



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

Facultad Ciencias de la Salud
Programa Maestría en Microbiología

**Diseño de un biofiltro para compuestos nitrogenados
utilizando *Chlamydomonas* sp. procedentes de vallados de
Mosquera- Cundinamarca**

Viviana Caicedo Pineda

Bogotá D.C., Colombia
Marzo 2023

**Diseño de un biofiltro para compuestos nitrogenados
utilizando *Chlamydomonas* sp. procedentes de vallados de
Mosquera- Cundinamarca**

Magíster en Microbiología
(Modalidad de Profundización)

Viviana Caicedo Pineda
Licenciada en Biología
Magíster en docencia de las Ciencias Naturales

Directora:
Judith Elena Camacho Kurmen
Química Farmacéutica, Esp. MSc en Medio Ambiente y Desarrollo,
Doctora en Biociencias
Docente Facultad Ciencias de la Salud

Línea de Investigación:
Ecología y desarrollo sostenible
Grupo de Investigación: Bioprocesos y control

Bogotá D.C., Colombia
Marzo 2023

Dedicatoria

Pese a tu ausencia material, me diste fuerza para terminar hasta el final, gracias por haber compartido tus conocimientos conmigo. Este trabajo va en tu honor y memoria, hermanita.

A mi padre quien me mantuvo cohesiva a la realidad.

A Vale Q.E.P.D, por su ayuda en el trabajo.

Agradecimientos

A la profesora Judith Elena Camacho Kurmen, por su constante e incondicional apoyo en la realización de este trabajo.

Al Grupo Bioprocesos y control por el apoyo en materiales y reactivos para el desarrollo de este trabajo.

Al laboratorio central de la Universidad Mayor de Cundinamarca por el espacio y los instrumentos para llevar acabo el trabajo.

Al Grupo Centro Nacional de Secuenciación Genómica de la Universidad de Antioquia.

Al laboratorio de suelos y agua de la Universidad Jorge Tadeo Lozano.

Resumen

El aumento de la contaminación ha llevado a que en los ecosistemas acuáticos generen un desequilibrio bioquímico y biológico ocasionando pérdida de especies locales y migratorias, en especial en los humedales y los remanentes de estos, los vallados, que se encuentran localizados en zonas urbanas y/o rurales con constante ingreso de contaminantes. Por lo cual, la recuperación de estos ecosistemas, está enfocado en reducir compuestos nitrogenados que se relacionan con el aumento de eutrofización, a través del uso de microorganismos nativos, como las microalgas, aprovechando su metabolismo para reducir las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato. Los objetivos de este trabajo fueron diseñar un biofiltro con capacidad de bioabsorción de compuestos nitrogenados utilizando microalgas libres y microencapsuladas, aisladas de cuerpos de agua de vallados así como determinar la capacidad del biofiltro diseñado para la bioabsorción de estos compuestos.

El vallado utilizado presentó una concentración de Amonio (N-NH_4^+) de 2,5 mg/l y de Nitrato (NO_3^-) de 2,2 mg/l, con un pH de 7. La microalga aislada pertenece al género *Chlamydomonas sp.* Esta microalga usa fuentes inorgánicas de nitrógeno para su crecimiento, lo cual permite aplicarla para biotratar aguas residuales con altos contenidos de compuestos nitrogenados. Se diseñaron los biofiltros utilizando $8,44 \times 10^6$ células/ ml de la microalga (μ_{max} 0,077/día). Se observó que los biofiltros diseñados con la microalga bajo las condiciones trabajadas incrementaron el NH_4^+ y NO_3^- presente, por lo que se necesita más investigación para optimizar los biofiltros y la eliminación de estos compuestos en el agua de los vallados.

Palabras clave: Eutrofización, vallados, microalgas, biofiltración, compuestos nitrogenados.

Abstract

The increase in pollution has led aquatic ecosystems to generate a biochemical and biological imbalance, causing losses of local and migratory species, especially in wetlands and their remnants, the ditches, which are located in urban areas and/or rural with constant entry of contaminants. Therefore, the recovery of these ecosystems is focused on reducing nitrogenous compounds that are related to the increase in eutrophication, through the use of native microorganisms, such as microalgae, taking advantage of their metabolism to reduce ammonium, nitrite and nitrate concentrations. The objectives of this work are to design a biofilter with the capacity to remove nitrogenous compounds using free and microencapsulated microalgae, isolated from water bodies arising from ditches, as well as determine the capacity of the biofilter designed for the removal of these compounds.

The sample taken from the stagnant water has an ammonium (N-NH_4^+) concentration of 2.5 mg/l and nitrate (NO_3^-) of 2.2 mg/l, with a pH of 7. The isolated microalgae belongs to the genus *Chlamydomonas* sp. This microalga uses inorganic sources of nitrogen for its growth, which allows it to be used as biotreatment wastewater with high content of nitrogenous compounds. Biofilters were designed using $8,44 \times 10^6$ cells/ ml microalgae (μ_{max} 0,077/day). It was observed that the biofilter designed with the microalga under the worked conditions increased the NH_4^+ and NO_3^- present, therefore more research is needed to optimize the biofilters and the elimination of these compounds from the ditch.

Keywords: Eutrophication, ditches, *Chlamydomonas* sp., biofiltration, nitrogenous compounds.

Contenido

1. Introducción.....	1
1.1 Planteamiento del problema	2
1.2 Justificación.....	3
2. Marco conceptual y generalidades	6
2.1 Marco conceptual y generalidades.....	6
2.1.1 Ecosistemas acuáticos cuerpos de agua.....	6
2.1.2 Contaminación de aguas	7
2.1.3 Eutrofización	7
2.1.4 Ciclo del nitrógeno y asimilación del NO_2^- NO_3^- y NH_4^+	9
2.1.5 <i>Chlamydomonas</i> sp.....	11
2.1.6 Producción a gran escala-microalgas en fotobiorreactor	13
2.1.7 Métodos para la microencapsulación.....	15
2.1.8 Biofiltración.....	16
3. Objetivos.....	18
3.1 Objetivo general	18
3.2 Objetivos específicos.....	18
4. Diseño metodológico	19
4.1 Fase 1 Caracterización de las microalgas presentes en muestras colectadas de cuerpos de agua de vallados.	20
4.1.1 Caracterización físicoquímica de las aguas provenientes de vallados	20
4.1.2 Caracterización de las microalgas nativas.....	20
4.1.3 Producción de biomasa de la microalga nativa en el biorreactor biostat a plus 22	
4.1.4 Generación de las curvas de crecimiento	23
4.1.5 Determinación de los parámetros cinéticos de crecimiento	23
4.1.6 Determinación de los cambios morfológicos celulares	23
4.1.7 Determinación de clorofila	23
4.2 Fase 2. Diseño del biofiltro con las microalgas libres y microencapsuladas aisladas de cuerpos de agua en vallados.	24
4.2.1 Microencapsulación de microalgas	24
4.2.2 Preparación del macrocápsulas	24
4.2.3 Caracterización de las macrocápsulas.....	25
4.2.4 Diseño del biofiltro	26
4.3 fase 3. Determinación de la capacidad del biofiltro diseñado con microalgas libres e inmovilizadas para bioabsorción de compuestos nitrogenados	26
4.3.1 Porcentaje de bioabsorción de N-NH_4^+ y N-NO_3^+	27
4.3.2 Diseño experimental y análisis estadístico	27
5. Resultados y análisis.....	28

5.1	Caracterización fisicoquímica de las muestras del vallado	28
5.2	Caracterización y crecimiento de la cepa aislada del vallado	30
5.2.1	Identificación molecular	31
5.2.2	Producción de biomasa del alga nativa en el biorreactor biosat a plus	34
5.3	Diseño del biofiltro	37
5.3.1	Microencapsulación	37
5.4	Valores de N-NH ₄ ⁺ y NO ₃ ⁻ después del tratamiento	46
6.	Conclusiones	52
7.	Recomendaciones	54
8.	Referencias	56
9.	Anexos	62

Lista de figuras

Figura 1. Ciclo del nitrógeno, procesos y enzimas involucradas.	10
Figura 2. Morfología y estructura microscópica de <i>Chlamydomonas</i> sp.	12
Figura 3. Diagrama de FBR con microcápsulas con microalgas (a) y microalgas libres (b).	15
Figura 4. Fotos del lugar de muestreo. A la izquierda ubicación exacta y coordenadas del lugar del muestreo.	28
Figura 5. Fotografía ciclo de vida de <i>Chlamydomonas</i> sp en aumento 100X.....	30
Figura 6. Inóculo con <i>Chlamydomonas</i> sp.....	31
Figura 7. Resultados emparejamiento en BLAST. A. Secuencias relacionadas con el marcador ITS. B. Secuencias relacionadas con el marcador 18S.	32
Figura 8. Análisis filogenético (Maximum likelihood) basado en el marcador molecular 18S.....	33
Figura 9. Crecimiento a gran escala de <i>Chlamydomonas</i> sp. en medio BBM en el biorreactor Biostat A Plus de 5 L	35
Figura 10. Gráfica crecimiento logarítmico de <i>Chlamydomonas</i> sp.	36
Figura 11. Concentración de clorofila en el crecimiento de <i>Chlamydomonas</i> sp.....	37
Figura 12. Esferas de alginato con microalga aislada, medición de diámetro	38
Figura 13. A B y C Superficie de respuesta de la variable de tamaño en función de concentración de alginato de sodio, cloruro de calcio y agitación en rpm, para la elaboración de macrocápsulas.	39
Figura 14. A, B y C Superficie de respuesta de la variable rendimiento en función de agitación (rpm), concentración de alginato y concentración de cloruro de calcio, para la elaboración de macrocápsulas	41
Figura 15. A B y C Superficie de respuesta de la variable frecuencia en función de agitación (rpm), concentración de alginato y concentración de cloruro de calcio, para la elaboración de macrocápsulas	42
Figura 16. Análisis de superficie rendimiento y tamaño	44
Figura 17. Diseño experimental de los distintos tratamientos.	45

Lista de tablas

Tabla 1. Media de valores encontrados en lagos andinos según la concentración de nitrógeno presente.	9
Tabla 2. Detalle de la clasificación taxonómica de las microalgas <i>Chlamydomonas</i> sp.	13
Tabla 3. Componentes Medio Basal de Bold (BBM)	21
Tabla 4. Factores y niveles de las concentraciones de la microencapsulación	25
Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos de muestras de vallados	29
Tabla 6. Matriz de coeficientes del modelo logarítmico ¹⁰ ajustado para el medio de cultivo BBM.....	35
Tabla 7. Resultados y valores óptimos del análisis multicriterio.....	43
Tabla 8. Concentración de N-NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻ y pH después de cada tratamiento	46
Tabla 9. Promedio y desviación concentraciones de NH ₄ ⁺ según tratamiento	46
Tabla 10. Promedio y desviación estándar concentraciones de NO ₃ ⁻ según tratamiento	47

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
DBO	Demanda bioquímica de Oxígeno
DCW	Producción de biomasa
DQO	Demanda Química de Oxígeno
FBR	Fotobiorreactor
MMB	Medio Basal Bold
rpm	Revoluciones por minuto
dS/m	DeciSiemens por metro
ALGVIV	Código asignado secuencias microalga aislada

1. Introducción

Las actividades humanas están alterando todos los ecosistemas, debido a la generación de contaminantes que, por distintos medios de propagación llegan a los cuerpos de agua ocasionando disturbios al equilibrio y procesos biológicos de especies endémicas que habitan dicha área acuática. El inadecuado manejo de residuos industriales, el incremento de fertilizantes en cultivos aledaños a los cuerpos de agua y las descargas de desechos domésticos, afectan a la estructura y funcionamiento de los cuerpos acuáticos.

