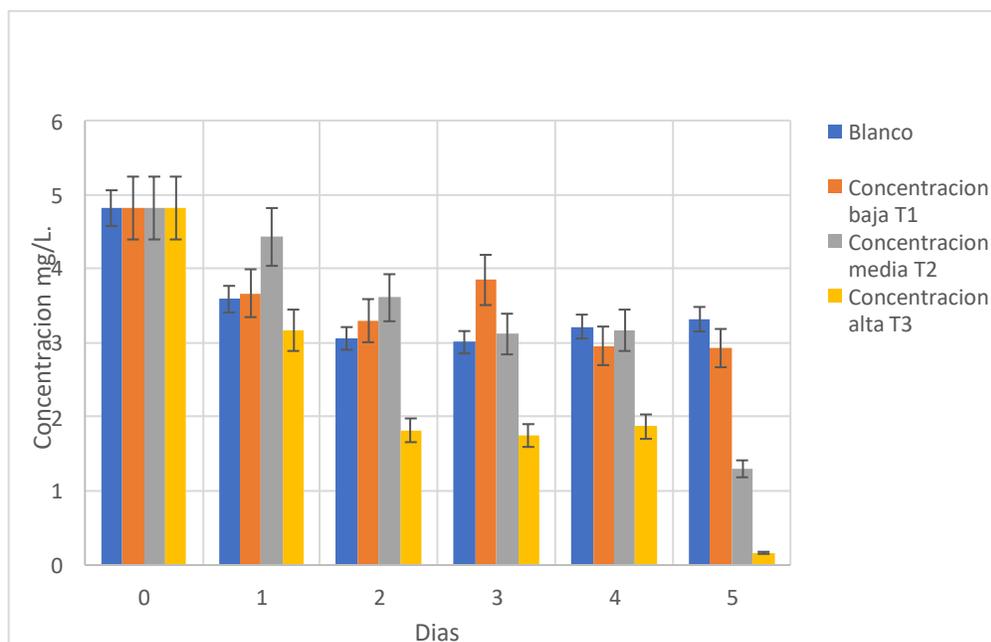


Figura 16. Depuración de amonio en biomédios microalgas- bacterias a lo largo del tiempo

En la figura 17, podemos apreciar la depuración total de los contaminantes en porcentaje de los diferentes inóculos, en los que destaca la concentración T3 al poseer los porcentajes de depuración de nitrato, nitrito, fosfato y amonio mas elevados, con un 46, 80, 57 y 97 % respectivamente.

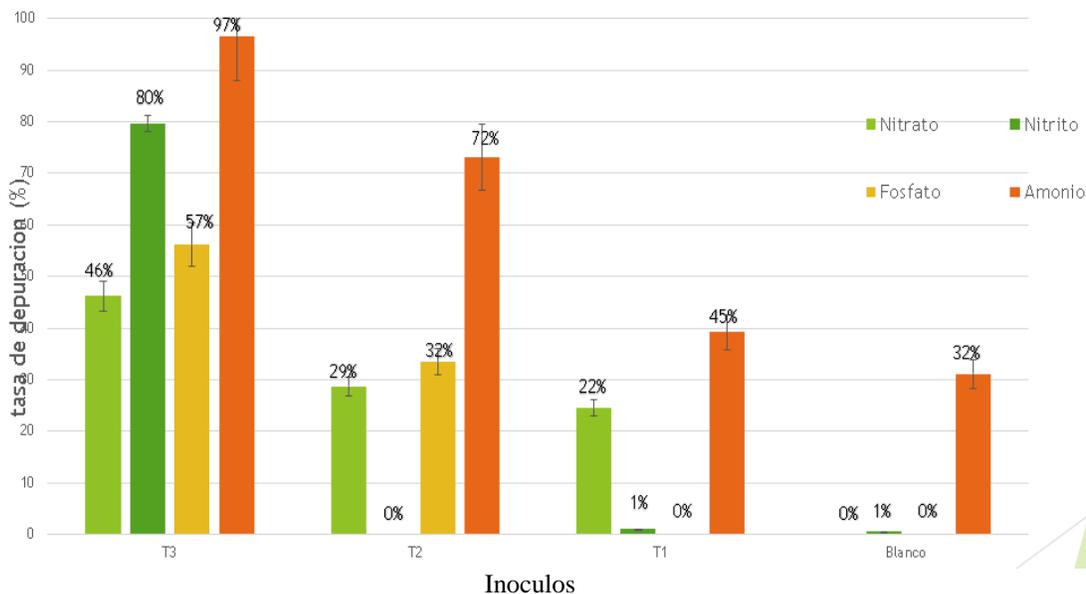


Figura 17. Resumen depuración en porcentaje, de los contaminantes en diferentes concentraciones celulares iniciales,

6.1.6 TIEMPO DE EXUDACIÓN DE LOS MEDIOS

Los tratamientos T1 y T2 demostraron que hasta el quinto no alcanzaron a exudar y la densidad óptica del agua a 680 nm se mantuvo constante en $0,042 \pm 0,0022$. En cambio, el tratamiento T3 al quinto día de manera cualitativa se podía observar que el agua estaba levemente verde y se corroboró con la densidad óptica de esta misma que arrojó un valor de $0,044 \pm 0,0022$. Cabe mencionar que se dejó operando el tratamiento T3 un día más para asegurar que estuviera exudando y se midió nuevamente la absorbancia del agua arrojando un valor de $0,056 \pm 0,0028$.

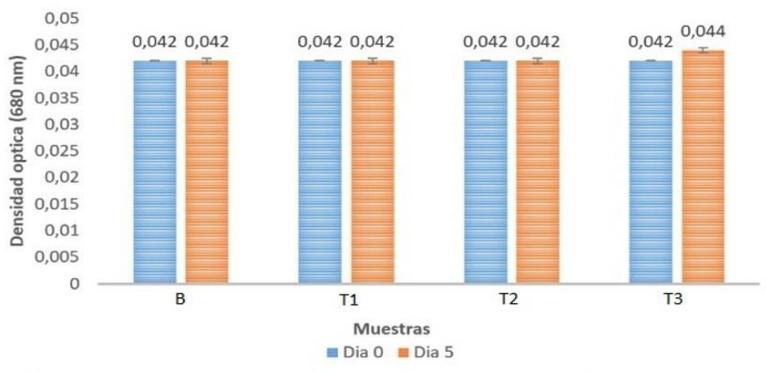


Figura 18. Variación de la densidad óptica de microalgas inmovilizadas a diferentes concentraciones, durante un periodo de 5 días.

