



# **Obtención de un biofertilizante a partir del cultivo de *Spirulina platensis* en aguas residuales domésticas provenientes del campamento de la estación de bombeo de crudo Rubiales**

**Flor Elizabeth Moreno García**

Universidad De Manizales

Facultad De Ciencias Contables, Económicas Y Administrativas

Maestría En Desarrollo Sostenible Y Medio Ambiente

Manizales, Colombia

2016

# **Obtención de un biofertilizante a partir del cultivo de *Spirulina platensis* en aguas residuales domésticas provenientes del campamento de la estación de bombeo de crudo Rubiales**

**Flor Elizabeth Moreno García**

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente**

Director: Dr. Carlos Arturo Granada Torres.

Línea De Investigación:

Biosistemas Integrados

Universidad De Manizales

Facultad De Ciencias Contables, Económicas Y Administrativas

Maestría En Desarrollo Sostenible Y Medio Ambiente

Manizales, Colombia

2016

*A Dios por ser mi refugio, a mis padres por su amor incondicional, por ser la inspiración y motivación que me lleva a iniciar mis proyectos de vida, a mi hermano por ser el mejor ejemplo de dedicación y constancia, quien me ha apoyado en cada paso que doy, a Mariangel la chiquis de la familia y a una persona muy especial que estuvo conmigo durante la batalla.*

**Flor Elizabeth Moreno García**

## **Agradecimientos.**

A la Universidad de Manizales por la calidad de educación impartida y por brindarnos la motivación para generar procesos de investigación.

Al Doctor Carlos Arturo Granada Torres por su acompañamiento y guía permanente para sacar este proyecto adelante, por transmitirme su valioso conocimiento y perseverancia.

## Resumen

El desarrollo de este proyecto es el resultado de evaluar una problemática generada por el manejo de las aguas residuales domésticas, en el campamento de la estación de bombeo Rubiales, ubicada en el km 167 vía Puerto Gaitán – Rubiales, departamento del Meta, en donde se pretende dar valor agregado a este recurso hídrico degradado, para ser transformado mediante el uso de la microalga *Spirulina platensis*, en un producto de interés como lo son los biofertilizantes. El proyecto se desarrolló en 4 etapas a escala laboratorio, la primera que corresponde a la adaptación del mismo a las condiciones ambientales de la zona usando medio de cultivo zarrouk, la segunda fue la reproducción de la *Spirulina platensis* en un medio de cultivo conformado por 50% de aguas residuales domésticas tratadas y 50% de medio zarrouk, la tercera etapa donde se realizaron 6 bioensayos por duplicado, mediante la adaptación de fotobiorreactores, que contenían diferentes concentraciones de aguas residuales domésticas tratadas (100%, 95%, 90%, 85%, 80%) y un fotobiorreactor con 100% de zarrouk y la última etapa en donde se efectuaron comparaciones teniendo en cuenta los resultados de la composición del producto alcanzado en los 12 fotobiorreactores y la de biofertilizantes como el CBFERT y BIOPLASMA. Las variables evaluadas durante las tres primeras etapas corresponden a pH, temperatura y densidad poblacional y los parámetros comparados en la etapa 4 fueron nitrógeno, fósforo, magnesio, manganeso, zinc, potasio, hierro.

Los resultados obtenidos determinaron que la microalga se adapta paulatinamente a las condiciones ambientales brindadas por el lugar donde se desarrolló el proyecto, así como a las aguas residuales domésticas tratadas que sirvieron de sustrato; el medio que contenía 85% de aguas residuales domésticas tratadas es el más adecuado para el crecimiento de la *Spirulina platensis* y al comparar los resultados obtenidos de la etapa 4 con los biofertilizantes CBFERT y BIOPLASMA se evidenció una composición (nitrógeno, potasio y fósforo) adecuada en los bioensayos realizados, permitiendo que estos sean usados como biofertilizantes.

**Palabras clave:** Aguas residuales domésticas, *Spirulina platensis*, biofertilizante, fotobiorreactores, transformación, bioensayo.

## Abstract

The development of this project is the result of evaluating a problem generated by the management of domestic wastewater in the Rubiales pumping station camp, located at km 167 Puerto Gaitán - Rubiales, Meta department, where is intended to add value to this degraded water resource, to be transformed using the microalga *Spirulina platensis*, in a product of interest such as biofertilizers.

The project was developed in 4 stages at laboratory scale, the first one corresponding to the adaptation of the same to the environmental conditions of the area using zarrouk culture medium, the second was the reproduction of *Spirulina platensis* in a culture medium conformed by 50 % Of treated domestic wastewater and 50% zarrouk medium, the third stage where 6 bioassays were performed in duplicate, by the adaptation of photobioreactors, containing different concentrations of treated domestic wastewater (100%, 95%, 90%, 85 %, 80%) and a photobioreactor with 100% zarrouk and the last stage where comparisons were made taking into account the results of the product composition achieved in the 12 photobioreactors and of biofertilizers such as CBFERT and BIOPLASMA. The variables evaluated during the first three stages correspond to pH, temperature and population density and the parameters compared in stage 4 were nitrogen, phosphorus, magnesium, manganese, zinc, potassium, iron.

The results obtained determined that the microalga is gradually adapted to the environmental conditions provided by the place where the project was developed, as well as the treated domestic wastewater that served as substrate; The medium containing 85% of treated domestic wastewater is the most suitable for growth of *Spirulina platensis* and comparing the results obtained from stage 4 with the biofertilizers CBFERT and BIOPLASMA showed a suitable composition (nitrogen, potassium and phosphorus) In the bioassays made, allowing them to be used as biofertilizers.

**Key words:** domestic sewage, *Spirulina platensis*, biofertilizer, fotobioreactors, transformation, bioassay.

## Contenido

Resumen y abstract .....	V
Lista de tablas .....	IX
Lista de graficas .....	X
Introducción .....	12
<b>1. Planteamiento del problema</b> .....	<b>14</b>
<b>2. Justificación</b> .....	<b>15</b>
<b>3. Pregunta de investigación</b> .....	<b>16</b>
<b>4. Metodología</b> .....	<b>16</b>
<b>5. Población y muestra</b> .....	<b>16</b>
<b>6. Objetivos</b> .....	<b>17</b>
6.1 General .....	17
6.2 Específicos .....	17
<b>7. Hipótesis</b> .....	<b>17</b>
<b>8. Marco teórico</b> .....	<b>18</b>
8.1 Aguas residuales domésticas .....	18
8.1.1 Aspectos físicos .....	18
8.1.2 Aspectos químicos .....	19
8.1.3 Aspectos Microbiológicos .....	20
8.2 Microalgas .....	21
8.2.1 Parámetros para un cultivo de microalgas .....	22
8.3 <i>Spirulina platensis</i> .....	23
8.3.1 Composición de la <i>Spirulina platensis</i> .....	24
8.4 Biofertilizante a partir de aminoácidos .....	26
<b>9. Desarrollo experimental</b> .....	<b>28</b>
9.1 Materiales y métodos .....	28
9.1.1 Microalga .....	28
9.1.2 Medio de cultivo .....	28
9.1.3 Densidad celular .....	29
9.1.4 pH y temperatura .....	30

**8 Obtención de un biofertilizante a partir del cultivo de *Spirulina platensis* en aguas residuales domésticas provenientes del campamento de la estación de bombeo de crudo Rubiales**

---

9.1.5 Agitación .....	30
9.1.6 Aguas residuales.....	31
9.1.7 Análisis de laboratorio .....	31
9.1.8 Presentación y análisis de resultados .....	31
<b>10. Resultados y discusiones.....</b>	<b>33</b>
10.1 Etapa 1 .....	33
10.2 Etapa 2 .....	37
10.3 Etapa 3 .....	42
10.4 Etapa 4 .....	55
<b>11. Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>59</b>
11.1 Conclusiones .....	59
11.2 Recomendaciones .....	60
<b>Anexos .....</b>	<b>61</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>64</b>

Lista de tablas

<b>Tabla 7-1:</b> Contenido de aminoácidos de la <i>Spirulina platensis</i> según (Vonshka, 1996).....	24
<b>Tabla 7- 2:</b> Contenido de vitaminas de la <i>Spirulina</i> , (Belay, 1997.....	25
<b>Tabla 7-3:</b> Contenido de minerales de la <i>Spirulina platensis</i> .....	25
<b>Tabla 9-1:</b> Composición del medio Zarrouk (Zarrouk, 1966) .....	29
<b>Tabla 9-2:</b> Parámetros analizados a los 12 fotobiorreactores .....	31
<b>Tabla 10-1:</b> coeficiente de correlación fotobiorreactores etapa 1. ....	36
<b>Tabla 10-2:</b> coeficiente de correlación fotobiorreactores etapa 2. ....	41
<b>Tabla 10-3:</b> Coeficiente de correlación fotobiorreactores 1A y 1B correspondientes a la etapa 3. ....	46
<b>Tabla 10-4:</b> Coeficiente de correlación fotobiorreactores 2A y 2B correspondientes a la etapa 3. ....	47
<b>Tabla 10-5:</b> Coeficiente de correlación fotobiorreactores 3A y 3B correspondientes a la etapa 3. ....	47
<b>Tabla 10-6:</b> Coeficiente de correlación fotobiorreactores 4A y 4B correspondientes a la etapa 3. ....	48
<b>Tabla 10-7:</b> Coeficiente de correlación fotobiorreactores 5A y 5B correspondientes a la etapa 3. ....	48
<b>Tabla 10-8:</b> Coeficiente de correlación fotobiorreactores 6A y 6B correspondientes a la etapa 3. ....	48
<b>Tabla 10-9:</b> Parámetros analizados a los 12 fotobiorreactores .....	55
<b>Tabla 10-10:</b> Resultados de análisis de laboratorio frente a comparativo realizado entre CBFERT y BIOPLASMA.....	56

## **Lista de gráficas**

<b>Gráfica 9-1:</b> Diseño experimental .....	32
<b>Gráfica 10-1:</b> pH de los 6 fotobiorreactores en etapa 1. ....	33
<b>Gráfica 10-2:</b> Temperatura en °C de los 6 fotobiorreactores en etapa 1. ....	34
<b>Gráfica 10-3:</b> densidad poblacional obtenida en los 6 fotobiorreactores en etapa 1. .....	35
<b>Gráfica 10-4:</b> Superficie de respuesta etapa 1, que muestra la densidad poblacional en función de la temperatura y el pH. ....	36
<b>Gráfica 10-5:</b> PH etapa 2. ....	38
<b>Gráfica 10-6:</b> temperatura de los 6 fotobiorreactores correspondientes a la etapa 2. .....	39
<b>Gráfica 10-7:</b> Densidad poblacional de los 6 fotobiorreactores correspondientes a la etapa 2. ....	40
<b>Gráfica 10-8:</b> Superficie de respuesta etapa 2, que muestra la densidad poblacional en función de la temperatura y el pH. ....	41
<b>Gráfica 10-9:</b> PH correspondiente a los 12 fotobiorreactores de la etapa 3 .....	43
<b>Gráfica 10-10:</b> Temperatura correspondiente a los 12 fotobiorreactores de la etapa 3 .....	44
<b>Gráfica 10-11:</b> Densidad poblacional correspondiente a los 12 fotobiorreactores de la etapa 3 .....	45
<b>Gráfica 10-12:</b> Superficie de respuesta etapa 3, fotobiorreactores 1A, 1B, que muestra la densidad poblacional en función de la temperatura y el pH. ....	49

<b>Gráfica 10-13:</b> Superficie de respuesta etapa 3, fotobiorreactores 2A, 2B, que muestra la densidad poblacional en función de la temperatura y el pH. ....	50
<b>Gráfica 10-14:</b> Superficie de respuesta etapa 3, fotobiorreactores 3A, 3B, que muestra la densidad poblacional en función de la temperatura y el pH. ....	51
<b>Gráfica 10-15:</b> Superficie de respuesta etapa 3, fotobiorreactores 4A, 4B, que muestra la densidad poblacional en función de la temperatura y el pH. ....	52
<b>Gráfica 10-16:</b> Superficie de respuesta etapa 3, fotobiorreactores 5A, 5B, que muestra la densidad poblacional en función de la temperatura y el pH. ....	53
<b>Gráfica 10-17:</b> Superficie de respuesta etapa 3, fotobiorreactores 6A, 6B, que muestra la densidad poblacional en función de la temperatura y el pH. ....	54
<b>Gráfica 10-18:</b> Comparación de nutrientes mg/L entre los resultados obtenidos en los fotobiorreactores, CBFERT y BIOPLASMA. ....	56

## **Introducción**

En el artículo 3 de la Ley 99 de 1993 se menciona el desarrollo sostenible como “aquel que conduzca al crecimiento económico, a la elevación de la calidad de vida y al bienestar social, sin agotar la base de recursos en que se sustenta, ni deteriorar el medio ambiente o el derecho de las generaciones futuras a utilizar para la satisfacción de sus principales necesidades”, por lo tanto la necesidad de implementar procesos biológicos para la generación de productos o servicios, además de optimizar los procedimientos ya existentes, con el fin de incentivar el desarrollo sostenible de las comunidades, ocasiona la creación de procesos que vinculen la utilización de residuos, haciendo de estos materia prima de gran interés.

“Las aguas residuales son una mezcla compleja de materiales naturales orgánicos e inorgánicos, así como compuestos artificiales. Tres cuartas partes de carbono orgánico en aguas residuales están presentes como carbohidratos, grasas, proteínas, aminoácidos y ácidos volátiles” (Raouf, Homaidan, Ibraheem, 2012, p. 259), existen diferentes tipos de tratamientos para las aguas residuales, el problema radica en que, el resultado final es un efluente claro, aparentemente limpio, que es descargado en cuerpos de agua naturales. Este efluente secundario, sin embargo, está cargado con nitrógeno inorgánico y fósforo y causa eutrofización y más problemas a largo plazo debido a materiales orgánicos refractarios y metales pesados que son descargados (Raouf, et al, 2012, p. 259).

En el caso de las microalgas como una de las opciones más acertadas para generar valor agregado a este tipo de residuos líquidos, podemos mencionar los avances significativos, debido a que estas tienen la capacidad de crecer y hacer fotosíntesis con diferentes fuentes de nutrientes, como las sales minerales, en condiciones autotróficas y sustancias orgánicas (como estiércoles y aguas residuales), en condiciones mixotróficas (chinnasamy, et al. 2010). La versatilidad de estos microorganismos y su composición, permiten ser utilizados en diferentes procesos de interés biotecnológico, para la industria farmacéutica, la alimentación animal, nutrición humana, generación de biocombustibles, tratamientos para la

**Obtención de un biofertilizante a partir del cultivo de *Spirulina platensis* en aguas residuales 13 domésticas provenientes del campamento de la estación de bombeo de crudo Rubiales**

descontaminación de aguas industriales y domésticas, así como también biofertilizantes.

El uso de este microorganismo podría presentarse como una solución biotecnológica, frente a la problemática de la disposición final de las aguas residuales domésticas generadas en el campamento de la estación de bombeo de crudo RUBIALES, ya que al proporcionar valor agregado a este residuo, se eliminaría su disposición final, generando importantes beneficios a nivel ambiental, social y económico.

# 1. Planteamiento del problema

Las actividades ambientales que se desarrollan en la estación de bombeo de crudo RUBIALES, ubicada en el kilómetro 167 vía Puerto Gaitán Rubiales, departamento del Meta, se encuentran enmarcadas en el Plan de Manejo Ambiental (PMA) y la licencia ambiental 1712 de 2006, modificada por las resoluciones 1623 de 2010 y 182 de 2014, estos documentos señalan entre otros, los procesos que se deben llevar a cabo para el adecuado manejo de las aguas residuales domésticas, en el campamento donde pernocta el personal que labora dentro de la estación.

Una de las prácticas que se recomienda dentro del PMA (Plan de Manejo Ambiental) para el tratamiento de las aguas residuales domésticas, es la utilización de plantas de tratamiento, para este caso específico el campamento está diseñado para albergar aproximadamente 200 personas, por lo tanto se tiene instalado y en funcionamiento dos Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales tipo BIOPACK cuyo proceso se caracteriza por ser aeróbico mediante lodos activados. Para garantizar la eficiencia de remoción y el cumplimiento de la normatividad ambiental vigente, como lo es el decreto 1594 de 1984 y el 3930 de 2010 se realizan mensualmente análisis microbiológicos y fisicoquímicos a dichas aguas residuales; inmediatamente finaliza el tratamiento se continúa con la disposición final de la misma, actividad que se realiza en el campo de aspersión aledaño al campamento aprobado por la licencia ambiental. En época invernal el suelo donde se encuentra el campo de aspersión se observa ciertas áreas saturadas por el exceso de agua lluvia y el vertimiento de las aguas residuales domésticas tratadas.

La generación de estas aguas en el campamento corresponde aproximadamente a un promedio de 27000 litros diarios, que al ser vertidos en el campo de aspersión, puede ocasionar de cierta manera impactos negativos a los ecosistemas que se encuentran cercanos al campamento, los cuales corresponden a sabana, morichal y rastrojo; alterando la composición y equilibrio natural de los recursos suelo y agua.