El efecto de este desequilibrio fisicoquímico y biológico impacta negativamente los cuerpos de agua dulce principalmente en tres aspectos. En primer lugar, el aumento excesivo y poco controlado de compuestos nitrogenados orgánicos e inorgánicos ocasionado por el incremento de nutrientes en los cuerpos de agua, en segundo lugar, con el incremento de materia orgánica, la descomposición como proceso biológico es representativa, lo que conlleva a una demanda alta de oxígeno atmosférico, por lo cual, las especies dependientes de este, se verán afectadas y perderán su función reguladora en el ecosistema.

Por otro lado, este fenómeno actúa al tiempo con la producción metabólica de contaminantes por otros microorganismos antagónicos al equilibrio ecosistémico y el desarrollo masivo de plantas acuáticas, lo que conlleva una alteración fisicoquímica del ecosistema, resultado del aumento de nutrientes limitantes como los nitritos y los fosfatos que generan un crecimiento exagerado de fitoplancton y plantas acuáticas. Lo anterior evidencia una problemática ambiental que requiere de soluciones y estrategias para disminuir el exceso de nitratos a niveles que no desequilibren el ecosistema, para que, de este modo, se minimicen los impactos negativos en los cuerpos de agua.

En la actualidad se han implementado procesos químicos y físicos en el tratamiento de aguas para la eliminación o disminución de contaminantes que convierten a este recurso no disponible para el consumo humano, sin embargo, estos procesos pueden llegar a

constituir un gasto alto respecto al volumen recuperado en el tratamiento. De igual manera, también pueden llegar a obtenerse desechos provenientes de este proceso que, al no ser parte del ecosistema, podría convertirse en otro problema ambiental.

Distintos métodos biológicos existen en la actualidad para hacer uso de microorganismos que tienen la capacidad de remover y disminuir niveles de moléculas contaminantes en los cuerpos de agua, sin embargo, para poder llevar a cabo estos procesos sin que se genere algún otro desequilibrio ecosistémico es importante que se puedan recuperar las células después del tratamiento. En este sentido, la inmovilización del microorganismo de interés en alginato de sodio y cloruro de calcio plantea ventajas en la recuperación de la biomasa celular en medios acuáticos, al tiempo que permite la protección de la cepa de cualquier elemento que pueda alterar los procesos metabólicos o concentraciones celulares del microorganismo.

El objetivo principal de este trabajo fue diseñar un biofiltro para la bioabsorción de NH_4^+ (amonio) y NO_3^- (nitrato) usando *Chlamydomonas* sp. procedentes de vallados de Mosquera- Cundinamarca, en donde se encuentra la metodología empleada para la obtención de la microalga aislada su crecimiento en fotobiorreactor, la identificación molecular y la determinación de las concentraciones de la inmovilización con alginato de sodio y cloruro de calcio. El biofiltro diseñado debe tener en cuenta factores externos que permitan que la bioabsorción de los compuestos nitrogenados se lleve a cabo por las microalgas, debido a que los cambios de estos factores pueden afectar el proceso de biofiltración de contaminantes.

1.1 Planteamiento del problema

Colombia es un país que se caracteriza por albergar numerosas fuentes hídricas de gran importancia para la mantención de la biodiversidad que posee. Sin embargo, con el aumento de la industrialización, dichos ecosistemas acuáticos están siendo afectados negativamente por la presión antrópica por medio de actividades de urbanización, minería, transporte, cultivos extensivos, uso de agroquímicos entre otros. Esto ha ocasionado que la mayoría de las zonas acuáticas en la zona Andina, presenten acumulación de nutrientes o contaminación, conllevando a la pérdida de muchas de estas zonas(1).

En la actualidad existen distintos métodos útiles que pueden llegar a mitigar dicho aumento de contaminantes a través de protocolos de remoción física o química, sin embargo, estos están entre los más costosos por los reactivos que se requieren y que con el tiempo pueden llegar a perder efectividad, o que en el proceso de remoción pueden generarse distintos productos o desechos que tendrían impacto negativo que puede llegar a ser contraproducente o incluso peor dentro del ecosistema (2).

El desarrollo de tecnologías eficientes y amigables con el medio ambiente como la biorremediación se han convertido en una alternativa sustentable para el saneamiento de ecosistemas que han sido afectados por diversos factores contaminantes (3,4). En este sentido, la biorremediación de los ecosistemas acuáticos usando microorganismos nativos aislados de cuerpos de agua de los vallados pertenecientes a los humedales, como las microalgas que, a través de su metabolismo, plantean metodologías alternativas limpias que pueden ser usados como una posible solución para el mantenimiento de cuerpos de agua contaminados, pues además de reducir, limpiar, depurar contaminantes, como resultado de su metabolismo, se pueden obtener productos de interés industrial y agrícola (5).

Sin embargo, mantener la eficiencia de las microalgas en condiciones adversas es complejo por lo cual, para evitar cualquier daño o modificación en la población se pueden proteger de las condiciones ambientales desfavorables y productos tóxicos a través de procesos como la microencapsulación, para prolongar la remoción eficiente de compuestos contaminantes como los nitrogenados, así como también permitir el diseño de biofiltros utilizando microalgas microencapsuladas como una alternativa novedosa y prometedora para el tratamiento de diversas aguas residuales (6) . Es por esto que se plantea la siguiente pregunta problema

¿Cuál es la efectividad del biofiltro diseñado con microalgas nativas microencapsuladas en la bioabsorción de compuestos nitrogenados?

1.2 Justificación

El constante vertimiento de contaminantes con alta carga de nutrientes a los cuerpos de agua ha originado un problema en todos los ecosistemas que tienen como componentes

este recurso natural o que se encuentran en zonas aledañas y que componen un sistema de distribución originado desde estos ecosistemas. Esta contaminación puede afectar directamente la estabilidad de los ecosistemas acuáticos por la eutrofización, debido al exceso de desechos industriales, agroindustriales o por el aumento de construcciones urbanas que aumentan el riesgo de comunidades biológicas que dependen del ecosistema y que afectan a la salud humana, inclusive en muy bajas concentraciones (7).

Este fenómeno mundial, de pérdidas de cuerpos de agua por contaminación antrópica, se ha acelerado con tal velocidad que en el periodo de 1970 a 1980 los valores de pérdida estaban entre el -0,68 y el -0,69%, comparado un valor que varía entre el -0,85 y el -1,60% anual desde 2000 (8) . De acuerdo los datos del Departamento Nacional de Planeación de Colombia, los sectores productivos generan cerca del 20% de contaminación, de los cuales se destacan actividades tales como producción de papel, producción de sustancias química, mataderos y extracción petrolera en algunas zonas que aumentan la generación de desperdicios que llegarán a afectar gravemente los ecosistemas aledaños y que con el tiempo generarían altos costos en su recuperación (9). Estas actividades que afectan los cuerpos de agua produciendo eutrofización, especialmente por el aumento de nitrógeno, son el resultado del tipo de contaminación derivada del rápido desarrollo de fertilizantes químicos, extracción de petróleo y desechos industriales en general que más impacta en los ecosistemas acuáticos en su estabilidad y equilibrio (10). Por tal motivo, es fundamental generar opciones viables alternas sin efectos adversos en la recuperación de la calidad de agua, que permita transformar y eliminar compuestos nitrogenados y que así mismo, promuevan la conservación de dichas áreas.

En este sentido, la aplicación de tecnologías que involucran procesos biológicos de los microorganismos aislados de los mismos afluentes nativos pueden llegar a ser importantes en la degradación de contaminantes (11), puesto que el uso de uno o varios microorganismos que tengan características fisiológicas relacionadas con la degradación o transformación de varios tipos de contaminantes, permitirían la recuperación de un ecosistema acuático determinado (12,13).

El uso de estas tecnologías plantea también retos en la obtención de la biomasa algal que se genere después del tratamiento de reducción de contaminantes, pues su incremento poblacional puede volverse un contaminante en el medio. Por esta razón, la inmovilización de microorganismos ofrece la posibilidad de controlar el crecimiento de las microalgas, al igual que permite una eficiencia en la disminución y bioabsorción de contaminantes que pueden llegar a ser usados como nutrientes, en comparación a los mismos microorganismos sin inmovilizar. Considerando el potencial de biorremediación que tienen las microalgas, esta tecnología se convierte en una alternativa atractiva y ambientalmente favorable en términos de la recuperación de ecosistemas acuáticos pues no se generan residuos adicionales y se controla el crecimiento poblacional (14,15).

Es por esto que se propuso como objetivo general de este trabajo diseñar un biofiltro para la bioabsorción de NH_4^+ y NO_3^- usando la microalga *Chlamydomonas* sp. aislada de los vallados de Mosquera- Cundinamarca. Esta microalga se identificó molecularmente. Su biomasa se produjo en el Biorreactor Biostat A Plus de 5 litros, y posteriormente se utilizó para el diseño del biofiltro usando las células libres y microencapsuladas en alginato de sodio y Cloruro de Calcio, como método de tratamiento *in vitro* de las aguas de vallado para la bioabsorción de nitrógeno.