6.2 DISCUSIÓN

6.2.1 VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO Y TASAS DE DEPURACIÓN

De acuerdo con el banco mundial, en 2030 el 60% del consumo humano del pescado será proporcionado por la acuicultura (Bank, 2013). En este proceso, la recirculación es esencial y requiere un tratamiento del agua para prevenir la acumulación de contaminantes y de sólidos en suspensión, tales como el amoníaco y nitrato, que en grandes cantidades puede generar diversos daños a los peces. Es en este contexto que el desarrollo de diversas tecnologías para remover el nitrato y otros compuestos dañinos para los peces y los ecosistemas se han ido explorando. Convencionalmente estos compuestos son removidos mediante procesos biológicos, tales como la desnitrificación, pero que lamentablemente usa los recursos presentes en el agua residual de manera ineficiente (Fernandez, Vescoso, & Godos, 2018). Las tecnologías basadas en las microalgas prometen una solución eficiente para el tratamiento de aguas residuales y a su vez generan biomasa que puede ser valorizada (Barnharst, Rajendran, & Hu, 2018), disminuyendo el impacto ambiental y mejorando la viabilidad económica de los SRA y de la cultivación de microalgas.

Gracias a literatura, se sabe que el crecimiento celular en las microalgas está directamente relacionado a las condiciones de operación y a la presencia de nutrientes en el medio, en el que una apta temperatura y la presencia de nitratos y fosfatos son esenciales para un correcto crecimiento (Tejido, Enrique, Luis, & Dominic, 2019). En este experimento era necesario conocer el crecimiento celular de las microalgas y observar cómo afectaba las diferencias de concentración celular en los inóculos de los diferentes tratamientos, en el tiempo de adaptación de las microalgas a la hora de depurar los nutrientes en el medio. Cabe mencionar que las condiciones de operación en términos de temperatura fueron bastante hostiles con la microalga, debido a esto, se sometió a un proceso de adaptación en el que se iba disminuyendo la temperatura gradualmente para que cuando se sometiera a dichas condiciones, su crecimiento no se viera inhibido. Según literatura, se espera que la fase de lag o adaptación se vean afectadas por el tamaño del inóculo, en el que, a una menor concentración celular inicial, mayores son los tiempos de adaptación. Si bien es importante el tamaño del inóculo para disminuir la fase lag, también lo es la historia fisiológica de las células y el entorno fisicoquímico del medio de crecimiento original y del nuevo (Bohutskyi,

Kligerman, Byers, & Nasr, 2016) En la figura 10 podemos apreciar en el tratamiento T1 que a un menor tamaño de inoculo inicial, mayor es el tiempo de adaptación de la microalga y además posee la menor velocidad máxima de crecimiento de 0,35 días , la cual si se compara con los demás tratamiento T2 y T3 podemos observar que no solo aumenta el μ , sino que también las tasas de depuración , por lo que se puede inferir una directa relación en ambos parámetros. En relación con T2 y T3, estos poseen una velocidad de crecimiento especifica de 0,76 y 0,9, lo que se ve reflejado cualitativamente en las esferas mediante un claro cambio de tonalidad en las esferas de alginato. Cabe señalar que todos los tratamientos cumplieron con el objetivo de depurar nitrato, amonio y fosfato, pero solo el tratamiento T3 logro depurar de manera eficiente el nitrito. Esto se debió a que la cantidad de inoculo inicial del tratamiento T3 poseía una mayor concentración de bacterias desnitrificantes por lo que estas fueron capaces de adaptarse y crecer en el medio, conformándose un consorcio entre las microalgas y las bacterias, capaces de depurar los cuatro nutrientes.

6.2.2 DEGRADACIÓN DE LOS MEDIOS Y CONDICIONES DE OPERACIÓN

El alginato es el biopolímero natural que por excelencia se utiliza en diversos procesos de tratamientos de agua residuales, así como en aplicaciones biotecnológicas de agricultura y medio ambiente, en los que se usan microorganismos inmovilizados en esferas de alginatos, (Nussinovitch, 2010). Las microalgas inmovilizadas es un enfoque común en diversas aplicaciones de biorremediación, en donde el de aguas residuales es uno de los más antiguos. Es importante entender la razón de la degradación de los medios de alginatos y su posterior consecuencia que es la exudación de los microorganismos inmovilizados. En la literatura se ha sugerido que la razón es la disolución química de los medios (De la Noue & Proulx, 1988). Este proceso de inestabilidad y biodegradación ocurre cuando el medio está en contacto con moléculas quelantes y anti-gelificantes, como fosfatos, citratos, sodio y magnesio entre otros (Moreno-Garrido, 2008). Además, según literatura, se prevé que se aumente la ruptura de las esferas de alginato en experimentos in situ, esto se debe mayormente a la sustitución del catión de las esferas por otros cationes o aniones como P_3^- y Na^+ , proceso que tiende a amplificarse en sistemas de flujo continuo, provocando que el alginato sea menos mecánicamente resistente y más susceptible a las fugas de células (Moreira, Moreira-Santos, & Guilhermino, 2006).

En nuestro caso, gran parte de los iones estaban presentes en el agua residual utilizada en el experimento, aunque solo era de interés cuantificar la cantidad de fosfatos presente en el medio. Por literatura la presencia de fosfatos altera las propiedades mecánicas de las esferas de alginato en concentraciones por sobre 50 mM (Martinsen, Skjak-Braek, & Smidrod, 1989), aunque en nuestro experimento no se alcanzaban las cantidades necesarias para disolver los medios y provocar fugas de las células, aunque la presencia de diversos elementos trazas tales como Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , Ca^{2+} , entre otros, en el agua residual y junto la presencia del ion Na^{2+} el cual posee un efecto quelante sobre el catión Ca^{2+} , proveniente del cloruro de sodio utilizado para el tratamiento de enfermedades en los peces (Dewi & Siallagan, 2018), pueden generar una disminución en la resistencia mecánica de los medios y liberar los microorganismos hacia el agua. En la figura 18 el tratamiento T3, en el que se hizo recambios de agua diarios se puede apreciar que exuda al quinto día con una densidad óptica de $0,044 \pm 0,0022$. Las razones por la que T3 exuda antes que el resto de los tratamientos se debe a que posee una mayor cantidad de concentración celular dentro de las esferas y a que los microorganismos están más cerca de la superficie. Uno de los objetivos de este experimento era determinar el tiempo de exudación de los microorganismos al medio, ya que se desea evitar incorporar a los ecosistemas una nueva especie de microalga, pero sin dejar de lado el rendimiento en la depuración de las esferas, es decir, no sería útil inocular a las esferas con una muy baja concentración celular con el fin de evitar que exuden si es que no capaces de depurar de manera eficiente el agua residual. En el caso de T3, cumple el objetivo de depurar los compuestos del agua en un tiempo razonable de 5 días, en especial el nitrito que como podemos apreciar en la figura 14 de los 3 tratamientos fue el único que logro depurarlo de manera eficiente. Esto se debe a que la concentración de bacterias desnitrificantes inoculadas en T3 fue la suficiente para que se adaptaran a las condiciones en que se sometieron y lograran un consorcio microalga-bacteria. Este no fue el caso de T1 y T2 en que los periodos de adaptación fueron mayores y si bien ambos lograron depurar de manera eficiente el nitrato, amonio y fosfato, no tuvieron el mismo rendimiento con el nitrito,