Los biofertilizantes representan una solución bastante atractiva para la implementación de agricultura sostenible, partiendo de prácticas que generen beneficios tanto para el recurso suelo, como para las plantas, aportando los nutrientes necesarios, sin saturar el suelo y agotar su diversidad microbiológica, debido a que la muerte de organismos presentes en el suelo, es solo una de las causas, por las cuales los fertilizantes químicos únicamente contribuyen al debilitamiento de los suelos y a la dependencia de estas sustancias por parte de las plantas, ya que sin ellos las plantas pierden la capacidad de absorber importantes sustancias de la tierra (López, 2011, p. 35).

## **2. Justificación**

Es importante el desarrollo de acciones que conlleven a la protección de los recursos y los ecosistemas que nos brinda la naturaleza, debido a que estos generan el equilibrio en el planeta; Odum (1992) define el ecosistema como “cualquier unidad que incluya la totalidad de los organismos de un área determinada, que actúa en reciprocidad con el medio físico, de modo que una corriente de energía conduzca una estructura trófica, una diversidad biótica y a ciclos materiales”. Por lo tanto se hace necesario crear procesos que contribuyan a mitigar los impactos negativos que se generan por la disposición de aguas residuales domésticas y que puedan afectar a algunos ecosistemas cercanos al campamento.

Teniendo en cuenta que se producen aproximadamente 27 metros cúbicos diarios de aguas residuales domésticas, el proyecto pretende mediante un proceso biotecnológico dar valor agregado a este recurso hídrico degradado, en donde se realicen acciones de transferencia de tecnología a las comunidades área de influencia de la estación de bombeo de crudo; teniendo en cuenta los parámetros de una producción más limpia, los resultados del proyecto se pueden presentar como valor agregado, en términos de Responsabilidad Social Empresarial – RSE a las autoridades ambientales, debido a que se realiza la mitigación de los impactos negativos, generados por la disposición final de estas aguas residuales domésticas

y la eliminación por completo de este tipo de residuo líquido dentro del campamento.

### **3.Pregunta de investigación**

¿De qué manera se puede obtener un biofertilizante a partir de *Spirulina platensis* cultivada en las aguas residuales domésticas generadas en la estación de bombeo de crudo RUBIALES?

### **4.Metodología**

Investigación de tipo cuantitativa, teniendo en cuenta que una de las principales características de esta metodología es permitir examinar datos de manera numérica y a través de este tipo de medición buscar la certeza de la investigación, de tipo experimental ya que se van a medir ciertas variables como pH, temperatura, densidad poblacional.

Al desarrollar el proyecto planteado se buscó que a través de procedimientos lograr un objetivo, enmarcado en datos sólidos y repetibles, así como una medición controlada y objetiva orientada al resultado, herramientas que se pueden desarrollar utilizando la metodología cuantitativa, la cual de acuerdo al planteamiento de la investigación permitió recopilar y analizar datos en forma numérica para la construcción de hipótesis.

### **5.Población y muestra**

La población determinada para esta investigación corresponde a las aguas residuales domésticas generadas en el campamento de la estación de bombeo de crudo RUBIALES, ubicada en el km 167 vía Puerto Gaitán - Rubiales.

La muestra corresponde a las tomas que se realizaron a estas aguas residuales después del crecimiento de la microalga, teniendo en cuenta que se realizaron procesos de caracterización de aguas, buscando comprobar la efectividad de los procedimientos realizados con la *Spirulina platensis*.

## **6. objetivos**

### **6.1 General**

Obtener un biofertilizante mediante el cultivo de *Spirulina platensis* en aguas residuales domésticas tratadas, provenientes del campamento de la estación de bombeo RUBIALES.

### **6.2 Específicos**

- Realizar el escalamiento de la microalga *Spirulina platensis*, en diferentes volúmenes de medio de cultivo Zarrouk.
- Realizar bioensayos con *Spirulina platensis* a diferentes concentraciones del agua residual tratada, con el fin de evaluar el comportamiento de la microalga sobre este sustrato.
- Identificar y caracterizar las aguas residuales domésticas tratadas procedentes de la estación EBR, después del cultivo de *Spirulina platensis*.
- Comparar el resultado obtenido en las caracterizaciones de los bioensayos, con las propiedades de otros biofertilizantes.

## **7. Hipótesis**

Las aguas residuales domésticas tratadas provenientes del campamento de la estación de bombeo de crudo RUBIALES, pueden ser utilizadas como medio de cultivo para la *Spirulina platensis* y de esta manera obtener un producto que pueda ser usado como biofertilizante.

## 8. Marco teórico

### 8.1 Aguas Residuales Domésticas

La resolución 631 de 2015 en su artículo 2 define a las aguas residuales domésticas como “Procedentes de los hogares, así como de las instalaciones en las cuales se desarrollan actividades industriales, comerciales o de servicios y que correspondan a descargas de los retretes y servicios sanitarios; descargas de los sistemas de aseo personal (duchas y lavamanos), de las áreas de cocinas y cocinetas, de las pocetas de lavado de elementos de aseo y lavado de paredes, pisos y del lavado de ropa (no se incluye las de lavandería industrial).

Al hablar de las características de las aguas residuales domésticas es primordial tener en cuenta los componentes físicos, químicos y microbiológicos, los cuales muestran el grado de deterioro en que se encuentran dichas aguas, estos están normalizados bajo el decreto 1594 de 1984, modificado por la resolución 631 de 2015.

#### 8.1.1 Aspectos físicos.

Algunos de los más importantes aspectos físicos de las aguas residuales domésticas son:

- **Sólidos totales:** Los sólidos totales incluyen toda la materia, excepto el agua contenida en los materiales líquidos. En ingeniería sanitaria es necesario medir la cantidad del material sólido contenido en una gran cantidad de sustancias líquidas y semilíquidas que van desde agua potables hasta aguas contaminadas, aguas residuales, residuos industriales y lodos producidos en proceso de tratamiento. Los sólidos totales se definen como la materia que permanecen como residuos después de evaporación y secado a 103°C. El valor de los sólidos totales incluye material disuelto y no disuelto (sólidos suspendidos) (Universidad Tecnológica De Panamá, 2006, p. 1)
- **Temperatura:** Este parámetro es de gran importancia para la vida acuática, en las reacciones químicas y velocidades de reacción ya que el oxígeno es menos

soluble en agua caliente que en agua fría. El aumento de la velocidad de las reacciones químicas que supone un aumento de temperatura, junto con la disminución del oxígeno presente en las aguas superficiales, pueden causar agotamiento de las concentraciones del oxígeno disuelto. Un cambio repentino de temperatura puede dar como resultado un alto porcentaje de mortalidad de la vida acuática. (Espinoza, Castillo, Rovira, 2014, p. 36). La temperatura del agua residual es mayor que la temperatura de agua para abastecimiento, como consecuencia de la incorporación de agua caliente proveniente del uso doméstico e industrial. Este parámetro es importante en el tratamiento de aguas residuales ya que muchos procesos biológicos dependen de la temperatura.

- Turbidez: Se define a la turbidez de una muestra de agua, como una medida de la pérdida de su transparencia, ocasionada por el material particulado o en suspensión que arrastra la corriente de agua (Cárdenas, 2005). Este material puede consistir en arcillas, limos, algas, etcétera, que se mantienen en suspensión debido a la fuerza de arrastre de la corriente o a su naturaleza coloidal. (Delgadillo. et al, 2010, p. 54)

### **8.1.2 Aspectos químicos:**

- Materia orgánica: en un agua residual de intensidad media, un 75% de los sólidos suspendidos y un 40% de los sólidos filtrables son de naturaleza orgánica, los principales grupos de sustancias orgánicas hallados en el agua residual son las proteínas (40 a 60 %), carbohidratos (25% a 50%) y grasas y aceites (10%). La urea, principal constituyente de la orina, es otro compuesto orgánico del agua residual, pero en razón de la rapidez con que se descompone es muy raramente hallada en un agua residual que no sea muy reciente (Gómez, 2005).

Unas de las medidas de materia orgánica corresponden a DBO<sub>5</sub>, DQO.

La Demanda Química de Oxígeno es la medida del equivalente de oxígeno del contenido de materia orgánica susceptible de oxidación por medio de un agente químico oxidante fuerte (UNAD, 2016).

En otros términos, es la cantidad de oxígeno que requiere el agua para descomponer toda la materia orgánica que contiene. Se utiliza además como parámetros de referencia para las pruebas de DBO (UNAD, 2016).

Semejanza del anterior, la Demanda Bioquímica de Oxígeno es una prueba empírica que cuantifica la cantidad de oxígeno requerido para que las sustancias biodegradables presentes en el agua sean destruidas, durante un tiempo de incubación (UNAD, 2016).

- pH: En las aguas residuales urbanas, el pH se encuentra entre 6,5 y 8,5. Valores elevados (mayores a 9,2) tienen efectos inhibidores del crecimiento de *E. coli*. Cuando los valores están comprendidos entre 5 y 9 (situándose los más favorables entre 6,5 y 8,5) la vida de especies acuáticas es favorecida (Delgadillo. et al, 2010, p. 73)
- Los compuestos inorgánicos incluyen nutrientes, metales pesados y gases. Los gases normalmente no son considerados en los análisis de aguas residuales debido a que la toma de muestras y la posterior determinación son procesos complicados y de alto costo. Los nutrientes son elementos químicos necesarios para el normal desarrollo de la vida. Son requeridos por los organismos como precursores o constituyentes del material celular, por ello son imprescindibles en las estaciones depuradoras de aguas residuales que van a ser sometidas a tratamiento biológico. Reciben esta denominación el carbono, el nitrógeno, el fósforo y otros elementos (Delgadillo. et al, 2010, p. 73).

### **8.1.3 Aspectos microbiológicos**

El agua residual doméstica contiene microorganismos de muchas clases, algunos de ellos muy perjudiciales para la salud por ser causantes de enfermedades. Los tipos de microorganismos más abundantes en el agua residual son bacterias, protozoos y virus. (UNAD, 2016).

Debido a que el agua residual usada para la realización de este proyecto corresponde a aguas previamente tratadas bajo un sistema aeróbico de lodos activados, la carga microbiana es mucho menor que la carga de las aguas sin depurar, para la confirmación de lo anteriormente mencionado se realizan análisis microbiológicos, cada mes a dichas aguas tratadas, el resultado en el mes de junio fue de  $25 \times 10^5$  NMP de coliformes totales, es importante resaltar que esta muestra fue tomada antes del procesos de cloración. Los análisis fueron realizados en el laboratorio Ambiental y Servicios Sanitarios LASS LTDA.

## **8.2 Microalgas**

Son organismos con una historia evolutiva mixta que tienen en común cuatro principios (Serediak, Huynh, 2006, p 8):

- Son organismos muy simples sin tejido vascular. La única excepción son las algas de color marrón ya que tienen un mayor grado de diferenciación de órganos.
- Tienen las estructuras reproductivas desnudas, es decir, no hay una capa protectora alrededor de las células de las estructuras reproductivas.
- Son fotoautotróficas, es decir, que producen sus propios materiales de alimentos a través de fotosíntesis mediante el uso de la luz solar, agua y CO<sub>2</sub>. Hay algunas excepciones, como por ejemplo algunas especies de Euglena, las cuales ingieren otros organismos para la comida, ya que no tienen cloroplastos.
- Al igual que las plantas contienen clorofila.

Las aguas residuales procedentes de actividades municipales, agrícolas e industriales potencialmente proporcionan medios rentables y sostenibles de crecimiento de las algas para biocombustibles (Pittman, 2011, p. 17), el nitrógeno y el fósforo pueden ser retirados de las aguas residuales. El proceso de eliminación de nutrientes se titula "Las algas Activado" y fue desarrollado para la eliminación de desechos orgánicos, así como los elementos nutrientes. La teoría subyacente de este proceso de eliminación de nutrientes es la de una simbiosis de algas-

bacterial (McGriff, McKinney 1972, p. 1155), una característica de las microalgas es su plasticidad metabólica que les permite adaptarse a diferentes ecosistemas y procesos biotecnológicos, generando biomasa que puede ser usada en la producción de alimentos, concentrados, compuestos bioactivos, biocombustibles, biorremediación y producción de biofertilizantes. (Chisti, 2007), a las microalgas se les considera responsables de la producción del 50% del oxígeno y de la fijación del 50% del carbono en el planeta. Su biodiversidad es enorme, se han identificado alrededor de 40,000 especies aunque se estima que existen más de 100,000, de las cuales con frecuencia se desconoce su composición bioquímica y metabolismo (Hernández, 2011, p. 42).

### **8.2.1 Parámetros para un cultivo de microalgas.**

Los factores influyentes en el crecimiento de las microalgas son comunes, sin embargo, cada especie y subespecie de microalga presenta sus características propias respecto a las condiciones óptimas de crecimiento, así como unas productividades máximas alcanzadas en diferentes configuraciones de sistema de cultivo (Malgas, 2013, p. 9).

- **Luz:** Un aspecto de suma importancia en el cultivo de organismos fotoautotróficos en general, es el relacionado con el aprovechamiento de la energía radiante durante la fotosíntesis. La tasa de fotosíntesis celular  $F$  (capacidad de captación de fotones) depende de la energía luminosa que reciben las células (Contreras-Flores et al. 2003, p. 451). En ausencia de limitación por nutrientes, la fotosíntesis se incrementa con el aumento de la intensidad lumínica, hasta alcanzar la máxima tasa de crecimiento específica para cada especie en el punto de saturación por luz (Park et al. 2011). Pasado este punto, se alcanza el punto de fotoinhibición, esto significa que la actividad fotosintética no aumenta con la luz recibida a partir de una cierta intensidad de luz e incluso puede llegar a disminuir (Martínez 2008, p. 23).
- **Agitación:** Este factor permite una utilización óptima de la luz y un “mejor régimen de iluminación”, sin embargo, puede también causar daño a las células. Debido al estrés hidrodinámico de bombeo, la fragilidad celular es con

frecuencia un factor que limita la intensidad de mezclado que puede aplicarse a un cultivo. En virtud de que la fragilidad celular y las características fotosintéticas entre otros factores pueden variar de cepa a cepa, los niveles óptimos de mezclado dependerán de cada especie cultivada (Gudin y Chaumont, 1991, p. 145).

- **Temperatura:** La temperatura en el crecimiento microalgal es un factor a tener en cuenta, ya que ésta influye en los coeficientes de velocidad de reacciones biosintéticas (Richmond, 1986, p. 375). La relación entre temperatura y velocidad de crecimiento crece exponencialmente hasta que se alcanza la temperatura óptima (Martínez, 2008, p. 25).
- **pH:** El pH del medio influye tanto en la proporción de las especies del equilibrio químico del CO<sub>2</sub>, y por tanto, en la alcalinidad del medio, como en la forma química en que se encuentran algunos nutrientes y micronutrientes necesarios. Cada especie de microalga tiene un rango de pH en el cual su crecimiento es óptimo, dependiendo de qué especies químicas este más habituada a asimilar (Malgas, 2013, p. 12).
- **Nutrientes:** Según Richmond (2004), las necesidades nutricionales de las algas son: Carbono inorgánico. Para conseguir altas producciones de biomasa microalgal, el aporte externo de CO<sub>2</sub> es fundamental. Nitrógeno. Después del carbono, el nitrógeno es el nutriente más importante para las microalgas. Fósforo. El fósforo es esencial para muchos procesos celulares, como son la transferencia de energía, formación de ácidos nucleicos, entre otros. Otros elementos son necesarios para el cultivo de microalgas, tanto macronutrientes (S, K, Na, Fe, Mg, Ca) como micronutrientes o elementos traza (B, Cu, Mn, Mo, Zn, V y Se), tal como se deriva de la composición elemental de las células microalgales.

### **8.3 *Spirulina platensis***

La *Spirulina platensis* es una cianobacteria planctónica que forma poblaciones masivas en cuerpos de agua tropicales y subtropicales caracterizados por altos niveles de carbonato y bicarbonato y alto pH. (Vonshak, 1996, p. 1). Las

cianobacterias poseen una fisiología versátil y una amplia tolerancia ecológica. Por lo general se encuentran en la mayoría de hábitats naturales y son especies cosmopolitas con una amplia distribución (Betancourt, 1997, p. 13).

La *Spirulina platensis* es una especie que muestran gran plasticidad en su morfología, esto se atribuye a factores ambientales como la temperatura y otros factores físicos y químicos, así como posiblemente el cambio genético. Forma tricomas helicoidales de tamaño variable y grado de enrollado desde una morfología estrechamente enrollada hasta una forma recta sin enrollar. (Belay, 2008, p.3). Un aspecto fundamental de la biología de la espirulina es su ciclo de vida, debido a los factores taxonómicos, fisiológicos y las implicaciones del cultivo (Ciferri, 1983; p. 562).

### 8.3.1 Composición de la Spirulina

- **Proteínas:** La *Spirulina platensis* contiene 18 aminoácidos, ocho de los cuales son esenciales, (ver tabla 7-1) Los aminoácidos que se encuentran en mayor cantidad son: el ácido glutámico en un 17.4%, el ácido aspártico en un 12.2%, la leucina en un 10.9 %, la valina en un 7.5% y la isoleucina 6.8%, La *Spirulina* puede almacenar aminoácidos a bajas temperaturas, cuando el crecimiento es bajo y la demanda de aminoácidos se reduce (Vonshak, 1996).