2. Marco conceptual y generalidades

Para desarrollar el presente trabajo es importante reconocer cuales son los factores que inciden en la contaminación de cuerpos de agua y cómo es su dinámica físico-químico y biológica para de esta manera, identificar el origen de la contaminación, su efecto y que organismos están inmersos en la absorción de dichos contaminantes comprendiendo metabólicamente como pueden asimilarlo dentro de su estructura.

2.1 Marco conceptual y generalidades

2.1.1 Ecosistemas acuáticos cuerpos de agua

Los humedales y los cuerpos de agua (vallados) han sido reconocidos por la gran variedad de funciones que mantienen un equilibrio ecológico, ya que brindan refugio para una gran diversidad de fauna y flora, allí se producen materias primas para la alimentación y medicina entre otras industrias, hacen un aporte recreativo y educacional por su belleza escénica, regulan ciclos esenciales para la vida como el hidrológico y el del carbono, entre muchos otros más. Una de las más importantes contribuciones de los humedales y los cuerpos de agua es la disminución de la concentración de gases de invernadero debido a que los captan no solo a través de las hojas y raíces, sino también a través de los restos que se encuentran en el substrato (16).

Los vallados están constituidos por una red intercomunicada entre sí, los cuales, además de evitar y disminuir inundaciones en territorios locales y habitados, sirven de abastecimiento de agua para personas aledañas y organismos que pertenezcan a ecosistemas cercanos a humedales, sin embargo, por debido a este servicio, se ha usado indiscriminadamente en el riego de cultivos lo que ocasiona la escorrentía nitrógeno y fósforo que permiten la colonización y proliferación de algas y de macrófitos, lo que conduce rápidamente a la contaminación del cuerpo de agua. En la actualidad, los vallados dentro de la urbanidad hacen parte de un sistema de drenaje de aguas lluvias y residuales de muchos municipios cundiboyacenses, con funciones determinadas en la recolección y distribución del recurso hídrico. Dentro de sus principales funciones se destaca la regulación hídrica en especial en época lluviosa que beneficia no solo a la

biodiversidad que habita en el ecosistema, sino además a los habitantes aledaños a estos cuerpos de agua, al tiempo que estas zonas acuáticas permiten el ciclado de nutrientes en medio líquido al tiempo que funcionan como reservorio de nutrientes para muchas especies (17).

2.1.2 Contaminación de aguas

La contaminación del recurso hídrico en la actualidad es una situación general que afecta de manera global toda la población humana y todas las demás especies que dependen de este recurso. El significado de contaminación se entiende como cualquier cambio que a nivel químico, físico o biológico en la calidad del agua tendrá un efecto perjudicial para los que la consuman. Según la Organización Mundial de la Salud, la contaminación del agua dulce se define en su composición química, puesto que cuando esta haya sido modificada y su uso de estado natural no cumpla lo mínimo para el uso del humano y especies en general (18).

La principal causa son los desechos industriales, con una alta producción de contaminantes que tiene como destino final los cuerpos de agua. Entre estos se destacan el mercurio, el plomo, el amianto y los nitritos y fosfatos. Algunos tipos de contaminación pueden aumentar la concentración de dichas sustancias en los ecosistemas; como la contaminación por nutrientes, contaminación química, contaminación por materia suspendida, contaminación microbiológica y derrame de hidrocarburos (18). En general, son diversas las causas y consecuencias que afectan a los cuerpos de agua, de la cual siempre se deriva la pérdida de este recurso y por ende la función ecosistémica que cumpla en la zona donde se ubique.

2.1.3 Eutrofización

El nitrógeno y el fósforo son elementos muy importantes para el crecimiento y presencia de organismos, sin embargo, la concentración varía entre sistemas acuáticos oligotróficos (μgL^{-1}) hasta varios miligramos por litro en medios eutrofizados. La contaminación orgánica industrial y agrícola constituye un gran fenómeno contaminante

en todas las fuentes hídricas siendo la principal fuente de nitrógeno y fósforo, fuente responsable de los fenómenos de la eutrofización (3).

En un medio acuático natural no eutrofizado se espera que las concentraciones de nitrógeno en forma de Nitratos NO_3^- y no en su forma oxidada NO_2^- . Cuando estas dos formas aumentan en el medio acuático son indicadores de una alta contaminación orgánica. Todas estas formas del nitrógeno provienen entonces de residuos domésticos, industrias y fertilizantes y abonos en la agricultura (19).

El nitrógeno en sus distintas formas en un medio acuático puede presentarse principalmente en forma reducida NH_3 , NH_4^+ y en forma oxidada como NO_2^- y finalmente en NO_3^- que es la forma molecular más común y estable. En los procesos de óxido reducción de estas formas moleculares del nitrógeno están involucrados procesos biológicos por microorganismos que según su uso o desecho producto de su metabolismo. Cuando la forma nitrogenada NH_4^+ o amoníaco libre, que aumenta en un ecosistema acuático debido a la reducción de materia orgánica o inorgánica en el medio por parte de los microorganismos, está presente en grandes concentraciones en el agua, se considera un problema de contaminación; por otro lado, el ion nitrito NO_2^- puede aumentar por la oxidación de NH_3 o también puede generarse como reducción metabólica de los microorganismos presentes. En general, las altas concentraciones de estas moléculas en un ecosistema acuático, puede llegar a indicar y clasificarse como un lugar contaminado por su toxicidad e inestabilidad molecular de las formas nitrogenadas (20).

Un ecosistema eutrofizado puede clasificarse teniendo en cuenta factores fisicoquímicos o biológicos (21), estas variables pueden ser la cantidad de microalgas encontradas en el ecosistema acuático, la temperatura, la concentración de oxígeno, la conductividad eléctrica y las concentraciones de Amonio, nitratos junto con los ortofosfatos y fósforo total (1). A continuación, la Tabla 1 muestra la clasificación según el estado eutrofizado de distintos puntos de ecosistemas acuáticos Andinos teniendo en cuenta la concentración de compuestos nitrogenados.

Tabla 1. Media de valores encontrados en lagos andinos según la concentración de nitrógeno presente.

Estado trófico	Oligomesotrófico	Mesotrófico	Mesotrófico	Eutrófico
NO ₃ ⁻ : nitratos (mg/L)	1,800	1,990	1,930	2,715
NTK: nitrógeno total Kjeldahl (mg/L)	3,870	2,340	2,580	2,50
NH ₃ ⁺ : nitrógeno Amoniacal (mg/L)	0,259	0,312	0,726	1,176
NO ₂ ⁻ : nitritos (mg/L)	0,023	0,030	0,118	0,250

La tabla muestra los valores encontrados en el estudio de distintos lagos de Colombia para con base a las concentraciones de ciertas moléculas, clasificarlos según el estado trófico del ecosistema. Tomado y adaptado (1).

Para la entidad que regula el manejo y el uso del recurso hídrico (EMAR) con el decreto 1594 del 1984, se establecen criterios para el uso del agua y residuos líquidos en donde existen mínimos admisibles para la calidad de este recurso en pro de la conservación de la biodiversidad considerando las concentraciones expresadas en mg/L de amoniaco con un valor no mayor a 1,0 y nitratos que no superen las concentraciones de 10,0 mg/L (22).

2.1.4 Ciclo del nitrógeno y asimilación del NO₂⁻ NO₃⁻ y NH₄⁺

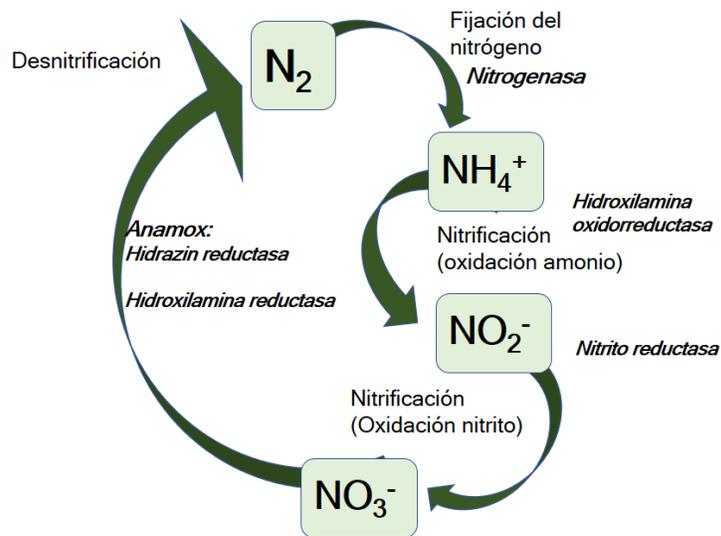
El nitrógeno como molécula y como elemento tiene una importancia vital en las dinámicas acuáticas, pues es el componente fundamental de proteínas y que hacen parte de la base estructural y funcional de los seres vivos. La estructura química del nitrógeno tiene varios estados de valencia y esto lo convierte en una molécula compleja además de que puede estar transformado en sus distintas formas por diversos microorganismos en los ecosistemas (3). Las distintas reacciones de la diversidad de formas del nitrógeno (ver figura 1) que suceden en el ciclo biogeoquímico de dicho elemento, están determinadas por una variedad de microorganismos eucariotas y procariotas, en donde se destacan a las bacterias (23).

El nitrógeno atmosférico es uno de los más abundantes en la atmósfera terrestre, que pueden ser transformados a través de la fijación biológica o industrial, en NH₄⁺ por medio de bacterias fijadoras o cianobacterias presentes en agua o suelo (24). Dentro del proceso de reducción del nitrato pueden estar relacionados tres procesos metabólicos

distintos llevados a cabo por microalgas. Estos procesos de asimilación de Nitrógeno inorgánico son necesarios para los microorganismos en la síntesis de moléculas orgánicas, por lo cual su regulación dentro de la célula para asegurar dicho proceso dependerá a varios factores externos e internos por lo cual puede llegar a ser un proceso complejo (25). El proceso de fijación del nitrógeno por parte de los microorganismos fotosintéticos puede comenzar con la asimilación de NO_3^- que se regula por medio de transporte hacia el interior de la microalga, donde la enzima citoplasmática Nitrato Reductasa (NR) transforma el NO_3^- a NO_2^- para que posteriormente se dirija al cloroplasto y allí la nitrito reductasa (NiR) lo transformará en NH_4^+ y este finalmente se incorporará en aminoácidos por acción de la transferasa (23,25).