Cabe mencionar que se intentó seguir con el experimento hasta que T1 y T2 exudaran también, pero no fue posible debido a que el alginato comenzó a degradarse interfiriendo con las mediciones. Es importante mencionar que en el quinto día de manera cualitativa se podía apreciar que las esferas perdieron consistencia, algunas perdían su forma esférica, eran más viscosas y fáciles de romper.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Del presente estudio se puede concluir que:

1. La microalga *Tetradismus obliquus* en simbiosis con bacterias desnitrificantes e inmovilizadas en esferas de alginato, fue capaz de remover de manera eficiente los nutrientes del agua utilizando como medio de cultivo el agua proveniente del sistema de piscicultura de Pangue y en condiciones de temperatura que no son las óptimas para dicha especie. Los tratamientos T2 y T3 demostraron ser útiles para la depuración del amonio, nitrato y fosfato, pero no así de del nitrito.
2. Las esferas de alginato demostraron ser un biopolímero apto para la encapsulación de microalgas y bacterias en su interior, en donde sus propiedades mecánicas cumplieron con el objetivo de no biodegradarse en un corto periodo de tiempo, pero debe tenerse en cuenta que al sexto día el alginato comienza a degradarse y se liberan las células de microalgas al medio
3. El tratamiento T3, con una mayor concentración de microalgas, demostró ser el más eficiente y recomendado de los tres tratamientos ya que fue el que logro depurar de mejor manera todos los nutrientes del medio, obteniendo la mejor velocidad de crecimiento específica y el menor tiempo de fase lag o adaptación.

7.1 RECOMENDACIONES

Del presente estudio se puede recomendar que:

1. Según literatura, se es capaz de modificar las esferas de alginato para darle mayor resistencia mecánica y otorgarle la propiedad de no degradarse en agua con grandes concentraciones de sal (agua de mar). Esto le permitirá ampliar el mercado objetivo del proceso y aumentar la demanda, ya que actualmente la empresa se centra únicamente en acuicultura de agua dulce.
2. Es posible disminuir los consumos eléctricos del proceso, mediante la adición de un timer en el foco de luz. De esta manera en vez de que este las 24 hrs funcionando el foco, se puede configurar a que funcione en un intervalo de 1 segundo o 2 segundos de encendido y apagado, permitiendo disminuir el consumo eléctrico de la planta a la mitad, sin afectar el crecimiento del consorcio microalga-bacteria.
3. Es posible disminuir aún más los tiempos de fase lag o adaptación de las microalgas dentro de las esferas de alginato, mediante la incorporación del inóculo en la fase exponencial y no en la fase estacionaria, ya que muchas veces en la empresa se utilizaba inóculos que fueron obtenidos de cultivos en fase estacionaria.
4. Tanto las microalgas como las esferas de alginato poseen la capacidad de depuración y de adsorción de metales como el Cu, por lo que un posible mercado es el uso de esta especie en el área de la industria ~~minería~~.

8. REFERENCIAS

- Arbib, Z., Ruiz, J., & Alvarez-Diaz, P. .-P. (2013). Long term outdoor operation of a tubular airlift pilot photobioreactor and a high rate algal pond as tertiary treatment of urban wastewater. *Ecological Engineering* , 143-153.
- Arcilla, J. . (2016). Microalgae–bacteria aggregates: effect of the hydraulic retention time on the municipal wastewater treatment, biomass settleability and methane potential. *Journal of Chemical technology & Biotechnology* , 2862-2870.
- Arredondo-Vega, O., & Voltolina, D. (2014). concentracion, recuento celular y tasa de crecimiento . *Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal*, 21-29.
- Bank, W. (01 de Diciembre de 2013). *FISH TO 2030 Prospects for Fisheries and Aquaculture*. Obtenido de <https://documents.worldbank.org/en/publication/documents-reports/documentdetail/458631468152376668/fish-to-2030-prospects-for-fisheries-and-aquaculture>
- Barnharst, T., Rajendran, A., & Hu, B. (2018). Bioremediation of synthetic intensive aquaculture wastewater by a novel feed-grade composite biofilm. *International Biodeteoration & Biodegradation*, 131-142.
- Bohutskyi, P., Kligerman, D., Byers, N., & Nasr, L. (2016). Effects of inoculum size, light intensity, and dose of anaerobic digestion centrate on growth and productivity of *Chlorella* and *Scenedesmus* microalgae and their poly-culture in primary and secondary wastewater. *Algal research* , 278-290.
- Buschmann, A. (Diciembre de 2001). *Fundacion Terram*. Obtenido de <https://www.terram.cl/publicaciones/>
- Castro, M., Jeronimo, F., & Garcia, F. (2004). Heavy metals removal by the microalga *Scenedesmus incrassatulus* in continuous cultures. *Bioresource Techonology* , 219-222.
- Cheng, P., Wang, Y., Osei-Wusu, D., & Liu, T. (2018). Efects of seed age, inoculum density, and culture conditions on growth and hydrocarbon accumulation of *Botryococcus braunii* SAG807-1 with attached culture . *Biosources and Bioprocessing* , 5-15.
- Cruz, I., & Bashan, Y. .-C. (2013). Biological deterioration of alginate beads containing immobilized microalgae and bacteria during tertiary wastewater treatment. *Applied microbiology and Biotechnology* , 9847-9858.
- De la Noue, J., & Proulx, D. (1988). Biological tertiary treatment of urban wastewaters with chitosan-immobilized *Phormidium* . *Applied microbiology and biotechnology* , 292-297.