**Tabla 7-1:** Aminoácidos de la *Spirulina platensis* según (Vonshka, 1996).

<b>ESENCIALES</b>	<b>NO ESENCIALES</b>
Finilalanina	Ácido aspártico
Histidina	Ácido glutámico
Isoleucina	Alanina
Leucina	Arginina
Lisina	Cistina
Metionina	Glicina
Treonina	Prolina
Triptófano	Serina
Valina	Tirosina

**Obtención de un biofertilizante a partir del cultivo de *Spirulina platensis* en aguas residuales 25 domésticas provenientes del campamento de la estación de bombeo de crudo Rubiales**

---

La Spirulina posee altas concentraciones de proteínas, entre un 60 y 70% de su peso seco (Ciferri, 1983, p. 566), por lo que es de interés para la nutrición humana.

- Carbohidratos: El azúcar más abundante es la glucosa en una cantidad del 7 al 8 % (Vonshak, 1996).
- Lípidos: Según Vonshak (1996), La Spirulina contiene de 6-13% de lípidos, y la mitad de estos son ácidos grasos. Los que se encuentran en mayor porcentaje son: Monogalactosildiacilglicerol (MGDG), sulfoquinovosildiacilglicerol (SQDG) y fosfatildilglicerol (PG). Cada uno se encuentra en un porcentaje entre 20 y 25%.
- Vitaminas: El B-caroteno representa el 80% de los carotenoides, el resto está compuesto principalmente de ficoxantina y de criptoxantina, Spirulina es una fuente muy rica en Vitamina B 12, y esa es la razón por la que estos Cianobacteria es de gran valor para las personas Que necesitan suplementos en el tratamiento de Anemia perniciosa (Belay, 1997).

**Tabla 7- 2:** Contenido de vitaminas de la Spirulina, (Belay, 1997).

<b>VITAMINAS</b>	<b>mg 100/g</b>
Provitamin A	2.330x10 <sup>3</sup> IU/Kg
(B-carotene)	140
Vitamin E	100 a-tocopherol equiv
Thiamin B1	3.5
Rivoflavin B2	4.0
Niacin B3	14.0
Vitamin B6	0.8
Vitamin B12	0.32
Biotin	0.005
Folic Acid	0.01
Phantotenic acid	0.1
Vitamin K	2.2

- Minerales: La Spirulina en su composición cuenta con un porcentaje importante de minerales, los cuales generarían aporte importante para lo que se quiere obtener como producto final, (ver tabla7-3).

**Tabla 7-3:** Contenido de minerales de la *Spirulina platensis*, (Belay, 1997).

<b>MINERALES</b>	<b>mg/Kg</b>
Potasio	19000
Sodio	14000
Fosforo	10000
Magnesio	7670
Calcio	4670
Hierro	500
Manganeso	32
Zinc	27
Cobre	7
Selenio	0,3

## **8.4 Biofertilizantes a partir de aminoácidos.**

El uso de aminoácidos en fertilización foliar es relativamente reciente y se inició a partir del desarrollo de tecnología para la fabricación de aminoácidos libres mediante diferentes procedimientos entre los que se destacan principalmente: a) síntesis química, b) fermentación bacteriana, c) hidrólisis ácida, d) hidrólisis enzimática. El principio básico que utiliza esta tecnología para la fabricación de fertilizantes foliares es la formación de proteínas hidrolizadas en las que se incorporan los nutrimentos catiónicos como Ca, Mg, K, Fe, Cu, Zn y Mn. (Molina, 2003, p. 77)

Según Chavez, La finalidad de la aplicación de estos productos no es la nutricional, sino la de favorecer y potenciar el metabolismo vegetal, debido a que algunos de los beneficios de los aminoácidos en las plantas son:

- Aumentan la permeabilidad celular y la absorción y translación de los iones nutrientes.
- Aumentan la floración, disminuyendo el número de abortos florales regulando los procesos osmóticos.
- Indispensables para una excelente floración, combinados con micro elementos incrementan el peso y sabor de los frutos.
- Potencian la absorción de nutrientes minerales, facilitando su transporte a través de la savia.

- Aceleran la recuperación de plantas sometidas a condiciones adversas, tales como: trasplantes, transportes, heladas, viento, granizo, poda, asfixias, efectos tóxicos de tratamientos fitosanitarios, etc.
- Equilibran el metabolismo de las plantas.
- Rápida asimilación, tanto foliar como radicular.
- Acción inmediata.
- Aprovechamiento total.
- Aumento de la producción, calidad y retraso del envejecimiento.
- Ahorro para el cultivo.

Un biofertilizante a base de aminoácidos también tiene efecto sobre la multiplicación celular y una acción positivas sobre la fertilidad de los pólenes y la flor, aumentando las probabilidades productivas en los cultivos. (López, 2011, p. 35)

## 9. Desarrollo experimental

El diseño experimental consistió en cuatro etapas, dos de adaptación a las condiciones ambientales y al agua residual doméstica previamente tratada, respectivamente, la tercera etapa en donde se evaluó su crecimiento en diferentes concentraciones de aguas residuales domésticas tratadas y en la cuarta se analizaron los resultados obtenidos en los doce fotobiorreactores de la etapa tres y se realiza una comparación con otros fertilizantes. En la gráfica 9-1 se muestra el diseño experimental llevado a cabo durante la realización de todo el proyecto.

### 9.1 Materiales y métodos

A continuación se describen los materiales y métodos utilizados, así como los procedimientos ejecutados para obtener desde la adaptación hasta el crecimiento de la microalga en aguas residuales domésticas tratadas y los métodos de presentación de resultados.

#### 9.1.1 Microalga

Cepa: *Spirulina platensis*

Código: SP LB2340

Origen: Natron Lake – Aislada por Texas University – Houston – USA

Medio de cultivo: Zarrouk

Mantenido bajo fotoperiodos 12/12

Envase PET

Temperatura optima de crecimiento 37°C

#### 9.1.2 Medio de cultivo

El medio de cultivo seleccionado para el proyecto corresponde al medio Zarrouk, el cual consta de los siguientes componentes según Zarrouk, 1966:

**Tabla 9-1:** Composición del medio Zarrouk (Zarrouk, 1966)

SUSTANCIA	CONCENTRACIÓN (g/L)
NaHCO <sub>3</sub>	13,61
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,03
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,50
NaNO <sub>3</sub>	2,5
KSO <sub>4</sub>	1
NaCl	0,2
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,04
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,01
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,05
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	1,81
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,22
NaMoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,39
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,079
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,049
VOSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	49,6 mg
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	96,0 mg
NiSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	47,8 mg
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	17,9 mg
TiOSO <sub>4</sub>	33,3 mg
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	44 mg

### 9.1.3 Densidad celular

La densidad celular fue determinada diariamente, mediante recuento en microscopio óptico, usando un hematocitómetro Neubauer. Teniendo en cuenta la siguientes fórmula para la determinación de células por ml (Centro de Investigación pesquera).

$$C=(N) (104)(\text{dilución})$$

En donde:

C=células/mililitro

N= Promedio de células presentes en 1mm<sup>2</sup> (0.1µl)

Dil= Factor de dilución (cuando se consideró necesario diluir la muestra).

Es importante mencionar que si se usó 1 ml de muestra y 9 ml de agua sin células, el volumen total es de 10 ml y el factor de dilución es =10 (esta dilución se define como uno en diez).

104 = Factor de conversión de 0.1µl a 1ml.

#### **9.1.4 pH y temperatura**

Este parámetro se determinó mediante el uso de un phmetro de marca HANNA, serie 98106, con certificado de calibración del 22 de abril de 2016, al igual que la temperatura, para la cual se utiliza un equipo de marca HANNA, con la misma fecha de calibración.

El pH no se estandarizó, se dejó que iniciara sin alterarlo después de realizar la mezcla de sustratos y la inoculación del microorganismo, debido a que la *Spirulina platensis* va alcalinizando el medio a medida que va aumentando su densidad poblacional, por lo tanto si se alcalinizaba desde el principio de los bioensayos, este pH puede inhibir a la microalga y afectar su desarrollo.

#### **9.1.5 Agitación**

La agitación es proporcionada, durante todas las etapas por un total de 4 motores de aireación usados para peceras, con las siguientes características:

Model: HP-200

Pump power: 2,5W

Pressure: >0,01MPA

Outlet: 2 ways

Dentro de cada fotobiorreactor la agitación fue generada por inyección de aire, a partir de la generación de burbujas, mediante difusores conectados al sistema de aireación, que contribuyen a que el flujo sea uniforme.

### **9.1.6 Aguas residuales**

Las aguas residuales domesticas provienen del campamento donde pernocta el personal que labora en la Estación de Bombeo Rubiales, después de ser tratadas por medio de las plantas de tratamiento de aguas residuales, que realizan la depuración de estas mediante lodos activados de manera aeróbica, esto quiere decir que el agua residual que se utilizó es posterior a un tratamiento biológico.

### **9.1.7 Análisis de laboratorio**

Después de finalizada la etapa 3, se analizaron muestras de los 12 fotobiorreactores en los siguientes parámetros, realizados en el laboratorio Ambiental y Servicios Sanitarios LASS LTDA.

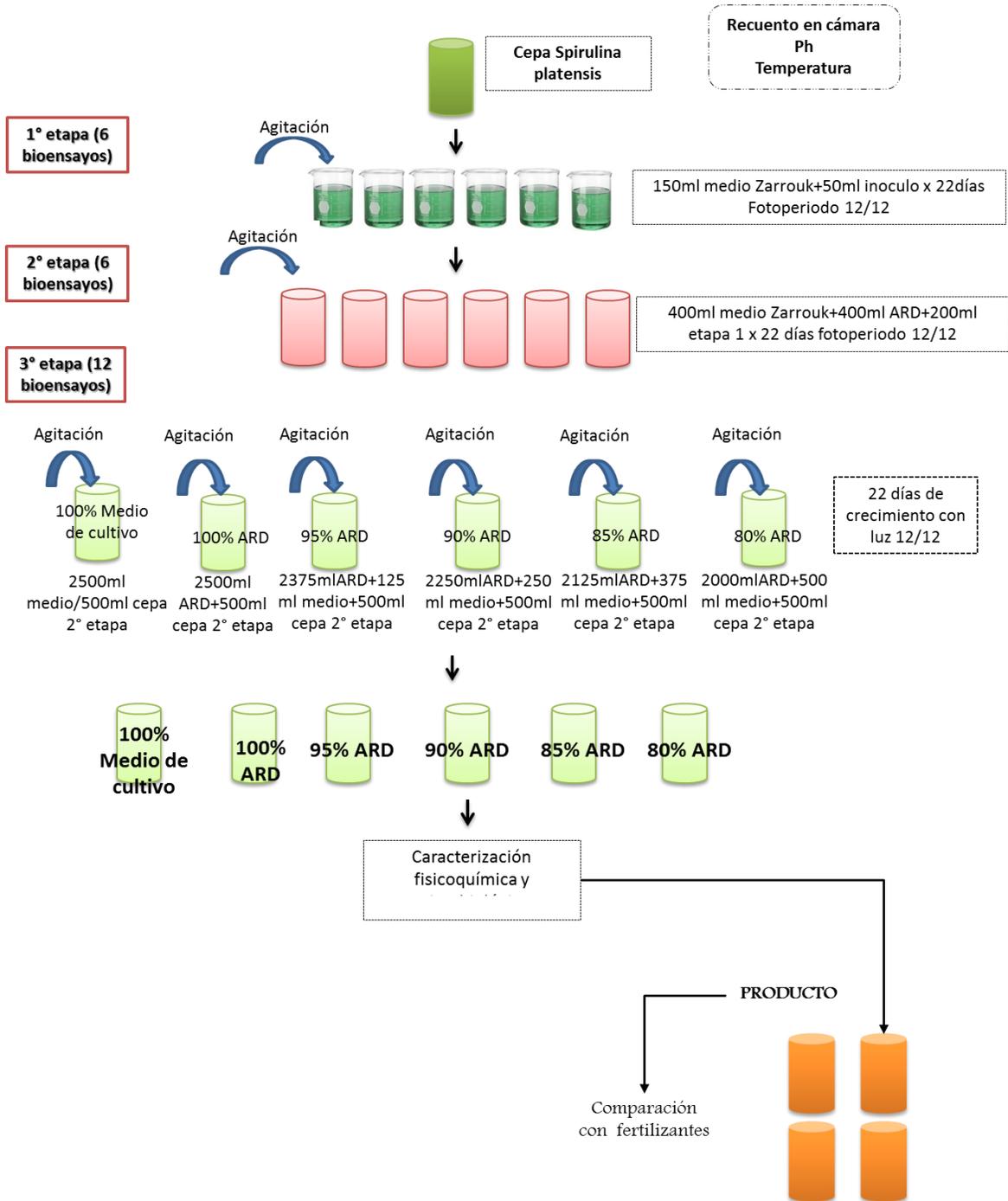
**Tabla 9-2:** Parámetros analizados de los 12 fotobiorreactores.

<b>PARÁMETRO</b>	<b>UNIDADES</b>	<b>MÉTODO</b>
HIERRO	mg Fe/L	S.M 31111-B
POTASIO	mg K/L	S.M 31111-B
MAGNESIO	mg Mg/L	S.M 31111-B
MANGANESO	mg Mn/L	S.M 31111-B
NITROGENO	mg N/L	S.M 4500 Norg-C
FOSFORO	mg P/L	S.M 4500 P B,E
ZINC	mg Zn/L	S.M 3111 B

### **9.1.8 Presentación y análisis de resultados.**

Los resultados se presentaron en graficas elaboradas en el software STATISTICA versión 7 y los puntos óptimos de las gráficas de superficie de respuesta, se hallaron con el software MATLAB versión 2010, aplicando el método directo de optimización multidimensional no restringida.

Gráfica 9-1: Diseño experimental



Fuente: el autor.

## 10. Resultados y discusiones

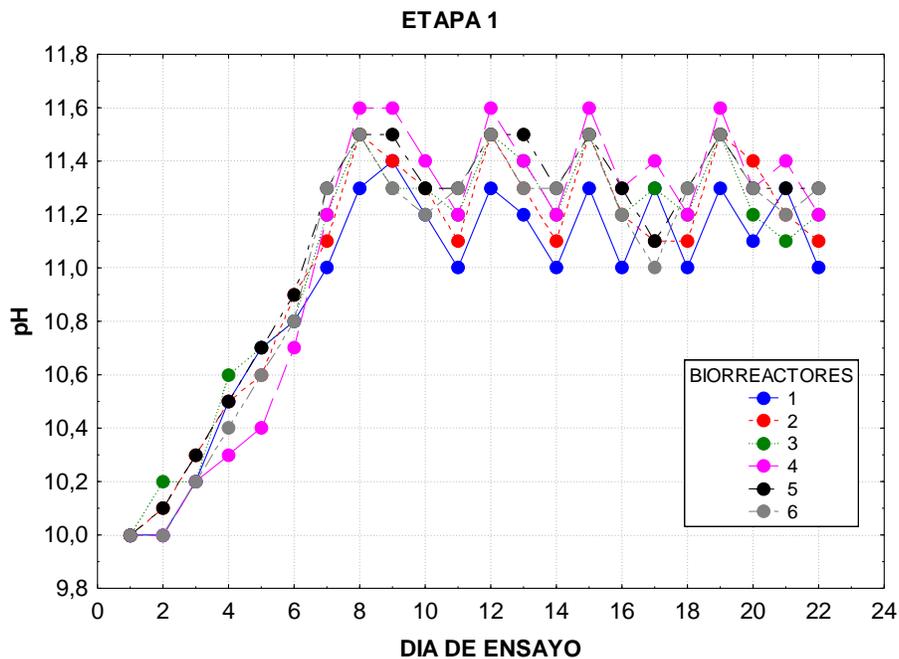
A continuación se muestran los resultados obtenidos en cada una de las etapas llevadas a cabo en el proceso de investigación.

### 10.1 Etapa 1

Las características de los 6 fotobiorreactores para ejecutar esta primera etapa fueron las siguientes:

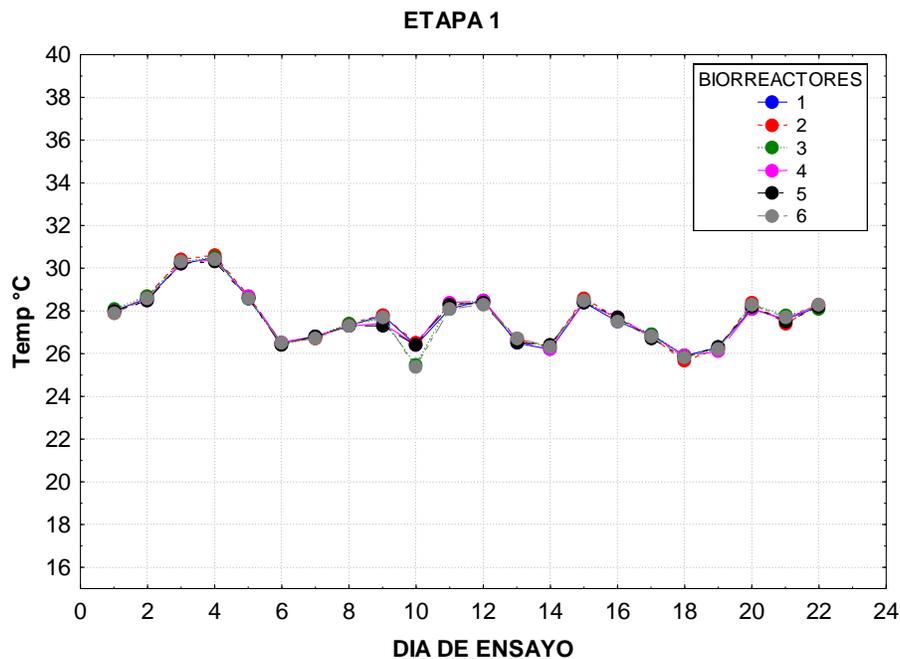
- La densidad poblacional de la cepa que se usó para inocular cada fotobiorreactor fue de 385000 cel/ml.
- 150ml de medio zarrouk
- 50ml de inoculo
- Fotoperiodo 12/12
- Agitación mediante burbujeo las 24 horas.
- Temperatura ambiente.