Figura 1. Ciclo del nitrógeno, procesos y enzimas involucradas.

Representación del ciclo del nitrógeno y su transformación metabólica



El ciclo del nitrógeno se caracteriza por la presencia de varios microorganismos de distintas clases en donde cada uno de ellos poseen metabolismo específico que aporta a la transformación del nitrógeno en sus distintas formas moleculares. Tomado y modificado de (26).

Los microorganismos eucariotas autótrofos y algunas bacterias que se encuentran en suelos y cuerpos de agua tienen características metabólicamente favorables para que incorporen dentro de su biomasa el nitrógeno o el fósforo según sea el caso. Estas características radican en la presencia de enzimas especializadas y de transportadores que permiten el ingreso de dichas sustancias a la célula, para posterior transformación

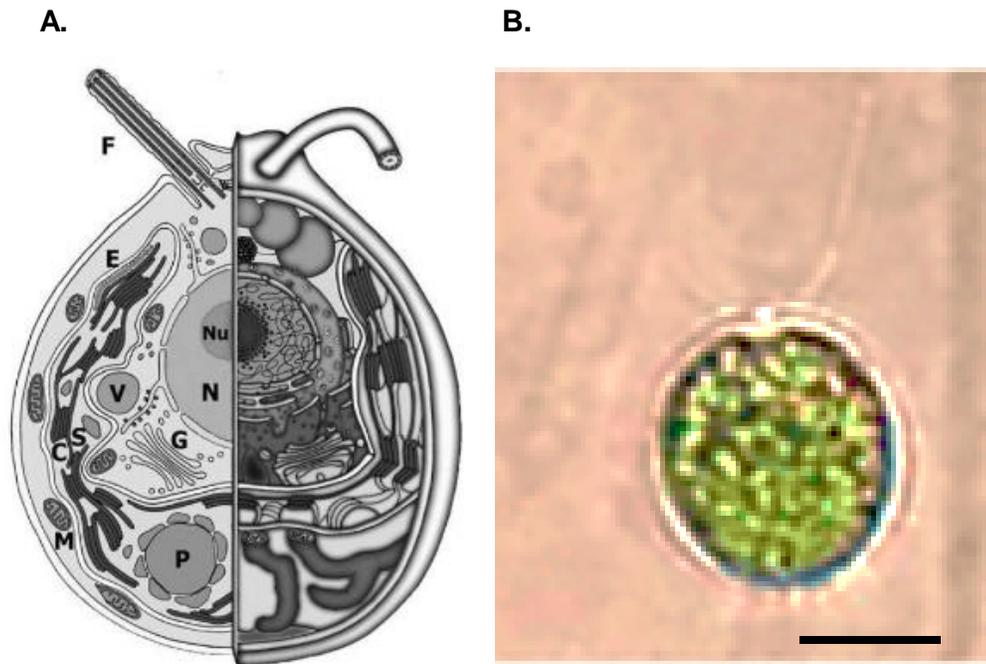
en moléculas orgánicas sintetizadas. En los microorganismos capaces de llevar a cabo el proceso de asimilación se ha observado que puede llegar a verse afectado de forma inhibitoria su metabolismo en la presencia de NH_4^+ . Esto es evidencia que, en presencia de amonio y nitrato al tiempo, solo será consumido el primero para después usar el nitrato, pues el amonio también inhibe la traducción de las reductasas (26).

2.1.5 *Chlamydomonas* sp

Esta alga unicelular es comúnmente encontrada en hábitats con temperatura templada, se caracteriza por tener unos de los géneros más grandes, pero más polifiléticos de microalgas verdes unicelulares de agua dulce (ver tabla 2), es unicelular y tiene una pared celular semi esférica alrededor del citoplasma y poseen un núcleo en el centro. Dentro de su estructura están presentes dos flagelos compuestos por 9 a 2 microtúbulos, también en los flagelos mamíferos, se extienden por un lado y le ayudan al movimiento, adicionalmente tienen una mancha ocular que conduce a canales iónicos que reaccionan a los cambios de luz, lo que permite que la célula siempre se acerque más a la luz (fototaxis positiva). Cerca de los flagelos hay dos vacuolas que se utilizan para mover el agua hacia adentro y hacia afuera de la célula. Los pirenoides están presentes en todas las especies de *Chlamydomonas* (27).

El almacenamiento de almidón aparece en el cloroplasto, cuando las condiciones externas no son favorables. El pirenoide, (ver figura 2) igualmente, tiene altos niveles de la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (RuBisCO) para la fijación constante de CO_2 . Cuando existe estrés por nitrógeno, esta alga tiene la capacidad de acumular lípidos en el citoplasma y el cloroplasto (27). Una de las enzimas principales en la asimilación del nitrógeno, presente en el cloroplasto del alga, la nitrato reductasa, tiene como función catalizar la reducción de NO_3^- a NO_2^- principal metabolismo para integrar el nitrógeno en vías orgánicas como aminoácidos (26).

Figura 2. Morfología y estructura microscópica de *Chlamydomonas* sp.



Fuente: Foto A. tomada Harris (28). Foto B. tomada por la autora, 2022

Foto a la izquierda, principales organelos de la estructura y morfología de *Chlamydomonas* sp. donde se destaca los organelos: F: Flagello. Un-N: Nucleoide y Núcleo. C: cloroplasto. S: gránulos de almidón. V: vacuola. G: aparato de golgi. E: mancha ocular. M: mitocondria. Foto B a la derecha, morfología bajo el microscopio en 40X.

El género *Chlamydomonas* se caracteriza por tener una morfología y distribución de organelos específica, como un cloroplasto en forma de copa, varios o un único pirenoide de forma lateral o unido por puentes al cloroplasto (29). Las microalgas de este género normalmente se encuentran libres nadando en medio líquido, sin embargo, también se pueden encontrar en superficies de suelo sin flagelos (30). Una parte distintiva de este género es la estructura de su pared celular, que varía dentro de las especies según su grosor, la mayoría secreta una sustancia protectora mucilaginosa de polisacáridos y se puede observar bajo el microscopio la presencia de un tipo de mancha ocular usualmente de color naranja o rojo junto con una o dos vacuolas contráctiles que le permiten regular osmóticamente su medio. La mayoría de las especies del género *Chlamydomonas* han sido aisladas de aguas dulces de lagos y ríos, nieve, jardines, suelos de cultivo, desiertos incluso en polvo residuo de erupción volcánica (28).

Tabla 2. Detalle de la clasificación taxonómica de las microalgas *Chlamydomonas* sp.

Taxón	Clasificación
Dominio	Eukaryota
Reino	Plantae
División	Chlorophyta
Clase	Chlorophyceae
Orden:	Chlamydomonadales
Familia:	Chlamydomonadaceae
Género:	<i>Chlamydomonas</i> sp.

La clasificación taxonómica de *Chlamydomonas* sp. se relaciona con su estrecha cercanía evolutiva con las plantas multicelulares en tanto su estructura celular y metabolismo fotosintético (31,32).

2.1.6 Producción a gran escala-microalgas en fotobiorreactor

Para el crecimiento fotosintético de las microalgas a escala es necesario mantener condiciones estándar requeridas por estos microorganismos, como lo son la fuente de CO₂ disuelto o fuentes orgánicas de carbono como Acetato de Sodio y glicerol, nutrientes y minerales en el medio tales como NO₃⁻, NO₂⁻, PO₄³⁻ y micronutrientes como Mg⁺², Ca⁺², Cu⁺², Fe⁺², entre otros: iluminación con un espectro apropiado que oscila entre 400 y 700 nm, y condiciones favorables entre las que están el pH, temperatura y Oxígeno disuelto (33).

En este sentido, los fotobiorreactores (ver figura 2) juegan un papel fundamental en el proceso de crecimiento bajo condiciones controladas. El fotobiorreactor (FBR) está diseñado para convertir la energía solar proporcionada en el sistema para obtener productos y procesos controlados. Los sistemas cerrados disminuyen los riesgos de contaminación que puede provocar un sistema abierto con contacto directo con el exterior, adicionalmente permite un mejor control y posibilidad de monitoreo constante en los factores de crecimiento (33).

Para que un FBR sea eficiente, es necesario considerar la intensidad y distribución de la luz en el sistema, además de la mezcla en el cultivo, junto con el control del pH y la disponibilidad de nutrientes para que el crecimiento y obtención de productos sea efectivo. En el caso del factor luz, en los fotobiorreactores, no está uniformemente

distribuido debido a la absorción y dispersión del cultivo. Se ha documentado que la intensidad de la luz disminuye casi exponencialmente debido a la distancia desde el lado irradiado del FBR (34).

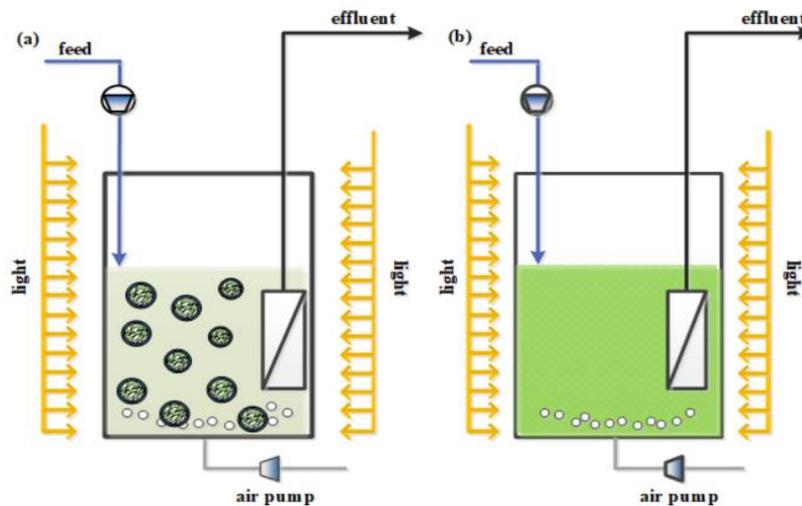
Este fenómeno hace que en FBR existan tres zonas específicas de distribución de la luz y por ende afección en el tipo de metabolismo. Estas zonas son 1) la zona de iluminación intensa, con efecto de inhibición en el crecimiento, 2) zona de iluminación débil, donde se usa mayormente la luz por parte de los microorganismos y que es zona clave en el metabolismo de estos, y la 3) la zona oscura, en la cual la zona de crecimiento celular se vuelve negativa ocasionado por la disponibilidad y límite de la luz (34). De la misma manera, los otros factores indispensables en la obtención celular de microalgas en un FBR, son el pH, la distribución de los nutrientes y la temperatura del medio para que de esta manera se evite la sedimentación de las células. Adicionalmente esta acción dentro del FBR permitirá que las células se distribuyan constantemente lo que hace que la luz tenga la misma incidencia en todo el cultivo. Hay que considerar que una velocidad excesiva en el flujo turbulento podría ocasionar daño celular y por ende llevar el cultivo a un colapso general (33,34).