- Dewi, R., & Siallagan, W. ., (2018). The efficacy of sodium chloride application in the control of fish lice (*Argulus* sp) infection on tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Acta Aquatica: Aquatic Sciences Journal*, 4-7.
- Feest, P., & Briceño, F. G. (2018). Calidad de agua en sistemas de recirculacion. *Salmonexpert*, 46-60.
- Fernandez, C., Vescoso, S., & Godos, I. (2018). Biochemical methane potential of microalgae biomass using diferent microbial inocula. *Biotechnology for biofuels*, 2-11.
- Gao, X., Guo, C., & Hao, J. (2020). Adsorption of heavy metal ions by sodium alginate based adsorbent-a review and new perspectives. *Internal Journal of biological macromolecules*, 4423-4434.
- Iván, A., & Daury, P. (2017). Remocion de nitrogeno amoniaco total en un biofiltro: percolador-columna de arena. *Tecnología y Ciencias del Agua*, 81-93.
- karel, S., Libicki, S., & Robertson, C. (1985). The immobilization of whole cells engineering principles. *Chemical Engineering Science*, 1321-1354.
- Kazamia, E., Czesnick, H., & Nguyen, T. (2012). Mutualistic interactions between vitamin B12-dependent algae and heterotrophic bacteria exhibit regulation. *Enviromental Microbiology* , 1466-1476.
- Lawrence, A., & Warren, M. (2014). Algae acquire Vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria . *Researchgate*.
- Loaiza, J., Martinez, L., Carlin, M., & Esquivel, R. (2011). Nitrificacion con bajo tiempo de retencion de solidos y bajo indice energetico. *Aqua-LAC*, 37-44.
- MacGarvin, M. (Septiembre de 2000). *Scotland's Secret Aquaculture, nutrient pollution, eutrophication and toxic blooms*. Obtenido de <https://www.wwf.org.uk/sites/default/files/2000-01/secret.pdf>
- Marcel Claude, J. O. (julio de 2000). *La ineficiencia de la salmonicultura en Chile; aspectos sociales, economicos y ambientales*. Obtenido de https://www.terram.cl/descargar/recursos_naturales/salmonicultura/rpp_-_reporte_de_politicas_publicas/RPP-1-La-Ineficiencia-de-la-salmonicultura-en-Chile-Aspectos-sociales-economicos-y-ambientales.pdf
- Martinsen, A., Skjak-Braek, G., & Smidrod, O. (1989). Alginate as Immobilization Material: I. Correlation between Chemical and Physical Properties of Alginate Gel Beads . *Biotechnonology and Bioengineering* , 79-89.
- Metcalf, & Eddy. (2003). *Wastewater engineering treatment and reuse*. McGraw-Hill.
- Miranda, F., & Rosales, V. (2018). Eutrofizacion, una amenaza para el recurso hidrico. En J. Zamora, *Impacto social-ambiental, territorio sostenibles y desarrollo regional del turismo*. (págs. 353-367). Mexico.

- Moreira, S., Moreira-Santos, M., & Guilhermino, L. (2006). Immobilization of the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* in alginate for in situ experiments: Bead stability and suitability. *Enzyme and Microbial technology*, 135-141.
- Moreno-Garrido, I. (2008). Microalgae immobilization current techniques and uses. *Bioresources technology*, 3949-3964.
- Nussinovitch, A. (2010). Bead Formation, Strengthening, and modification. *Polymer Macro and micro Gel beads*, 27-52.
- Oporto, J., Ibañez, C., Brieva, L., Espinoza, C., & Arqueros, M. (Julio de 2000). *Fundacion Terram*. Obtenido de <https://www.terram.cl/publicaciones/>
- Philip, G., & Ian, D. (22 de Mayo de 2014). *Ospar eutrophication assessment of aquaculture hotspots in scottish coastal waters addendum report*. ResearchGate.
- Presidencia, M. s. (7 de Marzo de 2001). *Biblioteca del congreso nacional de Chile/BCN*. Obtenido de <https://www.bcn.cl/leychile/navegar?idNorma=182637>
- Roalkvam, I., & Dronen, K. . (2020). A case study of biofilter activation and microbial nitrification in a marine recirculation aquaculture system for rearing Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture research*, 1-11.
- Su, Y., Mennerich, A., & Urban, B. (2011). Synergistic cooperation between wastewater-born algae and activated sludge. *Elsevier*, 67-73.
- Subashchandrabose, R. R., & Megharaj, M. (2011). Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential. *Biotechnology Advances*, 896-907.
- Tejido, N., Enrique, A., Luis, S., & Dominic, R. (2019). Treatment of aquaculture effluent with *Chlorella vulgaris* and *Tetrademus obliquus*: effect of pretreatment on microalgae growth and nutrient efficiency. *Elsevier*, 1-9.
- Villanueva, R., Bocanegra, A., & Borja, R. (1999). Heavy metal removal by microalgae. *Researchgate*, 144-151.
- Zwietering, M., Van, T., & Jogenburger, I. (1990). Modeling of bacterial growth curve. *Applied and environmental microbiology*, 1875-1881.

9. ANEXOS

9.1 PURIFICACIÓN DE LA CEPA DE TETRADESMUS OBLIQUUS

Procedimiento de caldo 1.1.2:

En una botella de 500 mL se agregan con la ayuda de una probeta 148.7 ml de agua destilada, posteriormente se agregan los volúmenes de solución stock de cada compuesto utilizado como nutriente del medio Bristol formulado. Adicionalmente se añaden 0,15 g de proteasa de peptona.

Procedimiento de Agar:

En dos botellas de 500 mL se les añaden con la ayuda de una probeta 147.6 mL de agua destilada a cada una, posteriormente se agregan los volúmenes de solución stock de cada compuesto utilizado como nutriente en el medio Bristol formulado. Adicionalmente se añaden 2,25 g de agar y 0,15 g de proteasa de peptona.

Procedimiento de esterilizado:

Los medios de cultivos se cierran y se recubren con papel señalando la fecha, que es lo que contiene y quien lo hizo, posteriormente se le adhiere una cinta de autoclave y se disponen los materiales dentro del autoclave a 130°C durante 15 min.

Medio Bristol

Tabla 5. Medio Bristol utilizado en el cultivo de la *Tetradasmus obliquus*

Medio Bristol					
Reactivos	Solución Stock (mL)=		50	Solución acuosa mL	150
	masa (g)	Volumen agua (mL)	Con. (mM)	vol. (mL)	Con.(mM)
NaNo3	10,00	45,58	2353,22	0,187	2,9415
KH2PO4	7,00	47,00	1029,03	0,187	1,286
K2HPO4	3,00	48,77	344,47	0,188	0,4306
MgSO4*7H2O	3,00	48,18	243,43	0,188	0,3043
CaCl2*2H2O	1,32	49,29	179,58	0,188	0,2253
NaCl	1,00	49,54	342,23	0,187	0,4276
FeCl3	0,10	49,97	12,33	0,075	0,0062
H2O (agua destilada mL)				148,8	

Planilla de diseño experimental:

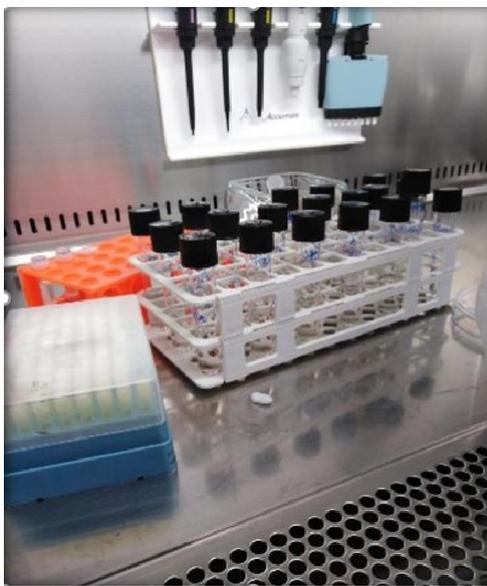


Figura 19. Cámara de bioseguridad utilizada para la purificación de la cepa.