**Gráfica 10-1:** pH de los 6 fotobiorreactores en etapa 1.



La gráfica 10-1 muestra los resultados de las mediciones diarias de pH realizadas a los 6 fotobiorreactores, en donde el pH inicia en 10 y de manera casi inmediata comienza su ascenso, el cual es ocasionado por el aumento de la población, ya que esta al consumir la fuente de carbono va liberando bases como el NaOH al medio, a mayor biomasa mayor degradación de bicarbonato y por consiguiente se eleva la concentración de grupos hidroxilos, aumentando así el pH (Pelizer, 2002, 252), a partir del día 8 se evidencia variaciones de pH entre 11 y 11,6 en los diferentes bioensayos, cuando el pH alcanza 10,5 concentración celular tiende a estabilizar o incluso disminuir (DANESI, 2001), debido a que con el aumento de pH durante el crecimiento, la cantidad de iones de bicarbonato consumido también tiende a aumentar, esto se evidencia en la gráfica 10-3 en donde la densidad poblacional aumenta significativamente durante los días del bioensayo, pero después del día 19 este crecimiento es menor.

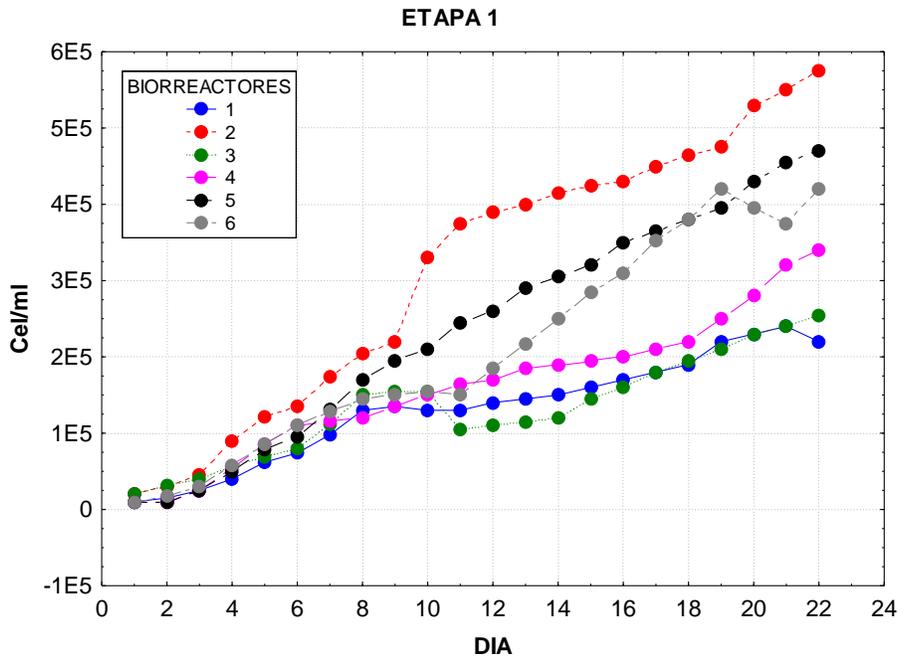
**Gráfica 10-2:** Temperatura en °C de los 6 fotobiorreactores en etapa 1.



La temperatura de los 6 biorreactores fue tomada diariamente, debido a que estos se encontraban expuestos a condiciones ambientales, donde este parámetro no fue controlado. Al observar la gráfica 10-2 esta muestra un rango de temperatura entre los 25 y 30°C aproximadamente y según Zarrouk, 1966 el crecimiento de la

*Spirulina* se da entre 25-40°C, siendo el rango de mayor producción entre 35-40°C. A causa de que la zona donde se desarrolló el proyecto cuenta con rangos de temperatura adecuados para el crecimiento del microorganismo y al observar la gráfica 10-3, se puede deducir que el microorganismo se adaptó a las condiciones en las cuales se realizaron los bioensayos.

**Gráfica 10-3:** Densidad poblacional obtenida en los 6 fotobiorreactores en etapa 1.



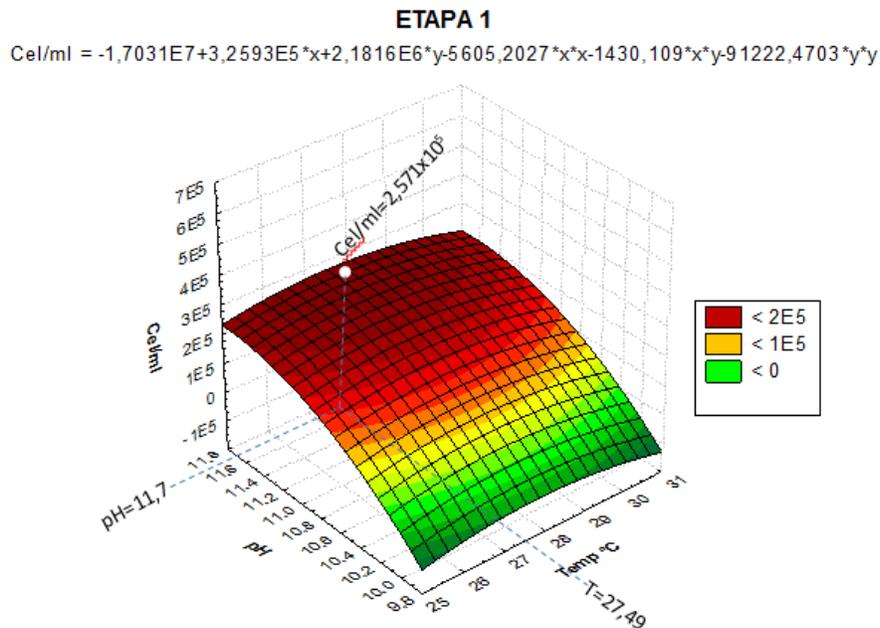
El objetivo de la etapa 1 consistía en que el microorganismo se adaptara a las condiciones ambientales, a las que fueron sometidos los 6 fotobiorreactores, por lo tanto al observar la gráfica 10-3, se evidencia un aumento de la densidad poblacional, en donde el fotobiorreactor que finalizó con mayor cantidad de células por mililitro fue el número 2 con 575000 cel/ml, seguido del 5 con 470000 cel/ml, el fotobiorreactor 6 con 420000 cel/ml, 4 con 340000 cel/ml, el 3 con 255000 cel/ml y por último el fotobiorreactor 1 con 220000 cel/ml, estos resultados se debieron ocasionar por la ubicación de los fotobiorreactores, debido a que algunos se encontraban en una posición donde había mayor luz solar y el crecimiento de los microorganismos fotosintéticos es proporcional a la intensidad de la luz recibida siempre que esta se sitúe por debajo de un cierto valor máximo, a partir de este valor máximo, el crecimiento se ve fotolimitado ya que los sistemas fotosintéticos receptores se ven dañados y la fotosíntesis por tanto, inhibida. (Malgas, 2013, 9).

**Tabla 10-1:** coeficiente de correlación fotobiorreactores etapa 1.

ETAPA 1							CORRELACIÓN		
VARIABLE	MEDIA	ERROR ESTANDAR DE LA MEDIA	DESV ESTANDAR	VARIANZA	COEF DE VARIACIÓN	N	pH	Temp	Cel/ml
pH	11,04621212	0,040660253	0,467150744	0,218229817	4,229058237	132	1,000000	-0,505635	0,614163
Temp	27,6719697	0,107110787	1,230609257	1,514399144	4,44713286	132	-0,505635	1,000000	-0,337044
Cel/ml	197643,9394	11973,19169	137561,4995	1,89232E+10	69,6006667	132	0,614163	-0,337044	1,000000

En la tabla 10-1 se muestran los coeficientes de correlación entre las variables temperatura, pH y densidad poblacional de los fotobiorreactores de la etapa 1, en donde se observa que la correlación entre pH y densidad poblacional es cercana a 1, por lo tanto son directamente proporcionales y la dependencia entre estas es positiva, mientras que la relación entre temperatura y densidad poblacional es menor a cero, indicando que la dependencia es negativa, al igual que la correlación entre pH y temperatura.

**Gráfica 10-4:** Superficie de respuesta etapa uno. Densidad poblacional en función de la temperatura y el pH.



En la gráfica 10-4 se puede observar la superficie de respuesta de la densidad poblacional en función del pH y la temperatura de los 6 fotobiorreactores de la etapa 1, en los cuales se usó medio Zarrouk como único medio de crecimiento de

la *Spirulina platensis*, por lo tanto el modelo estadístico que lo representa es el siguiente:

$$\frac{Cel}{ml} = -1,7031E7 + 3,2593E5X + 2,1816E6Y - 5605,2027X^2 - 1430,109XY - 91222,4703Y^2$$

Donde Y corresponde a pH y X a temperatura.

(10.1)

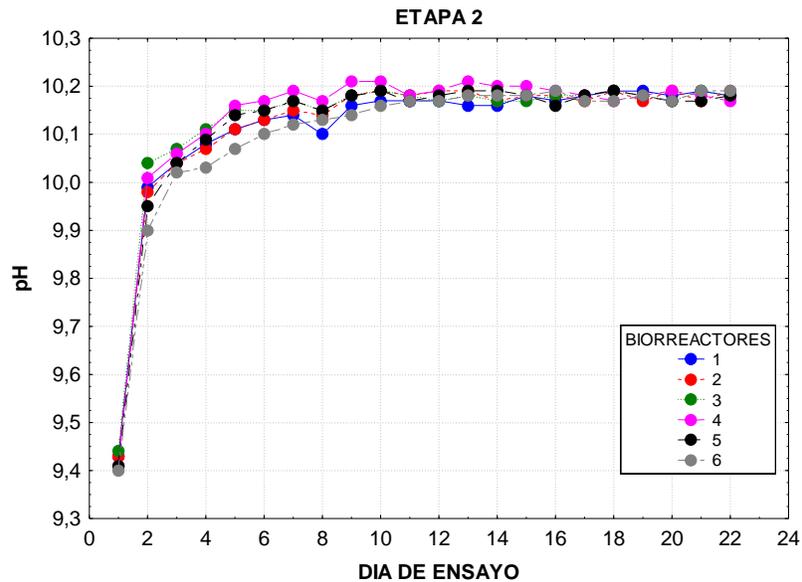
La metodología de superficie de respuesta es la estrategia experimental y de análisis que permite resolver el problema de encontrar las condiciones de operación óptimas de un proceso, es decir, aquellas que dan por resultado “valores óptimos” de una o varias características de calidad del producto.(Gutiérrez, de la Vara, 2008, p. 386), por lo tanto la ecuación (10.1) corresponde al punto óptimo de la etapa 1, indicando las condiciones necesarias X (temperatura), Y (pH), para que la variable de densidad poblacional sea la más adecuada, debido a que las tres variables están relacionadas entre sí, de acuerdo al modelo establecido en las condiciones de T=27,49°C y pH=11,7 el valor de la función objetivo es Cel/ml = 2,571 x 10<sup>5</sup>, esto quiere decir que esos dos valores proporcionan el punto óptimo de la densidad poblacional, en la etapa 1 en donde se utilizó solo medio zarrouk como único medio de cultivo.

## 10.2 Etapa 2

Las características de los 6 fotobiorreactores para la realización de la segunda etapa fueron las siguientes:

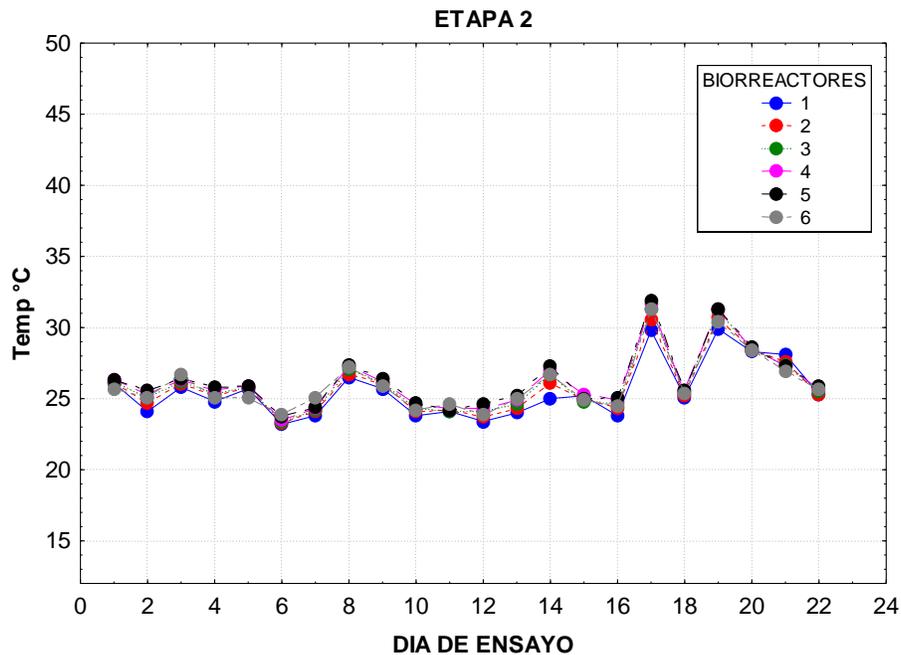
- La densidad poblacional de la cepa inicial que se usó para inocular cada fotobiorreactor fue de 515000 cel/ml, proveniente de la mezcla de los 6 fotobiorreactores de la etapa 1.
- 400ml de medio zarrouk (50% sustrato)
- 400ml Agua residual doméstica tratada (50% sustrato)
- 200ml de inoculo
- Fotoperiodo 12/12
- Agitación mediante burbujeo las 24 horas.
- Temperatura ambiente.

Gráfica 10-5: PH de los 6 fotobiorreactores desarrollados en la etapa 2.



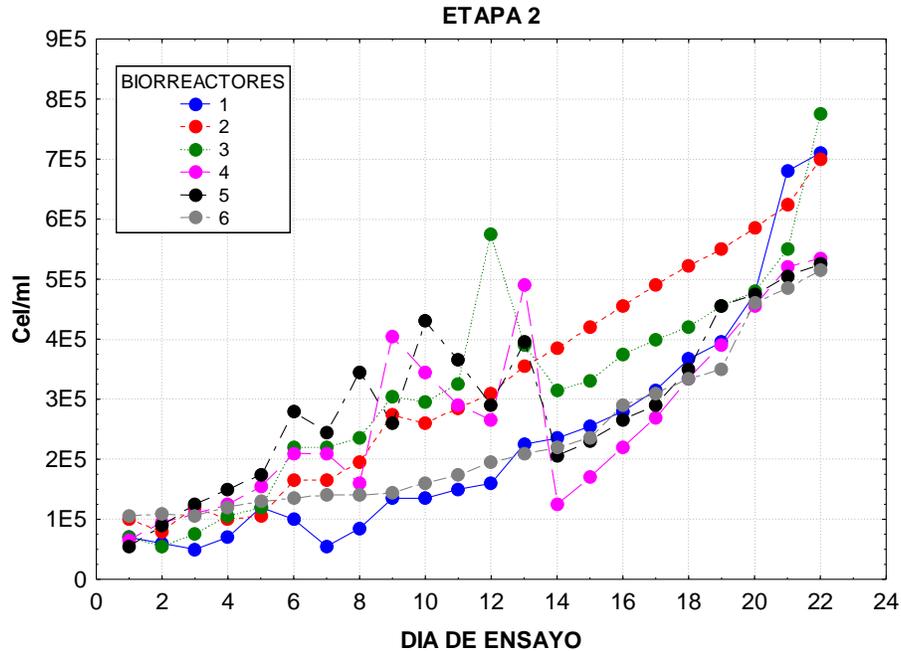
La gráfica 10-5 muestra los resultados de las mediciones diarias de pH realizadas a los 6 fotobiorreactores, en donde se observa que no hay diferencias tan notorias entre ellos, pues el pH inició en un rango entre 9,4 y 9,44, al siguiente día se evidencia un aumento significativo encontrándose entre 9,9 y 10,04, el pH desde el día 3 hasta el 10 aumenta ligeramente y desde allí hasta el día de finalización de la etapa 2, los datos obtenidos en los 6 fotobiorreactores presentan variaciones mínimas, quedando los siguientes resultados de pH: 10,18 (fotobiorreactor 1), 10,19 (fotobiorreactor 2), 10,18, (fotobiorreactor 3) 10,17, (fotobiorreactor 4) 10,18, (fotobiorreactor 5) 10,19 (fotobiorreactor 6), este comportamiento puede ocurrir debido a que la fuente de carbono disponible se agotó más rápido que en la etapa 1, debido a que el medio de crecimiento correspondía a 50% zarrouk, 50% aguas residuales domésticas y la forma de carbono más asimilable por las cianobacterias es el bicarbonato (Miller, Colman, 1980, p 400), presente en el medio de cultivo zarrouk, el cual posiblemente fue consumido en los primeros días del bioensayo.