Debido a que para el crecimiento de microalgas es necesario la fuente de CO₂ en su metabolismo autotrófico, esto podría llegar a ser causal de modificación del pH dentro del medio de cultivo, puesto que las microalgas tienen un rango de pH para su crecimiento óptimo entre 8,2 a 8,7, otras podrían tolerar entre 7 y 9. En este sentido, es indispensable dentro del cultivo en el FBR, mantener el pH en un valor favorable, debido a que la solubilidad del CO₂ en agua es baja: 1650 ppm a 25 ° C en agua pura, lo que plantea que la adición de CO₂ amortigua el cultivo contra la variación del pH como resultado del equilibrio $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CO}_3^{2-}$, por ende, casi todo el carbono está en forma de bicarbonato cuando el pH es igual a 8,3. En ese punto, la concentración de bicarbonato disminuye y se vuelve igual a la de la forma de ion carbonato (CO₃²⁻) cuando el pH alcanza aproximadamente 10,4. La mayor parte del carbono inorgánico está en forma de carbonato cuando el pH es superior a 12, por lo tanto, la disponibilidad de CO₂ se vuelve problemática para el crecimiento de microalgas a niveles altos de pH. En tal escenario, el pH debe controlarse durante el cultivo para

intensificar la absorción de CO₂ por parte de las microalgas, por tal razón, los bicarbonatos de sodio se emplean ampliamente para controlar el pH del cultivo y evitar que suba demasiado rápido (34).

Figura 3. Diagrama de FBR con microcápsulas con microalgas (a) y microalgas libres (b).

Esquema general de un fotobiorreactor



Fotobiorreactores que contienen microalgas inmovilizadas y microalgas libres en condiciones controladas en el laboratorio para realizar pruebas de bioabsorción de contaminantes u obtención de biomasa. Tomado y modificado de (35).

2.1.7 Métodos para la microencapsulación

La inmovilización de las microalgas ha sido una tecnología aplicada a diversas soluciones biotecnológicas enfocadas en la limpieza de contaminantes o estudios ecotoxicológicos, en la gestión de cultivos de reserva de microorganismos. En comparación al cultivo y uso de células libres, la inmovilización puede aumentar o disminuir el rendimiento del cultivo celular. Sin embargo, esta tecnología posibilita la supervivencia celular en el almacenamiento a largo plazo pues provee una protección cuando se cultivan en concentraciones de agua residuales contaminadas (36).

Las técnicas de inmovilización celular pueden dividirse en cuatro tipos de acuerdo al mecanismo físico usado, 1) Fijación o adsorción en superficies sólidas de portadores, 2)

encapsulamiento dentro de una matriz porosa, 3) Autoagregación por floculación natural o inducidos artificialmente y 4) contención celular detrás de barreras. En general, todas estas formas de inmovilización se basan en un material traslucido para poder dejar el paso de luz, de la cual se destaca el alginato, geles de agar, poliuretano o espumas de polivinilo. De manera general los materiales para la inmovilización no tienen ningún efecto tóxico o adverso sobre las células su crecimiento y fisiología. En este sentido, el alginato es la sustancia más común para la inmovilización de microalgas, debido a su rápida preparación y su polimerización en frío. Hay que considerar que las esferas de alginato pueden ser descompuestas si en el medio externo existe fosfato, puesto que para su polimerización se requiere del catión Ca^+ . Pese a esto, el alginato en su concentración más baja no afecta al crecimiento de las microalgas porque la difusión de estas microcápsulas no se limita, lo cual plantea que su metabolismo autotrófico será efectivo (36).

En comparación con las microalgas libres en un tratamiento de aguas residuales, se ha reportado que las microalgas inmovilizadas proveen distintas ventajas, como aumentar el periodo activo del alga sin afectar sus procesos metabólicos por mucho más tiempo; de igual manera, la inmovilización de microalgas permite separar las microalgas del medio que se está trabajando (37). Sin embargo, existen exigencias al momento de trabajar con células inmovilizadas, como el control de pH adecuado en el medio, la densidad de alginato en las perlas, concentración celular dentro del núcleo de la perla para la penetración de la luz, entre otros (38).

2.1.8 Biofiltración

El constante vertimiento de diversos contaminantes hacia los cuerpos de agua, ha generado que se pierda su calidad, debido al exceso descontrolado en el aumento de diversas moléculas que hacen del agua un ecosistema contaminado (39). Sin embargo, con el uso de microorganismos tales como bacterias, microalgas, macroalgas y filtradores suspendidos, se puede llegar a reducir dichos contaminantes a través de la biofiltración, que consiste en seleccionar un microorganismo que por su metabolismo asimile estos contaminantes para transformarlos posteriormente en biomasa o en compuestos menos tóxicos para el ecosistema (40). Usar microorganismos que puedan

remover los contaminantes deseados, plantea una metodología de bajo costo y una ventaja frente a los subproductos que se puedan generar cuando el microorganismo usa las moléculas contaminantes, como el uso de microalgas para remover contaminación por compuestos nitrogenados, puede llegar a generar productos de gran interés para la industria (39). Se ha reportado que la aplicación de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales, removiendo contaminantes, incrementa la calidad después del tratamiento, haciendo este microorganismo útil para la recuperación de ecosistemas por el uso de sus procesos metabólicos, y como resultado poder obtener biodiesel (41). En este sentido, los biofiltros se caracterizan por mantener la actividad biológica del microorganismo usado mientras que la transformación de contaminantes disminuyen, logrando obtener, incluso, agua que puede llegar a ser potable después de haber sido agua contaminada (42).

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

- 1- Diseñar un biofiltro con capacidad de bioabsorción de compuestos nitrogenados utilizando microalgas libres y microencapsuladas provenientes de cuerpos de agua de vallados de Mosquera- Cundinamarca.

3.2 Objetivos específicos

- 1- Determinar la presencia de microalgas presentes en muestras colectadas de cuerpos de agua de vallados.
- 2- Diseñar el biofiltro con las microalgas libres y microencapsuladas aisladas de cuerpos de agua en vallados.
- 3- Determinar la capacidad del biofiltro diseñado con microalgas libres e inmovilizadas para bioabsorción de compuestos nitrogenados.

4. Diseño metodológico

Tipo de investigación: El tipo de investigación de este trabajo es cuantitativo puesto que dentro del desarrollo de un problema específico trata de explicar y deducir un fenómeno por medio de datos numéricos que se obtienen a través de experimentación controlada. La investigación cuantitativa se define por la filosofía del positivismo, en donde se considera que hay una verdad o realidad, esencialmente, algo existe o no existe y su existencia se prueba mediante la recopilación de datos numéricos (cuantitativos) (43). Este tipo de investigación se plantea a través de preguntas que delimitan lo que el investigador desea estudiar desde una posición lógica recopilando datos cuantificables y analizando estos números, por medio de estadísticas, realiza la investigación de manera imparcial y objetiva. El investigador manipula variables y controla fenómenos naturales (44). Esta investigación tiene un alcance de tipo explicativo, puesto que a través de un enfoque cuantitativo se plantea una hipótesis que permita relacionar dos o más variables a través de la obtención de resultados de tipo estadístico, para comprender la razón de dichas relaciones (45).

Este trabajo usa un diseño factorial aleatorizado de clase 2. Los factores considerados fueron microalga: (*Chlamydomonas* sp. según lo aislado en las muestras) y "tipo de cultivo" (libre o inmovilizado). Adicionalmente, para identificar la reducción de los contaminantes nitrogenados se usó el "Control" (solo aguas residuales), "perlas de alginato" (aguas residuales + discos de alginato sin microalgas) y "perlas de alginato con microalgas" (aguas residuales + discos de alginato con microalgas). Cada experimento tiene 5 réplicas. Se determinó el Demanda Química de Oxígeno, nitrógeno- amonio ($\text{NH}_3\text{-N}$) y nitrógeno total usando métodos analíticos estándar (46).

4.1 Fase 1 Caracterización de las microalgas presentes en muestras colectadas de cuerpos de agua de vallados.

4.1.1 Caracterización físico- química de las aguas provenientes de vallados

Para conocer el estado de las muestras provenientes de vallados, se tuvo en cuenta los siguientes parámetros fisicoquímicos: *Demanda biológica de oxígeno* con el sensor VELP Scientifica DBO, en el caso del DQO se usó método fotométrico 10 - 150 mg/L Spectroquant® MERCK en donde el test utilizado determina las sustancias orgánicas e inorgánicas oxidables con dicromato de potasio. Para conocer el pH se usó el potenciómetro marca Hanna, la conductividad con el conductivímetro. Se realizó método de N-Mineral (N-NH₄⁺ y N-NO₃⁺) por destilación - titulación según Kjeldahl, para conocer el nitrógeno total.

4.1.2 Caracterización de las microalgas nativas

Las especies de microalgas provienen de los vallados del barrio Diamante del municipio de Mosquera- Cundinamarca. La toma de muestras se realizó usando frascos de vidrio previamente esterilizados, para posteriormente ser traspasados y etiquetados en tubos Falcon de 50 mL y conservar las muestras sin luz y a temperatura ambiente hasta que fueran usadas en el laboratorio (47), igualmente se midió el pH y la temperatura, y se incluye la georreferenciación del lugar de origen de la muestra.

Para aislamiento e identificación de los cultivos puros de la microalga separados del crecimiento de otros microorganismos presentes en el cuerpo de agua de la muestra, se realizaron diluciones seriadas para luego sembrar en agar en Medio Basal Bold (BBM) por agotamiento, suplementado al 1% con aguas residuales de donde inicialmente se tomó la muestra. Las diluciones se mantuvieron bajo condiciones pH 6,8, Temperatura 20°C, fotoperiodo 20 horas luz y 4 horas oscuridad, irradiancia de 75 Luxes agitación continua, aire filtrado, iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips). Se realizaron las diluciones necesarias para obtener las cepas puras unialgal (48).