Se ocuparon 7 muestras en diferentes condiciones:

- Muestra 1 y 2 Glicerol (4 °C).
- Muestra 3 congelada en el refrigerador (-20°C).
- Muestra 4 de APB+Fs a 4° C desde el 01/09/19.
- Muestra 5 de APB+Amp/Fs a 4° C desde 01/09/19.
- Muestra 6 de APA+ Amp a 4°C desde 14/03/19.
- Muestra 7 fertilizante comercial a 10 °C desde 24/07/2020.

*APB: Algal protease Broth (caldo de alga proteico).

*APA: Algal protease agar (agar de alga proteico).

En total siete fueron las muestras de la cepa *tetrademus obliquus* disponibles para la purificación, cada una de ellas provenientes de condiciones diferentes. Las muestras fueron inoculadas en tubos de ensayos de 5 mL con el medio cultivo previamente descrito y se les añadió 40 uL de Ampicilina (Amp) y 5 uL de Fungisona (Fs), con una concentración de 25 mg/mL y 2,5

mg/mL respectivamente. Por otro lado, también se inocularon en tubos de ensayo de 5 mL con el medio Bristol previamente descrito pero esta vez no se añadió Ampicilina ni Fungisona. En paralelo, las muestras fueron sembradas en placas Petri de 15 mL con el medio de cultivo con agar previamente descrito y 120 uL de Ampicilina y 15 uL de Fungisona, con una concentración de 25 mg/mL y 2,5 mg/mL respectivamente. Además, se sembraron en placas Petri de 15 mL con el medio de cultivo con agar previamente descrito pero esta vez sin antibióticos ni fungicidas. En la tabla 6, podemos ver la distribución de las muestras y la cantidad inoculada en cada una respectivamente. Todos los ensayos fueron incubados a 20°C, con una fuente de luz de aproximadamente 17000 lux.

Tabla 6. Cantidad añadida de muestra respectivamente a cada ensayo.

Muestra	Cantidad uL	Tubos de ensayo	Placa Petri
1	100	APB/APB+Amp/Fs	APA/APA+Amp/Fs
2	100	APB/APB+Amp/Fs	APA/APA+Amp/Fs
3	25	APB/APB+Amp/Fs	APA/APA+Amp/Fs
4	50	APB/APB+Amp/Fs	APA/APA+Amp/Fs
5	50	APB/APB+Amp/Fs	APA/APA+Amp/Fs
6	-	APB/APB+Amp/Fs	APA/APA+Amp/Fs
7	25	APB/APB+Amp/Fs	APA/APA+Amp/Fs

Luego de siete días de incubación solo la muestra 6 y 7 lograron crecer, tanto en el tubo de ensayo con antibióticos como en el sin antibióticos, comportamiento que se repite en las placas Petri donde solamente la muestra 6 y 7 lograron proliferar. La muestra 7 mostraba presencia de otros microorganismos por lo que se decidió usar la muestra 6 para las siguientes etapas de purificación.

9.2 PURIFICACIÓN DE LA CEPA DE TETRADESMUS OBLIQUUS: PARTE 2

Procedimiento para los medios de cultivo:

En una botella de 500 mL se colocan 295,2 mL de agua milli-Q y se procede a agregarle los stocks del medio Bristol, para obtener un medio de cultivo Bristol de 300 ml, luego se añaden 0,3 g de peptona de proteasa y 4,5 g de agar. El medio de cultivos se cierra y se recubre con papel señalando la fecha, que es lo que contiene y quien lo hizo, posteriormente se le adhiere una cinta de autoclave y se auto clavan a 120°C durante 15 min.

En dos matraces Erlenmeyer de 500 mL se adhieren a cada uno 248,8 mL de agua milli-Q y se procede a agregarle los stocks del medio Bristol, para obtener un medio Bristol de 300 mL, luego se añade 0,25 g de peptona de proteasa. Luego los matraces son sellados con un tapón de algodón hidrofóbico y gaza, se recubre con papel señalando la fecha, que es lo que contiene y el responsable, posteriormente se le adhiere una cinta de autoclave y se auto clavan a 120° C durante 15 min.

Por otro lado, se preparan los tubos eddendorf, las puntas y el agua milli-Q para ser recubiertas con papel señalando la fecha, que es lo que contienen y quien lo hizo, posteriormente se le adhiere una cinta de autoclave y auto clavan a 120°C durante 15 min.

Procedimiento de Medio de cultivo TSB:

En una botella de 500 mL se agregan 286,5 mL de agua milli-Q y se agregan 9 gramos de TSB (tripticase soy broth) y 4,5 g de agar, obteniendo 300 mL de medio de cultivo. Luego las botellas se cierran, y recubren con papel señalando la fecha, que es lo que contiene y quien lo hizo. Posteriormente se adhiere una cinta de autoclave y se auto clavan a 120°C durante 15 min.

Planilla diseño experimental

Se determinó que la muestra 6, eran las más viable para su purificación, por lo que se sembró en una placa Petri en duplicado. Por otro lado, se inoculo 2,5 mL de la muestra en un matraz Erlenmeyer de 500 mL con 247,5 mL medio de cultivo Bristol en duplicado. Todos los ensayos fueron incubados a 20°C con una fuente de luz de aproximadamente 17000 lux.

Luego de 15 días de crecimiento se puede apreciar en el medio sólido, las colonias de microalgas y a partir de aquellas más aisladas se hacen repiques a una nueva placa Petri. Por otro lado, al medio suspendido se le fue monitorizando la absorbancia para cuantificar su crecimiento, pero se pudo apreciar de manera cualitativa que el medio estaba contaminado, debido a un color opaco en el matraz y por el olor característico de las bacterias. Por ende, se decidió realizar un segundo repique a la placa Petri, pero esta vez se inoculo un tubo de ensayo de 5 ml con Amp+Fs, con una concentración de 25 y 2,5 mg/mL respectivamente. Ambas muestras, es decir, la nueva placa Petri sembrada y el tubo de ensayo de 5 mL fueron incubados a 20°C y una fuente de aproximadamente 17000 lux.