Gráfica 10-6: temperatura de los 6 fotobiorreactores correspondientes a la etapa 2.



La temperatura de los 6 fotobiorreactores de esta etapa fue monitoreada diariamente, debido a que al igual que en la etapa 1, esta variable no fue controlada y el montaje de estos se realizó aprovechando las condiciones ambientales de la zona donde se desarrolló el proyecto. Al observar la gráfica 10-6 esta muestra un rango de temperatura entre los 23,2 y 31,9°C aproximadamente, aunque este parámetro es importante para el crecimiento de la *Spirulina platensis*, debido a que la temperatura es uno de los factores ambientales más importantes que afectan el crecimiento y desarrollo de los organismos vivos (Martin, 2010, p. 23), el área donde se ejecutó el proyecto proporciona los rangos de temperatura adecuados para el crecimiento del microorganismo.

**Gráfica 10-7:** Densidad poblacional de los 6 fotobiorreactores correspondientes a la etapa 2.



El desarrollo de esta etapa dentro del proyecto investigativo, consistía en la adaptación de la *Spirulina platensis* al agua residual domestica tratada como medio de cultivo para su crecimiento, por lo tanto al observar la gráfica 8 se evidencia un aumento en la densidad poblacional en los 6 fotobiorreactores, indicando que el microorganismo generó un proceso de adaptación bastante importante para la ejecución de la siguiente fase del proyecto. Dicha adaptación se debe a que este microorganismo es considerado resistente a diferentes condiciones, igualmente la alcalinidad del medio pH 8,5 a 11,5 constituye una excelente barrera contra la mayoría de los contaminantes, como bacterias, levaduras, hongos y algas (Becker, 1982), generando de esta manera un medio sin competencias para el consumo de nutrientes. Los fotobiorreactores que presentaron un comportamiento más homogéneo durante los 22 días del bioensayo corresponden al 1, 2 y 6, mostrando una curva de crecimiento en fase de adaptación y crecimiento exponencial, mientras que los fotobiorreactores 3, 4 y 5 presentaron picos de densidad poblacional alta, seguido de una evidente muerte celular, este comportamiento se comprobó durante los 22 días, lo cual pudo ocurrir por la ubicación de estos

**Obtención de un biofertilizante a partir del cultivo de *Spirulina platensis* en aguas residuales 41 domésticas provenientes del campamento de la estación de bombeo de crudo Rubiales**

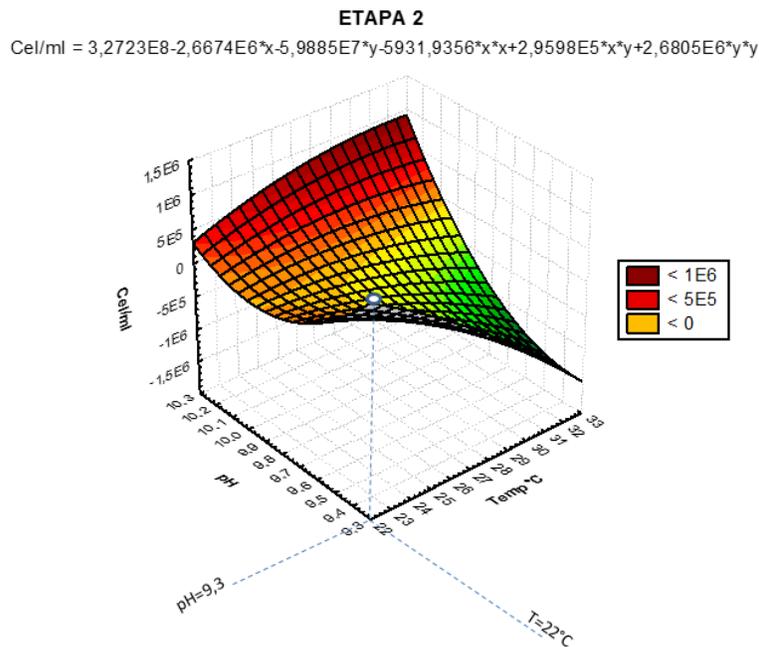
fotobiorreactores en áreas donde la incidencia de luz fue más baja que los fotobiorreactores 1, 2, y 6.

**Tabla 10-2:** coeficiente de correlación fotobiorreactores etapa 2.

ETAPA 2							CORRELACIÓN		
VARIABLE	MEDIA	ERROR ESTANDAR DE LA MEDIA	DESV ESTANDAR	VARIANZA	COEF DE VARIACIÓN	N	pH	Temp	Cel/ml
pH	10,11818182	0,014148603	0,162555067	0,02642415	1,606564007	132	1,000000	0,031372	0,442841
Temp	25,96287879	0,174334614	2,002952222	4,011817604	7,714676937	132	0,031372	1,000000	0,31662
Cel/ml	280189,3939	14451,5516	166035,687	2,75678E+10	59,25837686	132	0,442841	0,31662	1,000000

En este caso la tabla 10-2 muestra los coeficientes de correlación entre las variables temperatura, pH y densidad poblacional de los fotobiorreactores de la etapa 2, en donde se observa que la correlación entre pH y densidad poblacional es cercana a 1, al igual que la correlación entre densidad poblacional y temperatura, indicando que la dependencia entre estas es positiva, esto quiere decir que en los fotobiorreactores de la etapa 2 la densidad poblacional estuvo determinada por el pH y la temperatura, mientras que la correlación pH y temperatura es más cercana a cero, por lo tanto es casi nula.

**Gráfica 10-8:** Superficie de respuesta etapa 2, que muestra la densidad poblacional en función de la temperatura y el pH.



En la gráfica 10-8 se puede observar la superficie de respuesta de la densidad poblacional en función del pH y la temperatura de los 6 fotobiorreactores de la etapa 2, en los cuales se usó un medio de cultivo en donde se el 50% correspondía a aguas residuales domesticas tratadas y el otro 50% a medio Zarrouk, por lo tanto el la función que representa esta etapa y con la cual se determinó el punto óptimo fue la siguiente:

$$\frac{Cel}{ml} = 3,2723E8 - 2,6674E6X - 5,9885E7Y - 5,931,9356X^2 + 2,9598E5XY + 2,6805E6Y^2$$

Donde Y corresponde a pH y X a temperatura.

(10.2)

La optimización matemática intenta dar respuesta a un tipo general de problemas donde se desea elegir el mejor entre un conjunto de elementos (Cevallos, 2012, ¶ 2), en ese proceso de determinación de los mejores elementos o condiciones para la etapa 2, se encontró por medio de la ecuación 10.2 que a pH 9,3 y temperatura 22°C, corresponden al punto óptimo para obtener 1,139 x 10<sup>6</sup> células por mililitro, con las características suministradas.

### 10.3 Etapa 3

En esta etapa se realizó el montaje de 12 fotobiorreactores con las siguientes características

- La densidad poblacional de la mezcla de los 6 fotobiorreactores de la etapa 2 fue de 630000 cel/ml, y se usó para la inoculación de los 12 fotobiorreactores de esta etapa, en donde se adiciono a cada uno 500 ml.
- Las concentraciones de aguas residuales domesticas tratadas y medio zarrouk para cada uno de los fotobiorreactores fue la siguiente:  
Fotobiorreactores 1A, 1B: 100% (2500 ml) medio zarrouk.  
Fotobiorreactores 2A, 2B: 95% (2375ml) aguas residuales domesticas tratadas.  
Fotobiorreactores 3A, 3B: 90% (2250 ml) aguas residuales domesticas tratadas.  
Fotobiorreactores 4A, 4B: 85% (2125 ml) aguas residuales domesticas tratadas.

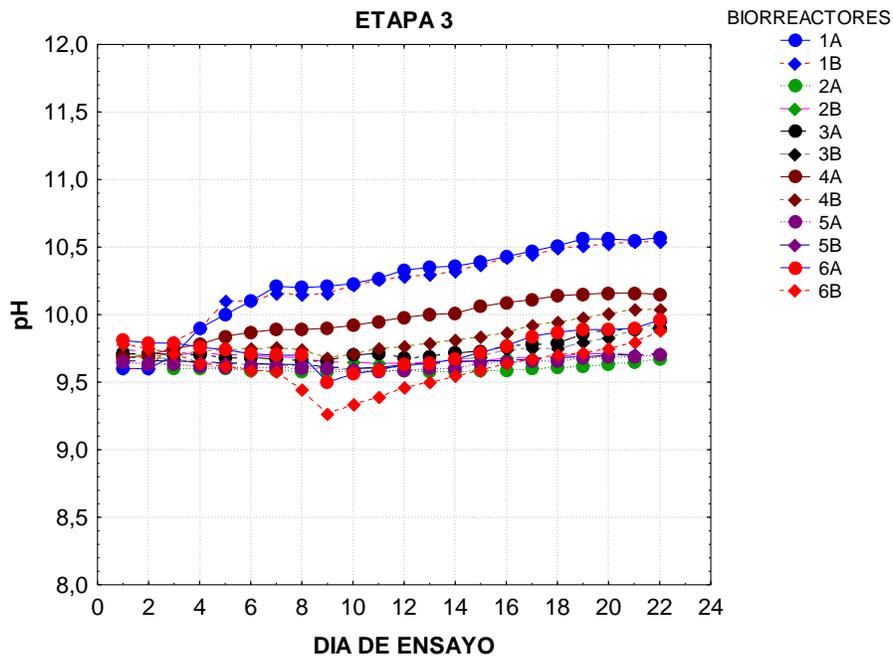
**Obtención de un biofertilizante a partir del cultivo de *Spirulina platensis* en aguas residuales 43 domésticas provenientes del campamento de la estación de bombeo de crudo Rubiales**

Fotobiorreactores 5A, 5B: 80% (2000 ml) aguas residuales domesticas tratadas.

Fotobiorreactores 6A, 6B: 100% (2500 ml) aguas residuales domesticas tratadas.

- Fotoperiodo 12/12
- Agitación mediante burbujeo las 24 horas.
- Temperatura ambiente.

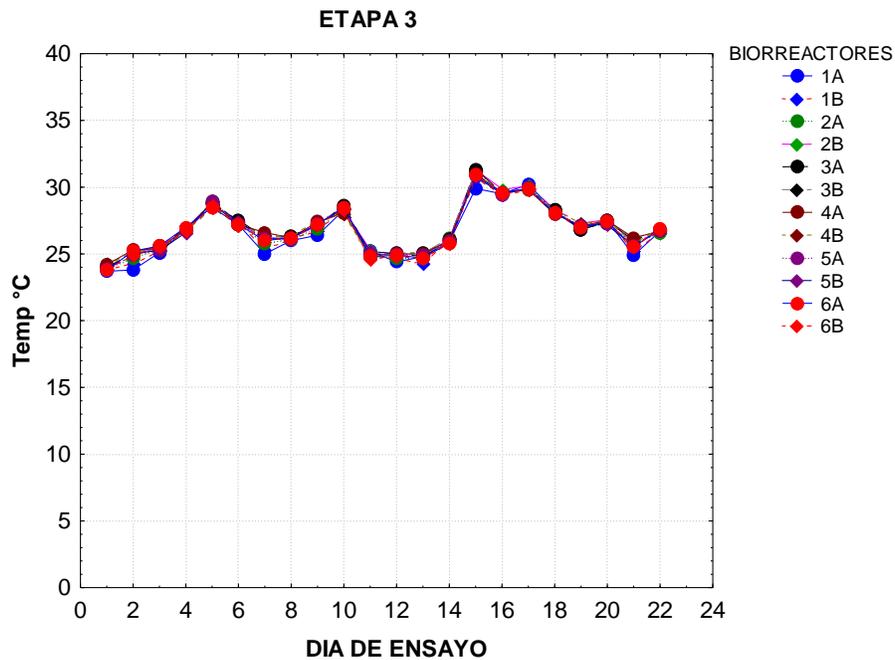
**Gráfica 10-9:** Comportamiento del pH en los fotobiorreactores de la etapa 3.



La gráfica 10-9 muestra los resultados de las mediciones de pH realizadas a los 12 fotobiorreactores, al observar 1A y 1B que contenían medio de cultivo zarrouk, se evidencia un aumento progresivo de pH, ya que dicha variable inició en 9,6 y a los 22 días del bioensayo finaliza en 10,57 (1A) y 10,54 (1B), los bioensayos que tuvieron un pH más estable corresponden a 4A y 4B, en los cuales su medio de cultivo estaba compuesto por 85% de aguas residuales domesticas tratadas, en estos el pH inicia en 9,68 y finaliza en 10,15 y 10,04 respectivamente, mostrando poca variación en los mismos. Los bioensayos conformados por 100% agua residual tratada como medio de cultivo, mostraron una conducta en donde se aprecia una disminución de pH, ya que inicia con valores de 9,81 y 9,78 y va descendiendo hasta el día 9 en donde alcanzan un pH de 9,5 y 9,27, al día

siguiente inicia el ascenso de dicha variable hasta la finalización de la etapa, en donde alcanzó un pH de 9,96 y 9,88; los demás fotobiorreactores presentaron un comportamiento similar en donde se observa un aumento paulatino del pH. El comportamiento de los fotobiorreactores demuestra la adaptación paulatina de la *Spirulina platensis* a las aguas residuales domésticas tratadas a concentraciones mayores, ya que en todos se evidenció el aumento de pH, la determinación del pH se puede utilizar como un indicador del crecimiento microbiano, el crecimiento de las células se puede estimar rápidamente por pH del cultivo (Pelizer, et al. 2002, p. 252).

**Gráfica 10-10:** Temperatura correspondiente a los 12 fotobiorreactores de la etapa 3

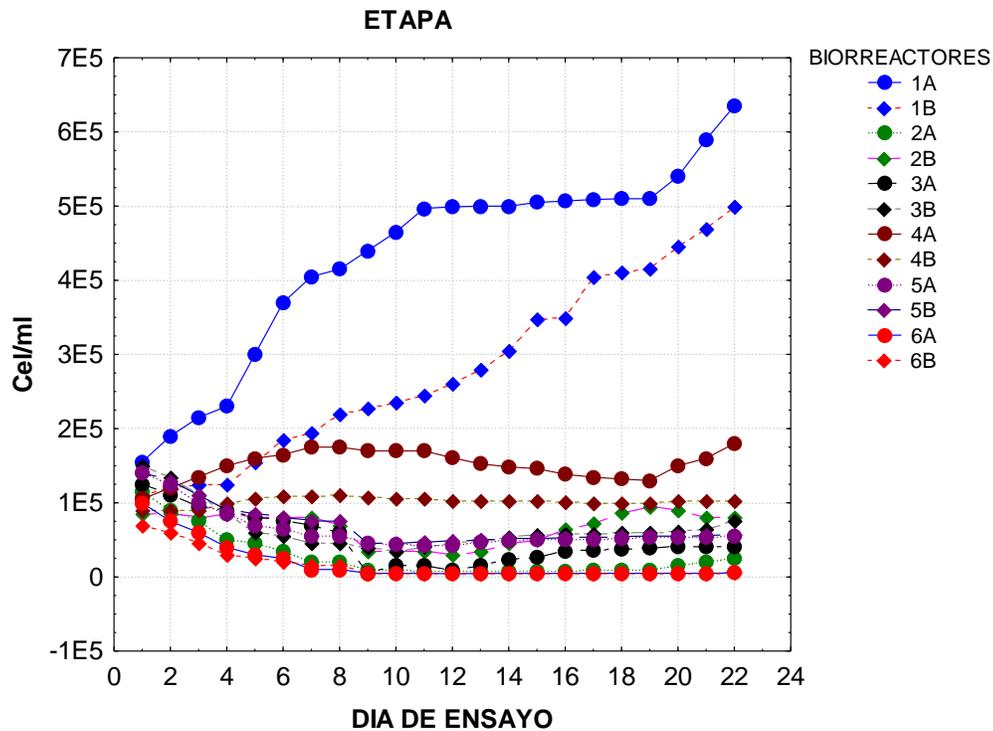


La gráfica 10-10 muestra los resultados obtenidos del monitoreo diario de la temperatura de la etapa 3, en donde se observa que los 12 fotobiorreactores presentaron datos muy similares, debido a que se realizó de la misma forma que en las dos etapas anteriores, sin controlar la variable. Al comparar las gráficas 10-2, 10-6 y 10-10, se determina que la temperatura durante todo el proceso se encontró en un rango de 24 a 31°C aproximadamente. En el crecimiento de las microalgas la temperatura es un factor a considerar, puesto que influye en los coeficientes de velocidad de las reacciones biosintéticas (Richmond, 1986) y la

**Obtención de un biofertilizante a partir del cultivo de *Spirulina platensis* en aguas residuales 45 domésticas provenientes del campamento de la estación de bombeo de crudo Rubiales**

temperatura óptima para el crecimiento de la *Spirulina platensis* es 35-38°C, mientras que el mínimo de temperatura requerida para su crecimiento es 15-20°C (Gershwin, Belay, 2008, p. 7), por lo tanto el lugar donde se realizó la investigación cumple con las condiciones de temperatura adecuadas para la implementación del cultivo de *Spirulina platensis* a mayor escala, sin necesidad de ejercer un control directo sobre dicha variable.