Tabla 3. Componentes Medio Basal de Bold (BBM)

Macronutrientes	Concentración
NaNO₃	10 g/400 mL
MgSO₄ · 7H₂O	3 g/400 mL
K₂HPO₄	3 g/400 mL
KH₂PO₄	7 g/400 mL
CaCl₂ · 2H₂O	1 g/400 mL
NaCl	1 g/400 mL
EDTA	50 g/l
KOH	31 g/l
FeSO₄ · 7H₂O	4.98 g/l
Agua acidificada con 1 ml H₂SO₄	
H₃BO₃	11.42 g/l
ZnSO₄ · 7H₂O	8.82 g/l
MnCl₂ · 4H₂O	1.44 g/l
MoO₃	0.71 g/l
CuSO₄ · 5H₂O	1.57 g/l
Co(NO₃)₂	0.49 g/l

Macro y micronutrientes para el crecimiento de las microalgas en medio de cultivo. y cultivo de las microalgas.

La caracterización microscópica inicial y después del aislamiento, se contrasta con *Freshwater Algae: Identification, enumeration and use as bioindicators: Second edition* (31) para identificar los microorganismos que son usados en el biofiltro y en la caracterización general de la muestra de agua.

- **Identificación molecular**

Para la identificación molecular, las muestras fueron enviadas al instituto de secuenciación genómica de la Universidad de Antioquia y mediante PCR se obtuvieron fragmentos que se llevaron a reacción de secuenciamiento capilar en ambas cadenas. Se usó la región intergénica ribosomal ITS (oligonucleótidos) *LR1850*: 5' CCTCACGGTACTTGTTTC 3' y *Ns7mf*: 5' GGCAATAACAGGTCTGT 3', los cuales amplifican un fragmento aproximado de 1248 pares de bases (pb). Para el caso del

marcador 18s se usaron los NS1_18S forward 5' GTAGTCATATGCTTGTCTC3' y NS6_18S reverse: 5'GCAATCACAGACCTGTTATTGCCTC3', los cuales amplifican un fragmento aproximado de 1248 pb. Las secuencias obtenidas se compararon en la base de datos Genbank.

4.1.3 Producción de biomasa de la microalga nativa en el biorreactor Biostat A plus

- **Preparación del inóculo**

Para preparar el inóculo se tomará una muestra de la solución stock de la cepa de referencia aislada e identificada molecularmente y se transferirá asépticamente a un Erlenmeyer de 500 mL que contiene 200 mL de medio BBM fresco y estéril bajo continua iluminación, aire filtrado, agitación continua a 20°C por 4 días. Para todos los experimentos un cultivo de 4 días es usado como el inóculo (en la fase exponencial de crecimiento). Para establecer la cantidad de inóculo a utilizar se debe hacer un conteo celular y con esta información proceder a realizar los cálculos necesarios para saber el volumen a adicionar del inóculo al biorreactor Biostat A Plus de 5 litros.

- **Sistemas de cultivo**

Para el crecimiento de las microalgas se usó el Biorreactor Biostat A Plus de 5 litros. Se utilizaron 2 L de Medio Basal Bold (BBM). Se utilizó un inóculo de la microalga aislada 200 mL de las microalgas con una concentración de 4×10^6 células/ mL aisladas. Se determinó la concentración celular mediante la cámara de Neubauer para diferenciar la fase lag de la fase de crecimiento exponencial (49) . El biorreactor se mantuvo bajo una agitación de 100 rpm, una irradiancia de 75 Luxes con lámparas fluorescentes blancas (T1t 20w/54RS marca Philips), fotoperiodo de 20 horas luz/4horas oscuridad, pH 6,8, temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ y aire filtrado 1,7 L/min, por 26 días.

4.1.4 Generación de las curvas de crecimiento

Se construyeron curvas de crecimiento a partir de la toma de al menos tres muestras cada 6 días para la determinación del número de células por microscopia usando cámara de Neubauer, microscopio Olympus CH30 y App Hematocymeter.

4.1.5 Determinación de los parámetros cinéticos de crecimiento

Mediante el ajuste de modelos adecuados y por el método de regresión y estimación curvilínea con el software estadístico IBM SPSS statistics 29.0.0.0, se determinó los parámetros cinéticos de crecimiento del alga aislada previamente.

4.1.6 Determinación de los cambios morfológicos celulares

El cambio de morfología durante las diferentes fases de crecimiento de la microalga se documentó por microfotografía por medio del microscopio Olympus CH30.

4.1.7 Determinación de clorofila

Se realizó el procedimiento según APHA (46) para medir la clorofila presente por método espectrofotométrico, en donde se centrifugó 1 mL de muestra con microalgas a 9,000 rpm, se obtuvo el precipitado (pellet) y se agregó mL de metanol al 90%. La muestra con metanol se dejó calentar 10 min en baño serológico a una temperatura de 60°C, para después ser centrifugado de nuevo a las mismas revoluciones iniciales. Para la generación de la curva de calibración en el espectrofotómetro (expresada en $\mu\text{g}/\text{mL}$) se usó patrones establecidos de referencia para la clorofila a una longitud de onda de 667nm en el equipo Thermo Scientific genesys 10S UV-Vis. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

4.2 Fase 2. Diseño del biofiltro con las microalgas libres y microencapsuladas aisladas de cuerpos de agua en vallados.

4.2.1 Microencapsulación de microalgas

Con biomasa obtenida del crecimiento masivo (48), utilizando el Biorreactor Biosat A Plus de 5 Litros bajo las condiciones previamente descritas, se suspendieron las células lavadas en 15 mL de la misma solución estéril de NaCl y se añadió a 60 mL de alginato de sodio previamente esterilizado. Los microorganismos y la solución de alginato se mezclaron a los distintos rpm (100- 150 -200) hasta obtener homogeneidad (49). Luego de obtener la mezcla, esta se dejó pasar por un tubo de 4 mm de diámetro, dejando caer las alícuotas a una mezcla de Cloruro de Calcio. Las microcápsulas se dejaron en caja de Petri estériles para su gelificación durante dos horas, y finalmente se lavaron con agua estéril para eliminar cualquier residuo de las esferas obtenidas (48). Estas dos sustancias permiten mantener un núcleo estable protegido del medio externo sin necesidad de modificar las características metabólicas de los microorganismos encapsulados, junto con el cloruro de calcio le provee estabilidad al alginato y rigidez para mantener las esferas (50).

4.2.2 Preparación del macrocápsulas

Para determinar la concentración ideal de alginato de sodio y la concentración de cloruro de calcio junto con la agitación en rpm, se realizó un diseño factorial con tres factores y tres niveles (Tabla 4). Las variables fueron el diámetro promedio de las macrocápsulas, la frecuencia de tamaño y el rendimiento de cada proceso. Se realizaron 27 tratamientos, cada uno de los cuales se elaboró por triplicado.

Tabla 4. Factores y niveles de las concentraciones de la microencapsulación

Factores	Niveles		
	-1	0	1
Concentración de alginato de sodio (%)	0,8	1	1,5
Concentración de Cloruro de calcio (%)	2	3	4
Velocidad de agitación (rpm)	100	150	200

La influencia de cada uno de los factores se estableció con el software SAS Statgraphics 8.1, donde a través de un análisis de superficies de respuesta y diagramas de Pareto, se generó un modelo matemático de predicción para determinar las condiciones óptimas de agitación en rpm, concentración de alginato de sodio y cloruro de calcio para continuar con la microencapsulación de la microalga.

4.2.3 Caracterización de las macrocápsulas

- **Tamaño y morfología**

La forma, el tamaño y la frecuencia de tamaño de las macrocápsulas se estudiaron por observación en un microscopio de luz marca NIKON ECLIPSE 300. El diámetro de 150 macrocápsulas en tres muestras de cada tratamiento se determinó con una plantilla de medición milimétrica.

- **Rendimiento**

Para estimar el rendimiento del proceso, se pesó el material recuperado en cada lote (réplica) de cada tratamiento y con este resultado y los pesos de los materiales utilizados se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{W_{\text{producto}} \times 100}{(W_{\text{polímero}} + W_{\text{núcleo}})}$$

Donde:

W_{producto} es el peso de las microcápsulas obtenidas en un lote de producción

$W_{\text{polímero}}$ es el peso del polímero utilizado en un lote de producción

$W_{\text{núcleo}}$ es el peso del núcleo / microalgas) utilizado en un lote de producción.

4.2.4 Diseño del biofiltro

El diseño del biofiltro para la bioabsorción de N total, se realizó con la microalga microencapsuladas y con células libres de la microalga. Se prepararon macrocápsulas bajo las condiciones óptimas previamente definidas utilizando alginato de sodio con una concentración de 1,2 %, cloruro de calcio con una concentración de 2,5 % y una agitación de 140 rpm. 300 macrocápsulas se organizaron y distribuyeron en una malla plástica, formando el biofiltro.

4.3 Fase 3. Determinación de la capacidad del biofiltro diseñado con microalgas libres e inmovilizadas para bioabsorción de compuestos nitrogenados

Para conocer el efecto de las microalgas inmovilizadas y libres en la remoción de N total, se realizaron los siguientes tratamientos y controles sellados para garantizar esterilidad (51):

A: Biorreactor con 500 mL de agua de vallado previamente esterilizada y filtrada con 300 macrocápsulas de alginato con la microalga *Chlamydomonas* sp inmovilizada.

B: Biorreactor con 500 mL de agua de vallado previamente esterilizadas y filtrada con 30% de células libres de *Chlamydomonas* sp en una concentración de $8,442 \times 10^6$ células/ mL.

Para comparar el efecto de la inmovilización en alginato y microalgas libres en la remoción de compuestos nitrogenados en agua de vallado de diseñaron los siguientes controles:

C: Biorreactor con 500 mL de agua de vallado previamente esterilizadas y filtrada con 300 macrocápsulas de alginato sin microalga inmovilizada.

D: Biorreactor con 500 mL de agua de vallado previamente esterilizadas y filtrada. Cada tratamiento se realizó por triplicado en forma aleatoria bajo las siguientes condiciones: pH 6,8, ciclo luz/oscuridad 20h:4h, temperatura 20 °C, agitación continua de 100 rpm, iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips), irradiancia 75 luxes. Se tomó muestra después de 18 días (52) de los distintos tratamientos y se realizó el análisis fisicoquímico total.