En las figuras 20 y 21 podemos apreciar, el resultado de la placa sembrada con el repique del frente de crecimiento y el tubo de ensayo inoculado con aquellas microalgas más aisladas. Se cree de manera cualitativa por el color y la pureza de las colonias que lo más probable es que ambas muestras estén puras, pero para determinarlo con seguridad, se hizo un último ensayo en que se prepararon placas de TSA (tripticasa de soya), el cual es un medio rico en fuente de carbono e ideal para el crecimiento de bacterias y se dispuso a sembrar del tubo de ensayo a placas de TSA en duplicado. Las muestras se incubaron a 30 °C, sin presencia de luz.

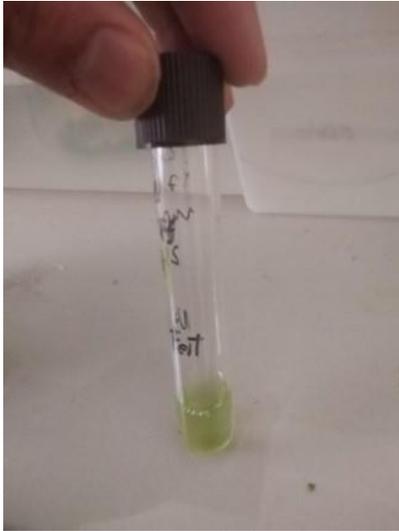


Figura 20 y 21 . Crecimiento en medio solido y liquido de la *Tetradasmus obliquus*.

El trasfondo de este último ensayo era demostrar la pureza de las muestras mediante la adición de nutrientes específicos para bacterias, de esta manera, tras siete días de crecimiento, si no se observaba la presencia de ningún microorganismo en las placas, se podía inferir que la muestra estaba libre de bacterias, en cambio si se observaba presencia de microorganismos en la placa Petri, se puede asegurar que la muestra no estaba pura. Luego de siete días de incubación, las placas de TSA no mostraron crecimiento de ningún tipo de microorganismos, en la figura 22 podemos apreciar la placa de TSA, con la que podemos asegurar que la cepa de tetradasmus obliquus esta pura.



Figura 22. Placa de TSA sembrada con tetradasmus obliquus luego de 7 días de cultivo.

9.3 CURVAS DE CALIBRACIÓN AMONIO

Especificaciones:

Rango: 0 a 10 mg/L.

Resolución: 0,01 mg/L.

Exactitud: ± 0.05 mg/L $\pm 5\%$ de la lectura.

Longitud: 420 nm.

Para la curva de calibración del amonio, en primer lugar, se deben extrapolar los volúmenes de reactivos a utilizar. En el fotómetro de HANNA, para una muestra de 10 mL se requieren utilizar 4 gotas del reactivo A y 4 gotas del reactivo B, entonces, con la ayuda de una pipeta de 200 uL se determinó que el volumen ocupado por 4 gotas de los reactivos es de 140 uL. Luego se debe extrapolar el volumen usado en 10 mL utilizado en las cubetas del fotómetro de HANNA a los 300 uL de los pocillos usados en el epoch. En la ecuación 6, se puede apreciar la cantidad de reactivos necesaria a utilizar en los pocillos de 300 uL.

$$10000 \text{ uL} = 140 \text{ ul}$$

$$300 \text{ uL} = 4,2 \text{ uL}$$

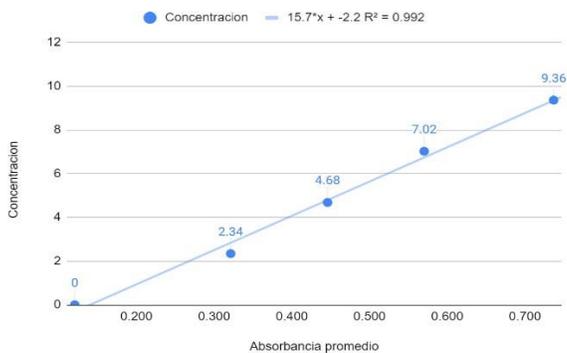
Ecuación 6. Regla de tres utilizada para determinar el volumen necesario de reactivo A y B.

Luego de haber determinado los volúmenes de reactivos a utilizar, se necesita utilizar un estándar de amonio para hacer las curvas de calibración. En este caso, se disponía de un estándar de amonio de 100 ppm, por lo que se diluyó 10 veces para obtener un estándar de 10 ppm. Dicho estándar se midió en el fotómetro en triplicado para corroborar la concentración, obteniéndose como promedio una concentración de 11,7 mg/L, posteriormente se hicieron diluciones con agua destilada. En la tabla 7 podemos observar las diluciones hechas, el volumen de muestra y agua destilada utilizado respectivamente.

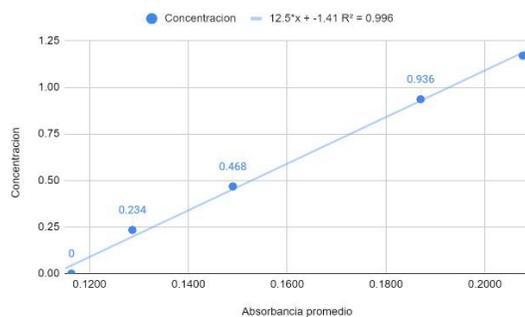
Tabla 7. Diluciones hechas a partir del estándar de 11,7 mg/L de amonio.

Concentración mg/mL	std uL	DW uL
100	300.00	0.00
80	240.00	60.00
60	180.00	120.00
40	120.00	180.00
20	60.00	240.00
0	0.00	300.00

Posteriormente se configuro el equipo epoch para hacer una cinética de reacción durante 60 minutos y así determinar cuando la reacción es estable. Una vez determinado el tiempo de reacción, la cual en el que caso del amonio fue de 15 min, se grafica la absorbancia obtenida en dicho tiempo y la concentración del compuesto, obteniéndose una curva, la cual linealizamos, obteniendo su coeficiente de determinación (R^2) y la ecuación de la recta. Finalmente, con dicha ecuación podemos relacionar directamente la absorbancia de la muestra, con la concentración de los compuestos. En la figura 23, podemos apreciar la curva de calibración, en este caso se le quito el primer punto correspondiente a la concentración más alta ya que se alejaba de la tendencia lineal y del rango máximo de los reactivos, y de esta manera obtener una ecuación más precisa y con menos error. Cabe señalar que se hizo el mismo procedimiento, pero en un rango más acotado, en el que la máxima concentración fue de 1,7 mg/L de amonio, esto se debe a que, si la muestra contiene una baja concentración de este compuesto, la curva de 11,7 mg/L hubiese tenido un error significativo. Finalmente se calculó la desviación estándar relativa en las mediciones la cual fue de 8,8%, lo que se debe a diversos factores como turbiedad de la muestra, homogeneidad, exactitud y resolución de los reactivos. Es necesario destacar que todas las mediciones fueron realizadas en triplicado para una mayor robustez en las mediciones.



a)



b)

Figura 23. a) curva de calibración del amonio con un máximo de concentración de 9,36 mg/L y b) curva de calibración de amonio con un máximo de concentración de 1,17 mg/L.