**Gráfica 10-11:** Comportamiento de la densidad poblacional en los fotobiorreactores de la etapa 3.



El desarrollo de la etapa 3 dentro del proyecto investigativo, consistió en exponer a la *Spirulina platensis* a medios de cultivo con diferentes concentraciones de aguas residuales domésticas tratadas, para evaluar su capacidad de adaptación y crecimiento, debido a que la *Spirulina* ha sido utilizada para el aprovechamiento de efluentes de biodigestores de la industria del almidón (Phang et al., 2000, p. 395), para el aprovechamiento de vinazas de caña (Pedraza, 1989, p. 5) y efluentes de biodigestores de industrias porcícolas, los trabajos recientes se han centrado en su

capacidad de captación de nitrógeno de las aguas residuales (Lincoln, 1993. P 109).

Al observar la gráfica 10-11 se evidencia que los fotobiorreactores 1A y 1B correspondientes a 100% de medio Zarrouk durante los 22 días que duró esta etapa mostraron una densidad poblacional en fase exponencial, mientras que los fotobiorreactores 2A, 2B, 3A, 3B, 5A, 5B, 6A y 6B muestran una disminución en la densidad poblacional desde el día 1 hasta el día 15, el día 16 comienzan su ascenso paulatinamente hasta la finalización de esta etapa; los fotobiorreactores 4A, 4B a los cuales se les acondicionó medio de cultivo con 85% de aguas residuales domésticas tratadas, evidenciaron un comportamiento diferente, en estos se observa un crecimiento celular en aumento. Lo descrito anteriormente revela un proceso adaptativo por parte de la *Spirulina platensis* a los medios de crecimiento y a las condiciones proporcionadas dentro de la metodología descrita y elaborada durante todo el proyecto investigativo, pero esta adaptación se muestra lenta en comparación a las etapas anteriores, debido a que se está usando como sustrato concentraciones más altas de aguas residuales.

**Tabla 10-3:** Coeficiente de correlación fotobiorreactores 1A y 1B correspondientes a la etapa 3.

ETAPA 3 1A 1B							CORRELACIÓN		
VARIABLE	MEDIA	ERROR ESTANDAR DE LA MEDIA	DESV ESTANDAR	VARIANZA	COEF DE VARIACIÓN	N	pH	Temp	Cel/ml
pH	10,22477273	0,043709459	0,289935748	0,084062738	2,835620463	44	1,000000	0,446	0,818
Temp	26,64090909	0,28768446	1,908282825	3,64154334	7,162979381	44	0,446	1,000000	0,288
Cel/ml	354897,7273	22343,64028	148210,9425	2,19665E+10	41,76159246	44	0,818	0,288	1,000000

Los coeficientes de correlación entre las variables temperatura, pH y densidad poblacional de los fotobiorreactores de la etapa 3 que se muestran en la tabla 10-3, se observa que la correlación entre pH y densidad poblacional es igual a 0,818 cercana a 1, al igual que la correlación entre densidad poblacional y temperatura la cual es 0,288, por lo tanto la dependencia entre estas es positiva, esto quiere decir que en los fotobiorreactores de la etapa 2 la densidad poblacional estuvo determinada por el pH y la temperatura.

**Obtención de un biofertilizante a partir del cultivo de *Spirulina platensis* en aguas residuales 47 domésticas provenientes del campamento de la estación de bombeo de crudo Rubiales**

**Tabla 10-4:** coeficiente de correlación fotobiorreactores 2A y 2B correspondientes a la etapa 3.

2A 2B							CORRELACIÓN		
VARIABLE	MEDIA	ERROR ESTANDAR DE LA MEDIA	DESV ESTANDAR	VARIANZA	COEF DE VARIACIÓN	N	pH	Temp	Cel/ml
pH	9,859545455	0,020952364	0,138982257	0,019316068	1,409621339	44	1,000000	0,318651	-0,427857
Temp	26,89545455	0,283401913	1,87987562	3,533932347	6,989566274	44	0,318651	1,000000	-0,166231
Cel/ml	47329,54545	4937,986018	32754,89368	1072883060	69,20601787	44	-0,427857	-0,166231	1,000000

Los coeficientes de correlación entre las variables temperatura, pH y densidad poblacional de los fotobiorreactores 2A y 2B de la etapa 3, se muestran en la tabla 10-4, en donde se observa que la correlación entre pH y densidad poblacional es igual a -0,427857 cercana a -1, esto indica que la dependencia es indirectamente proporcional, a diferencia de la correlación entre temperatura y densidad celular la cual fue positiva para estos ensayos y su resultado fue de 0,318651. Estos ensayos arrojaron dichas dependencias entre las variables, debido al proceso de adaptación que sufrió el microorganismo al sustrato.

**Tabla 10-5:** coeficiente de correlación fotobiorreactores 3A y 3B correspondientes a la etapa 3.

3A 3B							CORRELACIÓN		
VARIABLE	MEDIA	ERROR ESTANDAR DE LA MEDIA	DESV ESTANDAR	VARIANZA	COEF DE VARIACIÓN	N	pH	Temp	Cel/ml
pH	9,93	0,022717122	0,150688343	0,022706977	1,517505973	44	1,000000	0,382	-0,587
Temp	26,98863636	0,267262687	1,772820104	3,142891121	6,568765016	44	0,382	1,000000	-0,295
Cel/ml	55843,18182	5150,028631	34161,42526	1167002976	61,17385175	44	-0,587	-0,295	1,000000

La tabla 10-5 muestra los coeficientes de correlación entre las variables temperatura, pH y densidad poblacional de los fotobiorreactores 3A y 3B de la etapa 3, en donde se observa que la correlación entre pH y densidad poblacional es igual a -0,587 cercana a -1, esto indica que la dependencia es indirectamente proporcional, a diferencia de la correlación entre temperatura y densidad celular la cual fue positiva para estos ensayos y su resultado fue de 0,382. Para estos ensayos se puede determinar que las dependencias entre las variables resultaron de esta manera, por las mismas razones que en los fotobiorreactores 2A y 2B, por la fase de adaptación de la *Spirulina platensis* al medio de crecimiento.

**Tabla 10-6:** coeficiente de correlación fotobiorreactores 4A y 4B correspondientes a la etapa 3.

4A 4B							CORRELACIÓN		
VARIABLE	MEDIA	ERROR ESTANDAR DE LA MEDIA	DESV ESTANDAR	VARIANZA	COEF DE VARIACIÓN	N	pH	Temp	Cel/ml
pH	9,889545455	0,023447468	0,155532911	0,024190486	1,572700295	44	1,000000	0,343	0,235
Temp	26,925	0,26561439	1,761886542	3,104244186	6,543682606	44	0,343	1,000000	-0,111
Cel/ml	101863,6364	8578,015986	56900,12094	3237623763	55,85911025	44	0,235	-0,111	1,000000

La tabla 10-6 muestra los coeficientes de correlación entre las variables temperatura, pH y densidad poblacional de los fotobiorreactores 4A y 4B de la etapa 3, en donde se observa que la correlación entre pH y densidad poblacional es igual a 0,235 cercana a 1, esto quiere decir que es una dependencia positiva, a diferencia de la correlación entre temperatura y densidad poblacional la cual corresponde a -0,111, esta se encuentra más cercana a 0, siendo una dependencia casi nula para el proceso.

**Tabla 10-7:** coeficiente de correlación fotobiorreactores 5A y 5B correspondientes a la etapa 3.

5A 5B							CORRELACIÓN		
VARIABLE	MEDIA	ERROR ESTANDAR DE LA MEDIA	DESV ESTANDAR	VARIANZA	COEF DE VARIACIÓN	N	pH	Temp	Cel/ml
pH	9,966590909	0,025625253	0,169978702	0,028892759	1,705484886	44	1,000000	0,398	-0,828
Temp	26,86136364	0,271442313	1,800544609	3,241960888	6,703102021	44	0,398	1,000000	-0,392
Cel/ml	55600	5357,507427	35537,6839	1262926977	63,91669766	44	-0,828	-0,392	1,000000

Los coeficientes de correlación que se muestran en tabla 10-7 corresponden a los fotobiorreactores 5A y 5B, en donde se observa una relación de dependencia negativa entre la densidad poblacional y el pH, así mismo para la densidad poblacional y la temperatura, estos resultados indican que las variables son inversamente proporcionales.

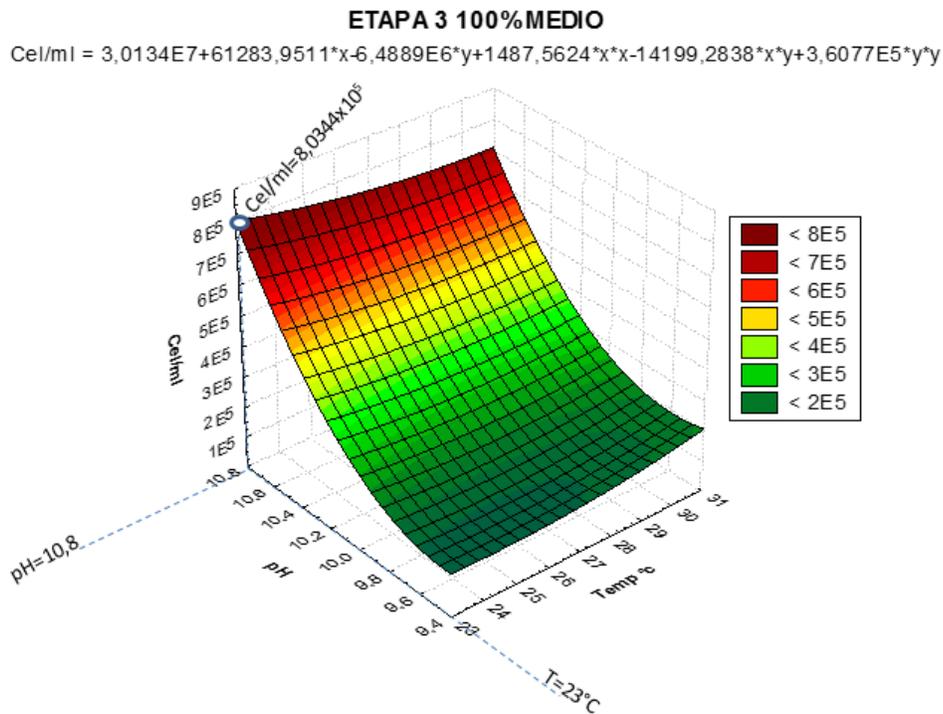
**Tabla 10-8:** coeficiente de correlación fotobiorreactores 6A y 6B correspondientes a la etapa 3.

6A 6B							CORRELACIÓN		
VARIABLE	MEDIA	ERROR ESTANDAR DE LA MEDIA	DESV ESTANDAR	VARIANZA	COEF DE VARIACIÓN	N	pH	Temp	Cel/ml
pH	9,6775	0,023294069	0,154515371	0,023875	1,596645532	44	1,000000	0,042	0,247
Temp	26,82272727	0,274610307	1,821558703	3,31807611	6,791101758	44	0,042	1,000000	-0,413
Cel/ml	17477,72727	3463,843566	22976,53888	527921338,9	131,4618229	44	0,247	-0,413	1,000000

**Obtención de un biofertilizante a partir del cultivo de *Spirulina platensis* en aguas residuales 49 domésticas provenientes del campamento de la estación de bombeo de crudo Rubiales**

La tabla 10-8 muestra los coeficientes de correlación entre las variables temperatura, pH y densidad poblacional de los fotobiorreactores 6A y 6B de la etapa 3, en donde se observa que la correlación entre pH y densidad poblacional es igual a 0,247 cercana a 1, esto indica que la dependencia es positiva y directamente proporcional, a diferencia de la correlación entre temperatura y densidad celular la cual fue negativa para dichos fotobiorreactores y su resultado fue de -0,413.

**Gráfica 10-12:** Superficie de respuesta etapa 3, fotobiorreactores 1A, 1B, que muestra la densidad poblacional en función de la temperatura y el pH.



La metodología de superficie de respuesta es una herramienta poderosa en la optimización de un proceso. Las principales ventajas que ofrece son la comprensión de cómo diferentes factores, denominados variables de proceso, influyen sobre una respuesta determinada, el establecimiento de cualquier posible correlación entre estos factores y la caracterización del efecto combinado que tales factores pueden tener sobre la respuesta (Lozano, 2010, p.19), por lo tanto esta metodología ayuda a identificar la relación que existe entre las variables temperatura y pH, en el crecimiento celular de la *Spirulina platensis*, la gráfica 10-

12 muestra esta relación y su incidencia en la densidad poblacional de los fotobiorreactores con condiciones de 100% medio zarrouk , en donde la función que representa este modelo corresponde a la ecuación 10.3.

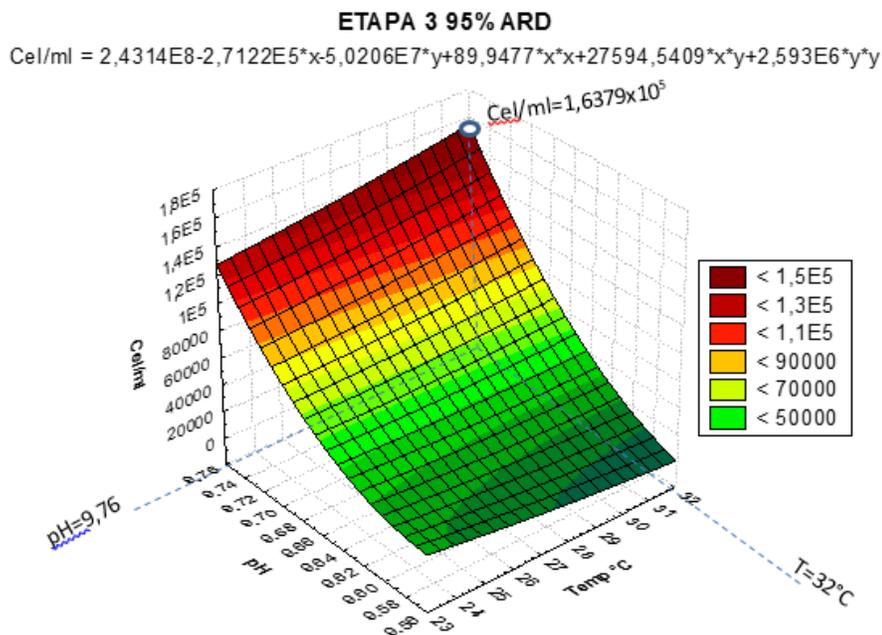
$$\frac{Cel}{ml} = 33,0134E7 + 61283,9511X - 6,4889E6Y + 1487,5624X^2 - 14199,2838XY + 3,6077E5Y^2$$

Donde Y corresponde a pH y X a temperatura.

(10.3)

El punto óptimo determinado para los fotobiorreactores 1A y 1B es una densidad poblacional de  $8,0344 \times 10^5$ , generado en las condiciones de pH 10,8 y temperatura 23°C.

**Gráfica 10-13:** Superficie de respuesta etapa 3, fotobiorreactores 2A, 2B, con 95% de aguas residuales como sustrato. Densidad poblacional en función de la temperatura y el pH.