4.3.1 Porcentaje de bioabsorción de N-NH₄⁺ y N-NO₃⁺

Para determinar el N total después de cada tratamiento se realizó el método de N-Mineral (N-NH₄⁺ y N-NO₃⁺) por destilación - titulación según Kjeldahl (46), igual que el usado para caracterizar inicialmente el N total del vallado. Para conocer el porcentaje de bioabsorción de cada uno de los tratamientos se utilizó la siguiente fórmula:

$$R\% = \left(\frac{C_o - C_f}{C_o} \right) * 100$$

En donde C_o es la concentración inicial de los compuestos nitrogenados y la C_f la concentración final después de los tratamientos.

4.3.2 Diseño experimental y análisis estadístico

Cada experimento se repitió tres veces con al menos tres replicas. Todas las observaciones y cálculos se hicieron separadamente para cada set de experimentos y se expresarán en promedio de 6SD. La significancia ($P < 0.05$) de las variables estudiadas se midió por un análisis de varianza (ANOVA) y test de Tukey con el software estadístico IBM SPSS statistics 29.0.0.0.

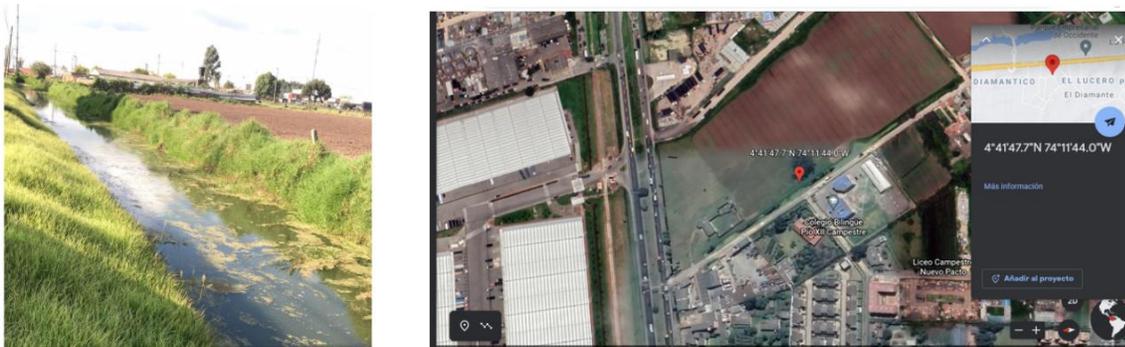
5. Resultados y análisis

5.1 Caracterización fisicoquímica de las muestras del vallado

Las muestras colectadas se tomaron del vallado ubicado en las coordenadas 4°41'47.7"N 74°11'44.0"W con dirección carrera 2 este # 5- 03 en Mosquera, Cundinamarca.

Figura 4. Fotos del lugar de muestreo. A la izquierda ubicación exacta y coordenadas del lugar del muestreo.

Ubicación y lugar exacto de la colecta de las muestras



Área seleccionada para la toma de muestras de vallados rodeados de cultivos de tubérculos y vías de alto impacto vehicular. Fuente: tomada por la autora, 2022

Las características fisicoquímicas encontradas del vallado encontradas fueron un pH de 7, de igual manera la conductividad fue de 0.34 dS/m. La temperatura tomada *in situ* tuvo un valor promedio de 20,66 °C con una desviación de +/- 0,11 y un coeficiente de variación de 0,055. Para el contenido de nitrógeno obtenido se tiene un 2,5 mg/l de NH_4^+ Amonio y una concentración de NO_3^- de 2,2 mg/l Ver Tabla 5 y anexo

Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos de muestras de vallados

Resultados del estudio fisicoquímico de la muestra de vallado.

DQO mg/l	Absorbancia (600 nm)
70	0
384	3,843
215	2,43
Muestra Vallado	0,514

Parámetro	pH	Conductividad dS/m	N-NH ₄ ⁺ Amonio (mg/L)	NO ₃ ⁻ Nitrato (mg/L)	DQO (mg/LO ₂)
Muestra	7,00	0,34	2,5	2,2	93,27
Decreto 1594 de 1994 y la resolución 631 de 2015 (22)	6,00 a 9,00		0,04	9,5	1

Fuente: elaboración autores, 2022

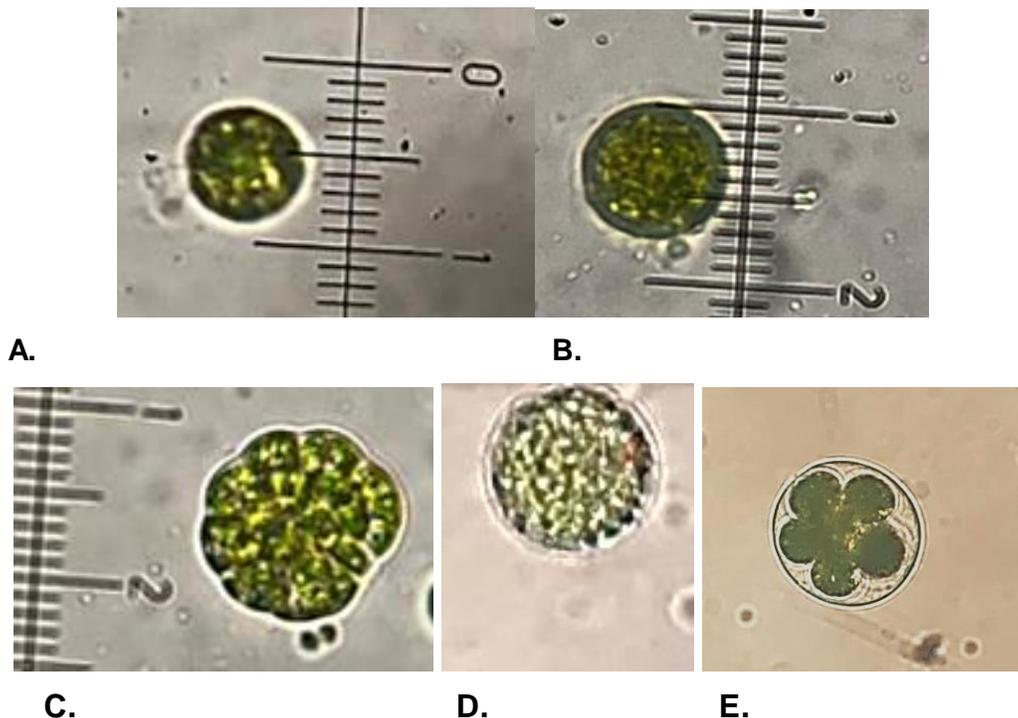
De acuerdo a los valores obtenidos en los análisis fisicoquímicos de la muestra de vallado, se encuentra que de acuerdo a los valores de NH₄⁺ establecidos por el decreto 1594 (22) superan los límites establecidos dentro del uso del recurso hídrico para la biodiversidad, sin embargo, las concentraciones de NO₃⁻ se encuentran dentro de los parámetros. Las concentraciones de NH₄⁺ se relacionan con una alta descomposición por parte de los microorganismos, de materia orgánica, o por altas concentraciones de proteína y materia en descomposición (53). Según las concentraciones de NO₃⁻ y NH₄⁺ de la muestra, el grado de eutrofización del vallado se encuentra en nivel 6 (eutrófico) comparado con el estudio de clasificación de embalses, donde el lago en este mismo estado está afectado por vertimientos constantes domésticos y desechos agroindustriales que lo hacen tener una mala calidad de agua (1). Esto se compara con el estado del vallado de estudio, en donde sus alrededores, se caracterizan por las mismas actividades antrópicas que generan que el cuerpo de agua emane olores desagradables, aumento de microorganismos descomponedores y aumento de macrófitas en el lugar (54).

5.2 Caracterización y crecimiento de la cepa aislada del vallado

El aislamiento y crecimiento realizado permitió obtener la cepa unialgal de *Chlamydomonas* sp., utilizando las condiciones medio de cultivo BBM, agar para microalgas pH 6,8, temperatura $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips), irradiancia 75 luxes por 15 días y fotoperiodo 20h luz/ 4h oscuridad. Se observaron los estadios del ciclo de vida característicos de esta microalga Ver figura 5. presentando distintos estados que dependen de reproducción sexual o reproducción asexual, o estado diploide o haploide. Su forma más común dentro de los cultivos se observa con doble flagelo (zoosporas) entre tamaños que van desde $6,5\ \mu\text{m}$, y $10\ \mu\text{m}$ (31,32).

Figura 5. Fotografía ciclo de vida de *Chlamydomonas* sp en aumento 100X

Microfotografías de *Chlamydomonas* sp aislada del vallado



A y B *Chlamydomonas* sp estado cigoto $2n$ con un tamaño de $6,5\ \mu\text{m}$. D. *Chlamydomonas* sp Zoosporas con flagelo. E. Zoosporas en envoltura.

Con la microalga aislada se realizó un inóculo inicial (ver figura 6) utilizando medio de cultivo líquido BBM, pH 6.8, con agitación 100 rpm, iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips), irradiancia 75 Luxes, pH 6.8, temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ y fotoperiodo 20 h. Luz: 4 h. oscuridad, presentando un crecimiento de $2,53 \times 10^7$ células/ mL.

Figura 6. Inóculo con *Chlamydomonas* sp.

Medio de cultivo líquido para crecimiento en el laboratorio del alga aislada



Fuente: tomada por la autora, 2022

El inóculo preparado se usó para realizar las pruebas de microencapsulación con las distintas pruebas y la generación de biomasa para el biofiltro.

5.2.1 Identificación molecular

A partir de este inóculo se realizaron pruebas de identificación molecular del alga con ITS y 18s. Dentro de la identificación molecular con el marcador ITS se obtiene una secuencia de 1248 pares (ver anexo 2)

De acuerdo a la identificación molecular y las observaciones realizadas en el microscopio, se evidencia que según su clasificación taxonómica de acuerdo al análisis filogenético basado en los marcadores NS1 y NS6 del 18S, el alga aislada (ALGVIV 18s) de los vallados de Mosquera – Cundinamarca pertenece al género *Chlamydomonas* sp,

para la cual de acuerdo al árbol filogenético, se tiene un máximo de emparejamiento con este género (ver figura 7y 8).