9.4 CURVA DE CALIBRACIÓN DE NITRATO

Especificaciones:

Longitud: 220 y 275 nm.

Para la curva de calibración del nitrato no se utilizaron reactivos del HANNA, si no que se utilizó el principio de determinación de nitrato en agua por espectrofotometría UV. Esta técnica de monitoreo mide la absorbancia del nitrato (NO_3^-) a 220 nm y es adecuada para aguas con bajo contenido de materia orgánica, como aguas naturales sin contaminar y fuentes de agua potable. A su vez la materia orgánica disuelta también puede absorber a 220 nm, pero el NO_3^- no absorbe a 275, se usa una segunda medición a 275 nm para corregir el valor de NO_3^- presente en la muestra.

Entonces en nuestro caso se utilizó un estándar de 18,6 mg/L hecho a partir de NaNO_3 , el cual se midió por triplicado en el fotómetro para corroborar dicha concentración y posteriormente se hicieron las diluciones con agua destilada. En la tabla 8 podemos observar las diluciones hechas, el volumen de muestra y agua destilada utilizado respectivamente.

Tabla 8. Diluciones hechas a partir del estándar de 20 mg/L de nitrato.

Concentración mg/mL	std uL	DW uL
20	300.00	0.00
16	240.00	60.00
8	120.00	180.00
4	60.00	180.00
0	0.00	300.00

Luego se procede a medir por cuatriplicado cada concentración a 220 y 275 nm en la placa para micro volúmenes (take3), y se obtiene la diferencia obtenida entre una medición y la otra. Dicha diferencia representa la absorbancia real del nitrato presente en la muestra, luego se grafican las absorbancias reales obtenida y las concentraciones hechas, obteniéndose una curva, la cual linealizamos, para así encontrar su coeficiente de determinación (R^2) y la ecuación de la recta. Finalmente, con dicha ecuación podemos relacionar directamente la absorbancia de la muestra, con la concentración de los compuestos. En la figura 24, podemos apreciar la curva de calibración del nitrato en el que se obtuvo un R de 0,984. Cabe mencionar que se calculó la desviación estándar relativa en las mediciones la cual fue de 6,44%, lo que se debe a diversos factores como turbiedad de la muestra, homogeneidad, exactitud y resolución de los reactivos. Es necesario destacar que todas las mediciones fueron realizadas en cuatriplicado para una mayor robustez en las mediciones.

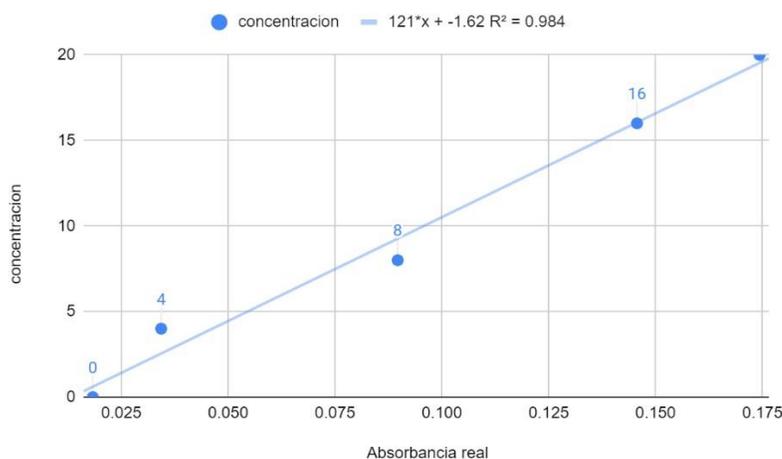


Figura 24. Curva de calibración del nitrato con un máximo de concentración de 20 mg/mL.

9.5 CURVA DE CALIBRACIÓN DEL NITRITO

Especificaciones:

Longitud: 505 nm.

Para la curva de calibración del nitrito, en primer lugar, se deben extrapolar los volúmenes de reactivos a utilizar. En el fotómetro de HANNA, para una muestra de 10 mL se requiere utilizar el sobre entero del reactivo A, entonces en primer lugar se determinó mediante prueba y error la solubilidad del compuesto A en agua destilada, en donde se determinó que un sobre era capaz de disolverse en 5 mL. Luego se debe extrapolar el volumen usado en 10 mL utilizado en las cubetas del fotómetro de HANNA a los 300 uL de los pocillos usados en el epoch. En la ecuación 7, se puede apreciar la cantidad de reactivos necesaria a utilizar en los pocillos de 300 uL.

$$10000 \text{ uL} = 5000 \text{ ul}$$

$$300 \text{ uL} = 150 \text{ uL}$$

Ecuación 7. Regla de tres utilizada para determinar el volumen necesario de reactivo A y B.

Luego de determinar los volúmenes de reactivos a utilizar, se necesita obtener un estándar de nitrito para hacer las curvas de calibración. En este caso no se poseía una solución que contuviese dicho compuesto por lo que se utilizó agua de pague rica en nitrito. El agua fue filtrada para remover cualquier tipo de partículas suspendida o compuesto orgánico que puede alterar las mediciones y se hicieron mediciones de los compuestos presentes en el agua para determinar si es que existía alguna agente interferente. Entonces se dispuso a medir por triplicado la muestra de nitrito obtenida y se obtuvo que contenía 1,037 mg/ml, y posteriormente se hicieron diluciones con agua destilada. En la tabla 9 podemos observar las diluciones hechas, el volumen de muestra y agua destilada utilizado respectivamente.

Tabla 9. Diluciones hechas a partir del estándar de 20 mg/L de nitrito.

Concentración mg/mL	std uL	DW uL
1.037	150.00	0.00
0.8296	120.00	30.00
0.6222	90.00	60.00
0.4148	60.00	90.00
0.2074	30.00	120.00
0	0.00	150.00

Posteriormente se configuro el equipo epoch para hacer una cinética de reacción durante 60 minutos y así determinar cuando la reacción es estable. Una vez determinado el tiempo de reacción, la cual en el que caso del nitrito fue de 15 min, se grafica la absorbancia obtenida en dicho tiempo y la concentración del compuesto, obteniéndose una curva, la cual linealizamos, obteniendo su coeficiente de determinación (R^2) y la ecuación de la recta. Finalmente, con dicha ecuación podemos relacionar directamente la absorbancia de la muestra, con la concentración de los compuestos. En la figura 25, podemos apreciar la curva de calibración, que en este caso obtuvimos un R^2 de 0,998.