En la gráfica 10-13 se observa la superficie de respuesta de la densidad poblacional en función del pH y la temperatura de los fotobiorreactores 2A y 2B, los

**Obtención de un biofertilizante a partir del cultivo de *Spirulina platensis* en aguas residuales 51 domésticas provenientes del campamento de la estación de bombeo de crudo Rubiales**

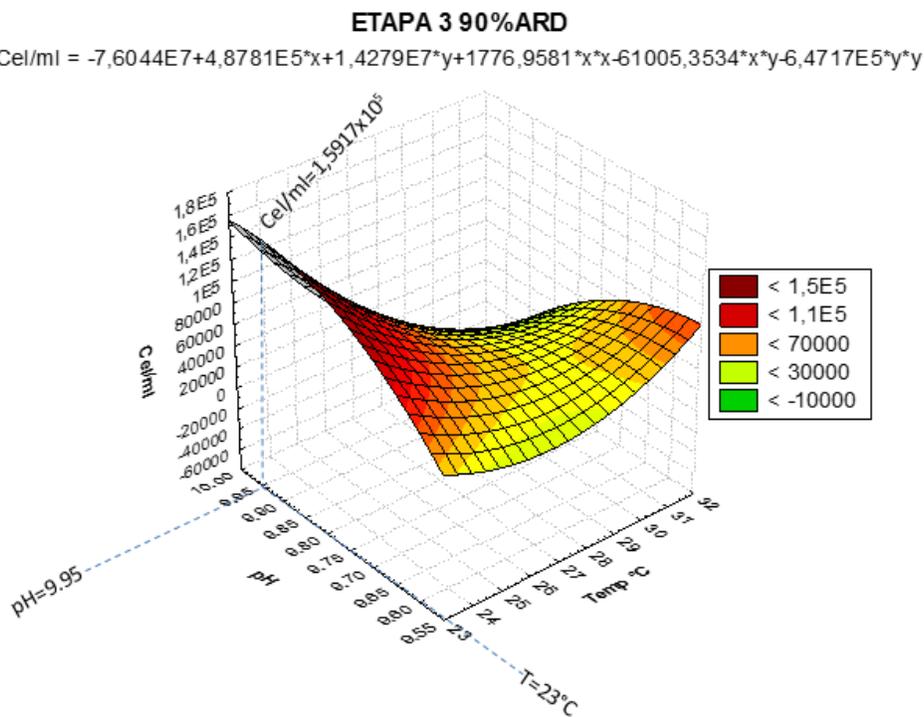
cuales su medio de cultivo contenía 95 % de aguas residuales domésticas tratadas, por lo tanto el modelo estadístico que lo representa es la ecuación (10.4), en donde al aplicar la metodología de optimización multidimensional no restringida, el punto óptimo tiene las siguientes características  $1,6379 \times 10^5$  cel/ml, en condiciones de 9,79 de pH y  $32^\circ\text{C}$ , estas condiciones muestran la relación entre las tres variables monitoreadas durante el desarrollo de los bioensayos.

$$\frac{\text{Cel}}{\text{ml}} = 2,4314E8 - 2,7122E7X - 5,0206E7Y + 89,9477X^2 + 27594,5409XY + 2,593E6Y^2$$

Donde Y corresponde a pH y X a temperatura.

(10.4)

**Gráfica 10-14:** Superficie de respuesta etapa 3, fotobiorreactores 3A, 3B, con 90% de aguas residuales como sustrato. Densidad poblacional en función de la temperatura y el pH.



En la gráfica 10-14 se puede observar la superficie de los fotobiorreactores 3A y 3B, en donde la función determinada corresponde a la ecuación 10.5, la cual al ser

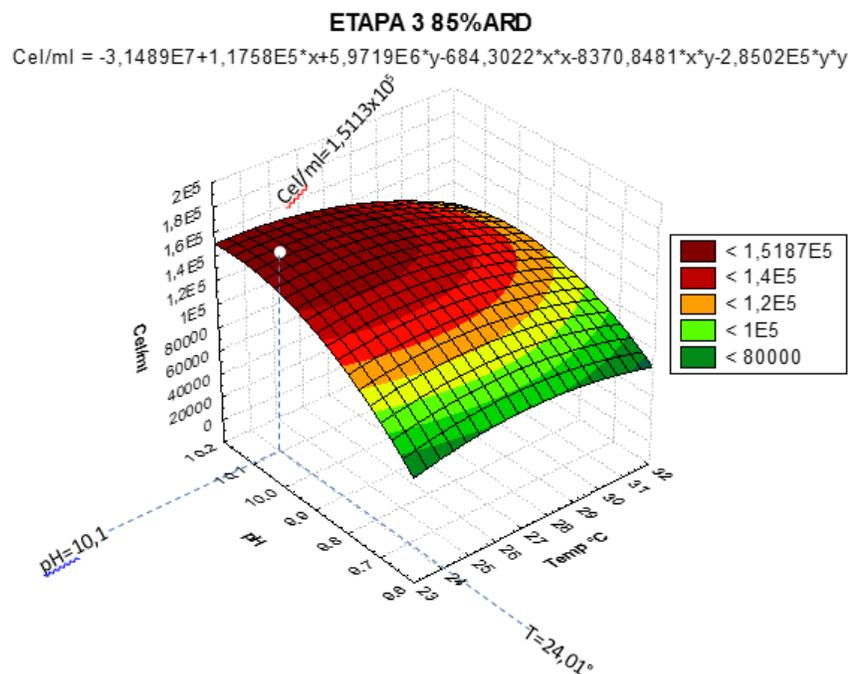
evaluada en forma repetida con los valores seleccionados aleatoriamente de la variable independiente (Chapra, Canale, del Valle, 2007, p. 378), se determinaron las condiciones óptimas desarrolladas en este bioensayo las cuales fueron pH 9,95 y temperatura 23°C, para obtener una densidad poblacional igual a  $1,5917 \times 10^5$ .

$$\frac{Cel}{ml} = -7,6044E7 + 4,8781E5X + 1,4279E7Y + 1776,9581X^2 - 61005,3534XY - 6,4717E5Y^2$$

Donde Y corresponde a pH y X a temperatura.

(10.5)

**Gráfica 10-15:** Superficie de respuesta etapa 3, fotobiorreactores 4A, 4B, con 85% de aguas residuales como sustrato. Densidad poblacional en función de la temperatura y el pH.



Al identificar en los resultados anteriores de densidad poblacional y pH, se evidencia que los fotobiorreactores que contenían 85% de aguas residuales domésticas tratadas como medio de cultivo, fueron los que presentaron mejores características y uniformidad durante los 22 días del bioensayo, en la gráfica 10-15 se puede observar la superficie de respuesta de la densidad poblacional en función

del pH y la temperatura de los fotobiorreactores 4A y 4B, en donde se determinó el modelo estadístico que lo representa, el cual corresponde a la ecuación 10.6

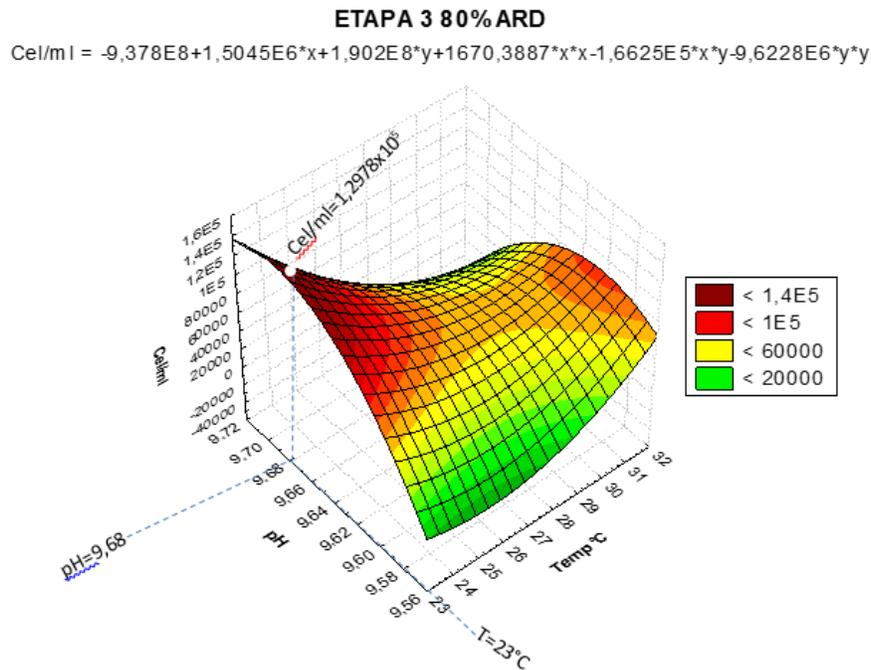
$$\frac{Cel}{ml} = -3,1489E7 + 1,1758E5X + 5,9719E6Y - 684,3022X^2 - 8370,8481XY - 2,8502E5Y^2$$

Donde Y corresponde a pH y X a temperatura.

(10.6)

De acuerdo al modelo establecido en las condiciones de T=24,01°C y pH=10,1 el valor de la función objetivo es Cel/ml = 1,5113 x 10<sup>5</sup> ,571 x 10<sup>5</sup>, valor óptimo de este bioensayo.

**Gráfica 10-16:** Superficie de respuesta etapa 3, fotobiorreactores 5A, 5B, con 80% de aguas residuales como sustrato. Densidad poblacional en función de la temperatura y el pH.



En la gráfica 10-16 se puede observar la superficie de respuesta de la densidad poblacional en función del pH y la temperatura, de los fotobiorreactores denominados 5A y 5B, en los cuales el medio de cultivo correspondió a 80% de

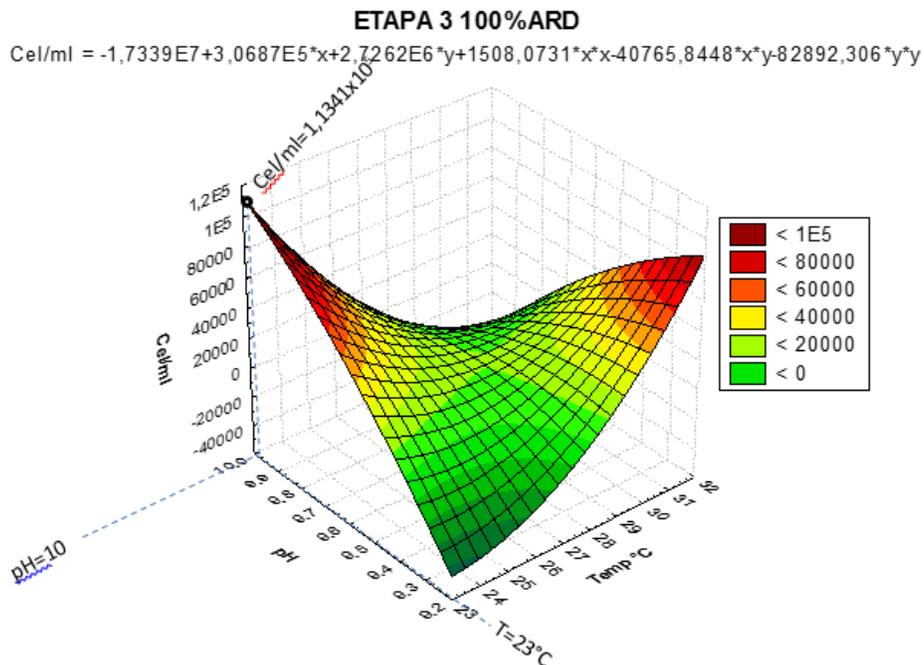
aguas residuales domesticas tratadas, en este bioensayo la función que se determinó por la metodología de superficie de respuesta es la correspondiente a la ecuación 10.7, esta función al ser evaluada por datos aleatorios del mismo ensayo, da como resultado las condiciones adecuadas de pH 9,68 y temperatura 23°C, para que la *Spirulina platensis* haya aumentado su densidad poblacional a  $1,2978 \times 10^5$ ,

$$\frac{Cel}{ml} = -9,378E8 + 1,5045E6X + 1,902E8Y + 1670,3887X^2 - 1,6625E5XY - 9,6228E6Y^2$$

Donde Y corresponde a pH y X a temperatura.

(10.7)

**Gráfica 10-17:** Superficie de respuesta etapa 3, fotobiorreactores 6A, 6B, que contenía 100% de aguas residuales como sustrato. Densidad poblacional en función de la temperatura y el pH.



El medio de cultivo que se utilizó para el desarrollo de los fotobiorreactores 6A y 6B corresponde a 100% de aguas residuales domesticas tratadas, el modelo

estadístico que lo representa es la ecuación 10.8, la cual permitió obtener las condiciones óptimas de densidad poblacional, en función de la temperatura y el pH, en la gráfica 10-17 y de acuerdo a método directo de optimización multidimensional no restringida se puede observar la superficie de respuesta de la densidad poblacional a pH 10 y temperatura 23°C, de acuerdo a estas condiciones es posible obtener  $1,1341 \times 10^5$  cel/ml de *Spirulina platensis*.

$$\frac{Cel}{ml} = -1,7339E7 + 3,0687E5X + 2,7262E6Y + 1508,0731X^2 - 40765,8448XY - 82892,306Y^2$$

Donde Y corresponde a pH y X a temperatura.

(10.8)

## 10.4 etapa 4

Al finalizar la etapa 3 se realizaron análisis de laboratorios a los 12 fotobiorreactores en los siguientes parámetros:

**Tabla 10-9:** Parámetros analizados a los 12 fotobiorreactores.

PARÁMETRO	UNIDADES	MÉTODO
HIERRO	mg Fe/L	S.M 31111-B
POTASIO	mg K/L	S.M 31111-B
MAGNESIO	mg Mg/L	S.M 31111-B
MANGANESO	mg Mn/L	S.M 31111-B
NITROGENO	mg N/L	S.M 4500 Norg-C
FOSFORO	mg P/L	S.M 4500 P B,E
ZINC	mg Zn/L	S.M 3111 B

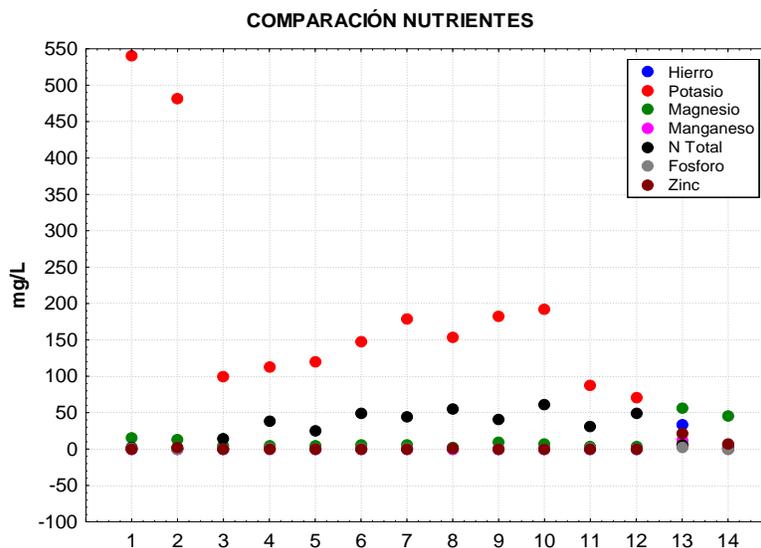
En la tabla 10-10 se observa los resultados obtenidos de estos análisis, los cuales fueron comparados con los resultados obtenidos en la investigación denominada Comparación química entre dos fertilizantes ecológicos de origen natural: CBFERT y BIOPLASMA, llevada a cabo por Mayra González Hurtado, Iluminada Quintana Amador y Carmen Rodríguez Acosta en el Centro de Ingeniería e Investigaciones Químicas, Departamento de Química Inorgánica, Calle F y Calzada, No 115, El Vedado, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, Cuba; en este trabajo se realizó un estudio comparativo entre dos fertilizantes ecológicos, el BIOPLASMA

que es un abono líquido natural que contiene microalgas (*F. coronella*), el cual ha demostrado su efectividad en diferentes cultivos vegetales y el CBFERT, fertilizante formulado en el laboratorio enriquecido con cianobacterias (*Spirulina platensis*) y con iones metálicos acomplejados EDTA (González, Quintana, Rodríguez, 2002, p. 11-12).

**Tabla 10-10:** Resultados de análisis de laboratorio frente a comparativo realizado entre CBFERT y BIOPLASMA.

NUMERO	Nombre	Hierro (mg/L)	Potasio (mg/L)	Magnesio (mg/L)	Manganeso (mg/L)	Nitrogeno (mg/L)	Fosforo (mg/L)	Zinc (mg/L)
1	1A	0,44	540,7	15,38	0,06	2,68	1,66	0,18
2	1B	0,44	481,5	13,41	0,06	0,5	0,31	1,9
3	2A	0,11	99,3	4,19	0,05	13,9	0,41	0,1
4	2B	0,49	112,7	4,38	0,05	38,45	1,5	0,12
5	3A	0,19	120,4	4,71	0,05	25,57	0,45	0,24
6	3B	0,24	148,1	5,63	0,05	48,58	0,89	0,22
7	4A	0,16	178,3	5,27	0,05	44,06	0,8	0,12
8	4B	0,1	153	1,76	0,05	55,02	1,63	1,19
9	5A	0,12	182,6	8,94	0,05	40,86	0,17	0,11
10	5B	0,46	191,5	6,42	0,05	61,6	0,11	0,17
11	6A	0,1	87,6	3,17	0,05	31,32	0,75	0,06
12	6B	0,12	70,5	3,33	0,05	49,56	0,28	0,09
<b>PROMEDIO</b>		0,25	197,18	6,38	0,05	34,34	0,75	0,38
13	CBFERT	33,4	4,97	56,24	11,64	6	2,7	20,99
14	BIOPLASMA	6	0,07	46	2,3	0,5	0,03	7,4

**Gráfica 10-18:** Comparación de nutrientes mg/L entre los resultados obtenidos en los fotobiorreactores, y los datos obtenidos en la literatura acerca del CBFERT y BIOPLASMA.