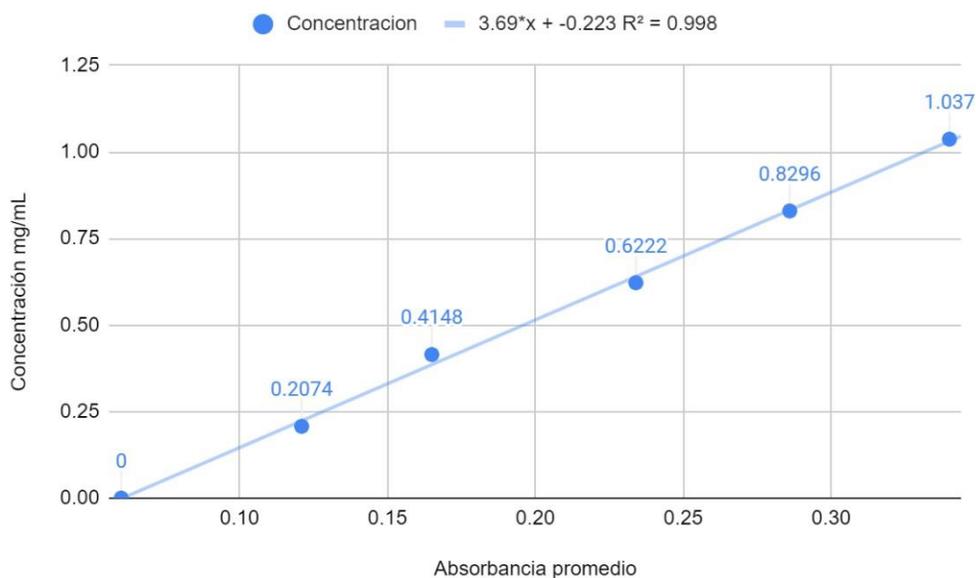


Figura 25. Curva de calibración del nitrito con un máximo de concentración de 20 mg/mL.

9.6 CURVA DE CALIBRACIÓN DEL FOSFATO

Especificaciones:

Longitud: 525 nm.

Entonces, para el caso del fosfato se utilizaban diez gotas de un reactivo A y un sachet de reactivo B para 10 mL de volumen de muestra, luego se estudió de manera empírica la solubilidad del reactivo B en agua destilada, determinándose que un sachet era posible disolverse en 1 mL de agua destilada.

A continuación, se calculó el volumen ocupado por diez gotas del reactivo A, el cual correspondió a 350 uL. Con dichos datos se logró determinar la cantidad de reactivo que debieron ser utilizados para un volumen de muestra de 300 uL (volumen de los pocillos de la placa de metacrilato del epoch). En la ecuación 8, podemos ver la cantidad de reactivo A, a utilizar en un volumen de muestra de 300 uL. De manera análoga se determinó el volumen de reactivo B que debió utilizarse, obteniéndose como resultado un volumen de 30 uL.

$$10000 \text{ uL} = 350 \text{ ul}$$

$$300 \text{ uL} = 10,5 \text{ uL}$$

Ecuación 8. Regla de tres utilizada para determinar la cantidad de reactivo necesaria.

A continuación, se necesitaba un estándar de fosfato, en este caso se utilizó una solución de ácido fosfórico al 85% v/v. En primer lugar, fue necesario determinar la concentración de fosfato presente en la solución, el cual fue de $1,4 * 10^6$ mg/L. Una vez conocida la concentración, se diluyó 100.000 veces para obtener un estándar de 14,09 mg/L, y posteriormente se hicieron diluciones con agua destilada respecto a esta concentración del 100, 80 ,60, 40, 20 y 0 % respectivamente. En la tabla 10 podemos observar las diluciones hechas, el volumen de muestra y agua destilada utilizado respectivamente.

Tabla 10. Diluciones hechas a partir del estándar de 14,09 mg/L de fosfato.

Concentracion mg/mL	std uL	DW uL
100	259.50	0.00
80	207.60	51.90
60	155.70	103.80
40	103.80	155.70
20	51.90	207.60
0	0.00	259.50

Posteriormente se configuro el equipo epoch para hacer una cinética de reacción durante 60 minutos y así determinar cuando la reacción es estable. Una vez determinado el tiempo de reacción, la cual en el que caso del fosfato fue de 20 min, se graficó la absorbancia obtenida en dicho tiempo y la concentración del compuesto, obteniéndose una curva, la cual se linealizó, obteniéndose su coeficiente de determinación (R^2) y la ecuación de la recta. Finalmente, con dicha ecuación podemos relacionar directamente la absorbancia de la muestra, con la concentración de los compuestos. En la figura 26, podemos apreciar la curva de calibración, que en este caso obtuvimos un R^2 de 0,993. e

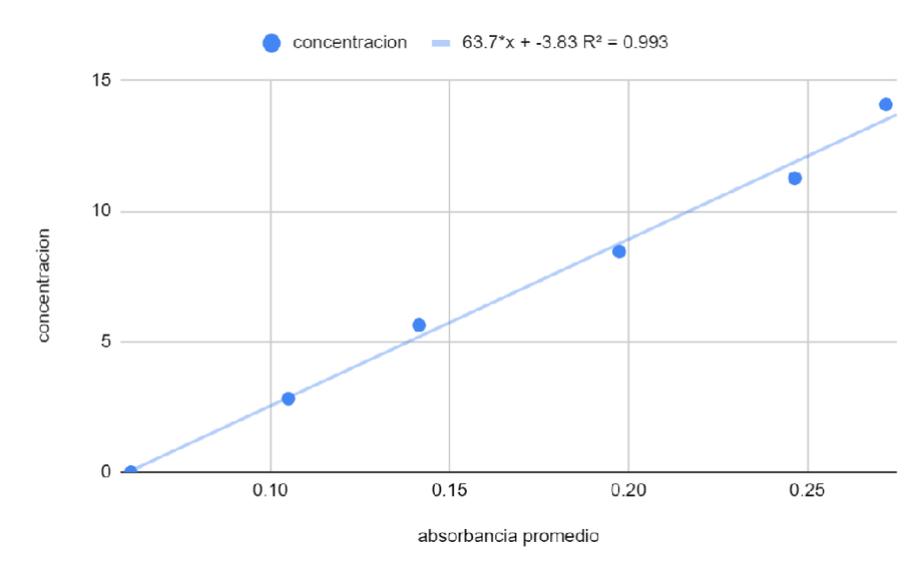


Figura 26. Curva de calibración del fosfato con un máximo de concentración de 14 mg/mL.