Al observar la gráfica 10-18 se evidencia que el Potasio se encuentra en mayor cantidad en los resultados obtenidos de los análisis realizados a los fotobiorreactores, que en el CBFERT Y BIOPLASMA, siendo este macronutriente vital para los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, y no solo aumenta el rendimiento de los cultivos, sino que también beneficia muchos aspectos de la calidad del cultivo (Imas, p. 1), este resultado es de gran importancia debido a que el potasio es absorbido por las plantas en cantidades mucho mayores que otros nutrientes excepto el Nitrógeno (Hernández, Barbazan, Perdomo, 2010, p. 3). Otro macronutriente presente en mayor cantidad en los fotobiorreactores corresponde al Nitrógeno, este nutriente juega un rol esencial en el crecimiento del vegetal, ya que es constituyente de moléculas como: clorofila, aminoácidos esenciales, proteínas, enzimas, nucleoproteínas, hormonas, trifosfato de adenosina (ATP). Además, el N es esencial en muchos procesos metabólicos, como por ejemplo, la utilización de los carbohidratos. (Perdomo, Barbazan, Duran, p. 50).

En la tabla 10-10 se evidencia que la presencia de microelementos como el Manganeseo, zinc, hierro, es más alta en los fertilizantes CBFERT y BIOPLASMA, que el obtenido en los análisis de los 12 fotobiorreactores, estos micronutrientes forman una parte importante de los procesos esenciales de las plantas, el Zinc interviene en la formación de hormonas que afectan el crecimiento de las plantas, participa en la formación de proteínas y si no hay una cantidad adecuada de Zinc en la planta, no se aprovechan bien el Nitrógeno ni el Fósforo (BR Global, LLC, 2016), mientras que el hierro es un componente estructural de las moléculas de porfirina: citocromos, hem, hematina, ferricromo, hemoglobinas animales y vegetales. Involucrado en reacciones de oxidación-reducción en la respiración y la fotosíntesis (Benavides, 1999); por otro lado el Manganeseo influye en el aprovechamiento del nitrógeno por la planta, actúa en la reducción de los nitratos, se considera importante en la asimilación del anhídrido carbónico (fotosíntesis) y en la formación de caróteno, rivo flavina y ácido ascórbico (BR Global, LLC, 2016).

El magnesio obtenido en los 12 fotobiorreactores es menor que los mg/L que contiene el CBFERT y el BIOPLASMA, el magnesio interviene en muchas

funciones vitales de las plantas entre las cuales se encuentran, formación de ATP en los cloroplastos, fijación fotosintética del CO<sub>2</sub>, síntesis de proteínas, formación de clorofila, fotooxidación de los tejidos de las hojas, en consecuencia, varios procesos fisiológicos y bioquímicos para la planta se alteran cuando existe deficiencia de Mg. (Cakmak, Yazici, 2010, p. 23).

El fósforo constituye un componente primario de los sistemas responsables de la captación, almacenamiento y transferencia de energía, y es componente básico en las estructuras de macromoléculas de interés crucial, tales como ácidos nucleicos y fosfolípidos, por lo que se puede decir que su papel está generalizado en todos los procesos fisiológicos (Fernández, 2007, p. 52), al observar la tabla 10-10 se evidencia que los mg/L de fósforo presentes en los fotobiorreactores, son más altos que los del BIOPLASMA pero menores que el CBFERT, indicando el aporte tan importante que tienen los productos obtenidos en cuanto a la presencia de los macronutrientes esenciales para el desarrollo metabólico de las plantas.

# 11. Conclusiones y recomendaciones

## 11.1 Conclusiones

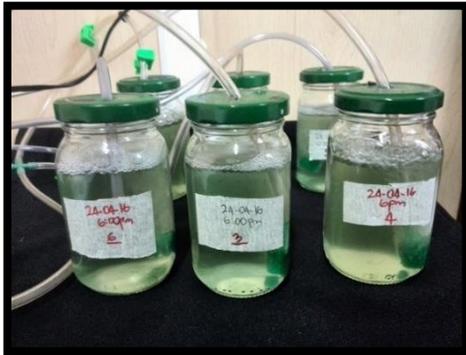
- La *Spirulina platensis* es una microalga con una composición bastante importante que puede ser usada como biofertilizante, debido a la cantidad de macro y micronutrientes que ella contiene, así como vitaminas y aminoácidos, de gran interés para el desarrollo adecuado de las plantas.
- La *Spirulina platensis* demostró su capacidad de adaptación a las condiciones ambientales presentes en la zona, por lo tanto el área donde se desarrolló el proyecto muestra un potencial alto para el cultivo a gran escala de este microorganismo.
- Al llevar a cabo la etapa tres del proyecto, se determinó de manera positiva la adaptación de la microalga *Spirulina platensis* a diferentes concentraciones de aguas residuales previamente tratadas, provenientes del campamento de la estación de bombeo de crudo Rubiales, siendo la mejor alternativa los bioensayos elaborados con el 85% de aguas residuales tratadas, como se evidenció en las gráficas de superficie de respuesta.
- Debido a que el rango de temperatura de crecimiento de la *Spirulina platensis* se encuentra entre 25 y 40°C (Zarrouk, 1966), después de la fase de adaptación se evidenció crecimiento del microorganismo, en todos los fotobiorreactores de cada una de las etapas, este comportamiento se identificó por el aumento de la densidad poblacional así como del pH.
- Los análisis de la etapa 4 indican que el producto obtenido se puede utilizar como biofertilizante, debido a su composición en cuanto a Nitrógeno, Potasio y Fosforo, pero es importante determinar las dosis adecuadas para cada tipo de cultivo, así como la adición de otro biofertilizante que aporte los micronutrientes que se encontraron en menor cantidad en los bioensayos realizados.

- Se determinó que el uso del 100% de las aguas residuales domésticas tratadas provenientes del campamento de la estación de bombeo de crudo RUBIALES, sirven como medio de crecimiento para la microalga *Spirulina platensis*, brindándole los nutrientes necesarios para su adaptación.

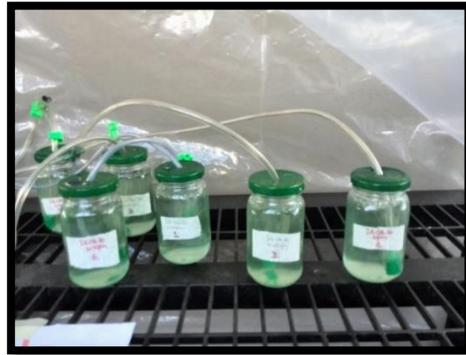
## 11.2 Recomendaciones

- Realizar pruebas de los productos obtenidos, en cultivos para determinar su funcionamiento.
- Tener en cuenta la ubicación de los fotobiorreactores para que todos obtengan la misma incidencia de luz.
- Aumentar el tiempo de exposición de la etapa 3, para permitir evidenciar la adaptación completa de la *Spirulina platensis* en aguas residuales y de esta manera aumentar la densidad poblacional del microorganismo para obtener mejores resultados en la etapa 4.
- Realizar análisis de laboratorio para determinar el aporte de vitaminas y aminoácidos que proporcionaría a las plantas.

## A Anexo: Fotografías etapa 1



1. Fotobiorreactores etapa 1 a los 2 días de iniciar los bioensayos



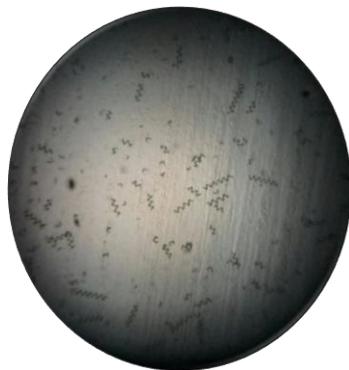
2. Fotobiorreactores etapa 1 a los 6 días de iniciar los bioensayos.



3. Toma de pH y temperatura a los 6 días de iniciar los bioensayos



4. Toma de pH y temperatura a los 10 días de iniciar los bioensayos



5. Vista 4X de etapa 1 a los 20 días



6. Vista 4X de etapa 1 a los 10 días

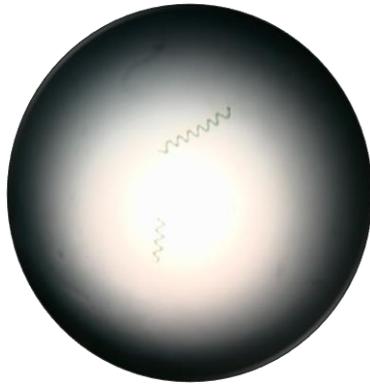
## B Anexo: Fotografías etapa 2



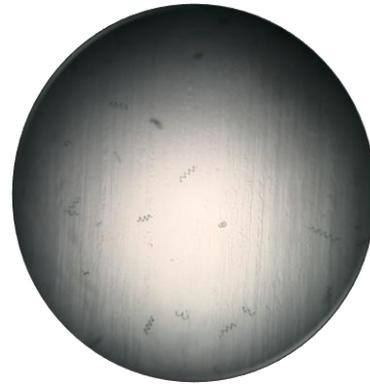
1. Fotobiorreactores 2 etapa a los 2 días



2. Fotobiorreactores etapa 2 a los 6 días



3. Vista 10X de etapa 2 a los 2 días



4. Vista 4X de etapa 1 a los 4 días

## C Anexo: Fotografías etapa 3



1. Fotobiorreactores etapa 3 a los 2 días



2. Fotobiorreactores etapa 3 a los 20 días



3. Toma de muestras por el laboratorio a los fotobiorreactores etapa 3



4. Toma de muestras por el laboratorio a los fotobiorreactores etapa 3

## Bibliografía

1. Abdel-Raouf, N. Al-Homaidan, A. Ibraheem, I. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, (19), 257-275.
2. Benavides, A. (1999). Absorción y asimilación de hierro en las plantas. Departamento de horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Recuperado el 3 de noviembre de 2016 en: [http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/hierro\\_en\\_plantas.pdf](http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/hierro_en_plantas.pdf).
3. Betancourt, L. (1997). Producción, purificación y caracterización de la ficocianina de *Synechococcus* sp. IO9201 aisladas en aguas de Cuba. Tesis de doctorado. Universidad de Coruña. Departamento de Biología Celular y Molecular. Cuba.
4. BR Global, LLC. "Importancia de los micronutrientes". Recuperado el 30 de octubre de 2016 en: <http://www.brglimited.com/download/MicroNutrientes.pdf>.
5. Cakmak, I. Yazici, A. (2010). Magnesio: el elemento olvidado en la producción de cultivos. *Better Crops*. 94, (4), 23-25.
6. Centro de Investigación pesquera (CRIP). Protocolo de microalgas. Manzanillo, Colima.
7. Cevallos, M. Trabajo de métodos numéricos, Universidad Técnica de Manabí: Recuperado el 6 de noviembre de 2016 en <http://es.slideshare.net/totycevallos/optimizacin-mtodos-numricos>.
8. Chapra, S. Canale, R. del Valle, J. (2007). *Métodos numéricos para ingenieros*. Mc Graw Hill. Quinta edición. México.
9. Chinnasamy, et al. (2010). Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresource Technology*, 1001, (9), 3097-31105.

10. Ciferri, O. (1983). *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbiol Rev.* 47, (4), 551–578.
11. Contreras-Flores C, J Peña-Castro, L Flores-Cotera & R Cañizares-Villanueva. (2003). Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia*, 8, (28), 450-456.
12. Delgadillo, O. Camacho, A. Pérez, L. Andrade, M. (2010). Depuración de aguas residuales por medio de humedales artificiales. Cochabamba, Bolivia.
13. Espinoza, V. Castillo, R. Rovira, D. (2014). Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos como indicadores de la calidad de las aguas de la subcuenca baja del río David, provincia de Chiriquí, Universidad tecnológica Oteima. Panamá.
14. Fernández, M. (2007). Fosforo: amigo o enemigo. Instituto cubano de investigaciones de los derivados de la caña de azúcar. 41, (41), 51-57. Cuba.
15. Gershwin, M. Belay, A. (2008). *Spirulina in human nutrition and health*.
16. Gómez, N. (2005). Remoción de materia orgánica por coagulación – floculación. Universidad Nacional de Colombia. Manizales.
17. Gonzales, M. Quintana, I. Rodríguez, C. (2002). Comparación química entre dos fertilizantes ecológicos de origen natural: CBFERT y BIOPLASMA. *Revista CENIC Ciencias Químicas*. 33, (1), 11-13. Cuba.
18. Gudín, C. Chaumont, D. (2003). Cell fragility — The key problem of microalgae mass production in closed photobioreactors. *Bioresource Technology* 38, (2-3), 145-151.
19. Gutiérrez, H. de la Vara, R. (2008). Análisis y diseño de experimentos. Mc Graw Hill, Segunda edición. México.
20. Imas, P. El potasio: nutriente esencial para aumentar el rendimiento y la calidad de las cosechas. ICL fertilizers. Israel.

21. Laboratorio de Sistemas Ambientales. (2006). Procedimiento para la Medición de Sólidos Totales. Universidad Tecnológica de Panamá.
22. Ley 99 (1993) República de Colombia - Gobierno Nacional, Diciembre 22 de 1993.
23. Lincoln, Edward P.; Crawford, James J. W.; Wilkie, Ann C., (1993). *Spirulina* in animal agriculture. Bulletin de l'Institut Oceanographique (Monaco) 0(SPEC ISSUE 12): 109-115
24. López, A. (2011). Obtención de un biofertilizante a partir del residuo ultra fino de *Spirulina platensis*, mediante degradación anaerobia en fase hidrolítica. Escuela Politécnica Del Ejército. Sangolquí. Ecuador.
25. Lozano, L. (2010). Aplicación de la metodología de superficie de respuesta en la optimización de la producción de biodiesel a partir de aceite de microalgas mediante transesterificación en fase homogénea. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga.
26. Malgas. (2013). Aplicaciones de las microalgas: estado de la técnica. Giron, Asturias: Editorial AST Ingeniería S.L.
27. Martin, F. (2010). Optimization of photobioreactor for astaxanthin production in *Chlorella zofingiensis*. Tesis de maestría en ingeniería. National University Of Singapore.
28. Martínez L. (2008). Eliminación de CO<sub>2</sub> con microalgas autóctonas. Tesis Doctoral, Instituto de Recursos Naturales, Universidad de León, León.
29. McGriff, E. McKinney, R. (1972). The removal of nutrients and organics by activated algae. Water Research, 6, (10), 1155-1164.
30. Miller, A. Colman, B. (1980). Evidence for HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Transport by the blue-green alga (cyanobacterium) *Coccochloris penicystis*. Plant Physiol. 65, 397-402.

31. Molina, A. (2003). Quelatos como fertilizantes. Taller de abonos orgánicos. Costa Rica.
32. Park, J. Craggs, R. Shilton, A. (2011). Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology*, 102: 35-42.
33. Pedraza, G. (1989). Cultivo de *Spirulina maxima* para suplementación proteica. Fundación CIPAV, AA 20591, Cali, Colombia.
34. Pelizer, L. Sassano, C. Carvalho, J. Sato, S. Gioielli, L. Moraes, I. (1999). Padronização do método de secagem da biomassa de *Spirulina platensis*. *Farm. & Quím*, 3, 54-57.
35. Pelizer, L. (2000). Estudos de obtenção de *Spirulina platensis*, por fermentação em estado Sólido. Tese de Doutorado, USP/FCF/SP Brasil - Tecnologia das Fermentações.
36. Pelizer, L. Sassano, C. Carvalho, J. Sato, S. Gioielli, L. Moraes, I (2002). *Spirulina platensis* growth estimation by pH determination at different cultivations conditions. *Electronic Journal of Biotechnology*. 5, (3), 251-257.
37. Perdomo, C. Barbazan, A. Duran, J. (2010). Nitrógeno. Área de suelos y aguas catedra de fertilidad. Universidad de la Republica. Montevideo, Uruguay.
38. Phang, S. et al. (2000). *Spirulina* cultivation in digestd sago starch Factory wastewater. *J Apply Phycol*, 12, (3-5), 395-400.
39. Pittman, J. Dean, A. Osundeko, O. (2011). The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*. 102, (1), 17-25.
40. Posten C. 2009. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Engineering in Life Science*. Vol. 9. Num 3. (165-177).
41. Resolución 631 (2015). Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. República de Colombia. Diario oficial No. 49.486, Marzo 17 de 2015.

42. Richmond, A. (1986). Microalgaculture. CRC, Critical Reviews in Biotechnology, 4, 369-438.
43. Richmond, A. (2004). Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Ben-Gurion University of the Negev, Israel.
44. Sánchez, M., Bernal, J., Rozo, C., Rodríguez, I., (2003). *Spirulina* (Arthrospira): an edible microorganism. A review. Universitas Scientiarum. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.
45. Serediak, N. Huynh, M. Algae Identification Field Guide. Agriculture and Agri-Food Canada. (2006). Canada. Autor.
46. UNAD. Tratamiento de aguas residuales: recuperado el 5 de noviembre de 2016  
[http://datateca.unad.edu.co/contenidos/301332/contLinea/leccin\\_2\\_caracteristicas\\_de\\_las\\_aguas\\_residuales.html](http://datateca.unad.edu.co/contenidos/301332/contLinea/leccin_2_caracteristicas_de_las_aguas_residuales.html).
47. Vonshak, A. (1996). *Spirulina platensis* (Arthrospira) Physiology, cell-biology and biotechnology. Israel: Taylor&Francis.
48. Xu, H. Miao X, Wu Q. (2006). High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. J Biotechnol. 126, (4), 499-507.
49. Zarrouk, C. (1966). Contribution a l'étude d'une cyanobacterie: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina máxima*. Paris.