Figura 7. Resultados emparejamiento en BLAST. A. Secuencias relacionadas con el marcador ITS. B. Secuencias relacionadas con el marcador 18S.

a.

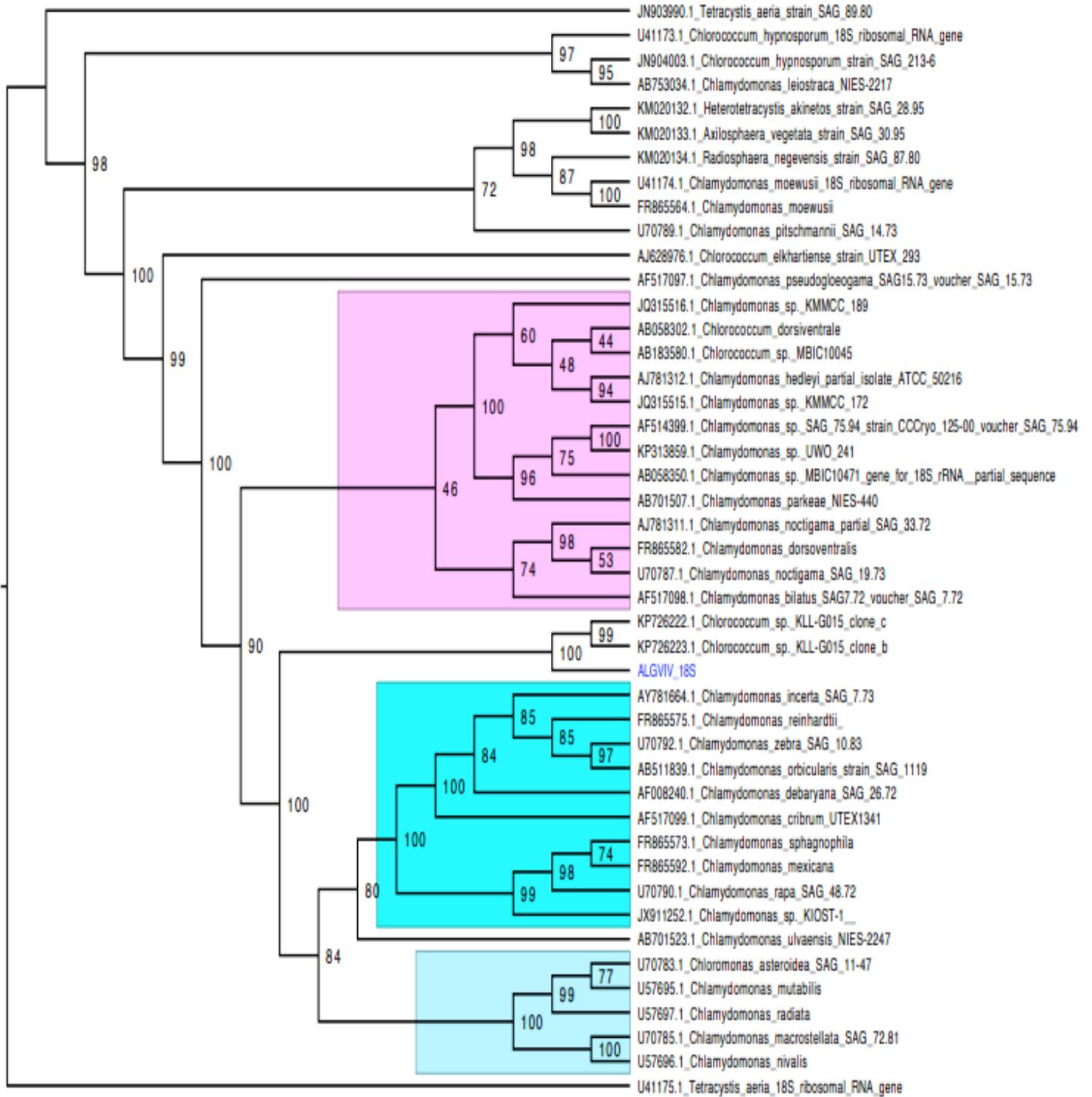
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Chlorococcum sp. KLL-G015 clone c 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1...	Chlorococcum s...	1677	1677	81%	0.0	96.59%	2466	KP726222.1
Chlorococcum sp. KLL-G015 clone b 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer...	Chlorococcum s...	1666	1666	81%	0.0	96.39%	2466	KP726223.1
Chlorococcum sp. KLL-G015 genomic DNA sequence contains 5.8S rRNA gene, ITS2, strain Chlorococcum s...	Chlorococcum s...	1142	1142	52%	0.0	98.32%	653	LR215796.1
Chlamydomonas debaryana genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRN...	Edaphochlamys ...	1112	1112	84%	0.0	86.28%	2519	FR865523.1
Chlorococcum arenosum strain UTEX 1767 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal R...	Chlorococcum a...	1031	1031	52%	0.0	95.31%	660	KX147352.1
Chlamydomonad sp. Tow9/21T-2d 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Chlamydomona...	881	881	40%	0.0	98.41%	2385	AY220569.1
Balticola buetschlii isolate CCAP 34/11 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Balticola buetschlii	830	830	81%	0.0	82.38%	2478	MG022688.1
Hyalogonium fusiforme strain SAG 62-1c small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcr...	Hyalogonium fus...	774	774	78%	0.0	81.92%	2395	OM985704.1

b.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Chlamydomonad sp. WTwin 8/18 P-1d 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Chlamydomonad...	2881	2881	100%	0.0	100.00%	1791	AY220094.1
Chlorococcum sp. KLL-G015 clone c 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1,...	Chlorococcum s...	2870	2870	100%	0.0	99.87%	2466	KP726222.1
Chlorococcum sp. Elm MV-2021 isolate MVRNA93 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Chlorococcum s...	2870	2870	99%	0.0	99.94%	1721	MW723501.1
Chlorococcum sp. YF282 gene for 18S rRNA, partial sequence	Chlorococcum s...	2868	2868	100%	0.0	99.87%	1779	AB490287.1
Oophila amblystomatis isolate Kingston 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Oophila amblyst...	2867	2867	99%	0.0	100.00%	1689	KY091671.1
Chlorococcum sp. YF382 gene for 18S rRNA, partial sequence	Chlorococcum s...	2867	2867	100%	0.0	99.81%	1738	AB490288.1
Oophila amblystomatis isolate Suddent Tract 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Oophila amblyst...	2859	2859	99%	0.0	99.74%	1699	KY091670.1

Las secuencias con los códigos de acceso KP726222.1 y KP726223.1 nombradas como “*Chlorococcum* sp. KLL-6015” puedan estar clasificadas a nivel de género erróneamente debido a los registros encontrados en el Genbank. No hay una metodología concreta para determinar que sea *Chlorococcum* sp específicamente. Se puede concluir que la microalga aislada, con un emparejamiento de 85%, corresponde a *Chlamydomonas incerta*, de acuerdo al BLAST realizado (ver imagen 7 y 8). Es importante resaltar que *Chlamydomonas* es un grupo altamente polifilético, para lo cual, fue necesario basar las análisis filogenéticos y de Maximum likelihood con el marcador 18S (55).

Figura 8. Análisis filogenético (Maximum likelihood) basado en el marcador molecular 18S



Fuente: autora, 2023

De acuerdo a la bibliografía, esta alga aislada del vallado *Chlamydomonas* sp es capaz de asimilar varias fuentes de nitrógeno inorgánico para su crecimiento, encontrándose que una combinación de NO_3^- y NH_4^+ es la fuente de nitrógeno más adecuada para su reproducción lo que conlleva a una mayor productividad de biomasa debido a que sus tasas de crecimiento altas (30), toleran grandes concentraciones de nitrógeno con capacidad de asimilarlo a través de la síntesis del glutamato, que es el producto primario de la asimilación del nitrato, que luego servirá de ruta metabólica para la síntesis de otros compuestos necesarios dentro de la célula fotosintética (56,57).

Este metabolismo de los compuestos nitrogenados incluye la movilización de NO_3^- hacia el citoplasma, en donde la acción de la enzima nitrato reductasa reduce el nitrato a NO_2^- para que esta forma molecular se movilice hacia el cloroplasto de la microalga, en este caso *Chlamydomonas* sp usa la nitrito reductasa encontrada en el organelo fotosintético que transformará el nitrito en NH_4^+ , para así posteriormente ser parte de las moléculas orgánicas lo que conlleva mayor energía, mayor síntesis y por ende mayor crecimiento de la población (57).

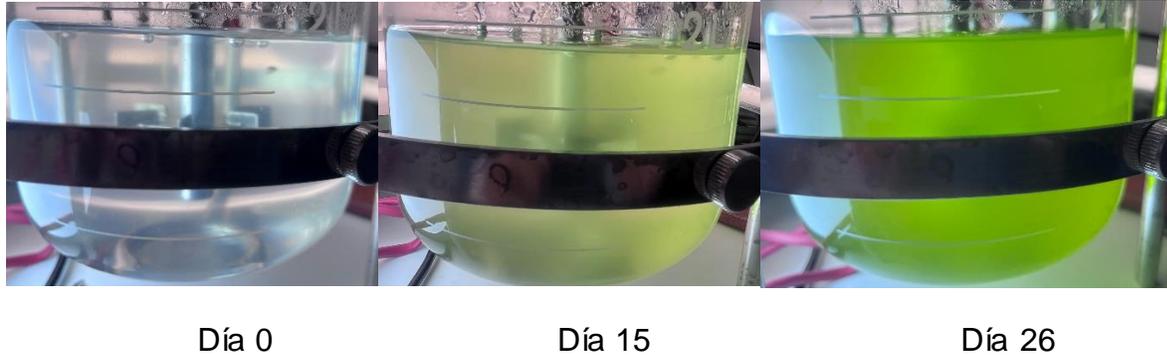
La *Chlamydomonas* sp. se ha utilizado como cepa nativa en forma libre e inmovilizada para remover nitratos y fosfatos de aguas residuales municipales provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) encontrándose que en forma libre reportó el máximo porcentaje de bioabsorción de NO_3^- (75.08 %) (48). Se ha reportado que la *Chlamydomonas reinhardtii* remueve en un 70% NH_4^+ de lixiviados de vertederos a un pH 7,0 en 40 días (58–60).

5.2.2 Producción de biomasa del alga nativa en el biorreactor Biosat A Plus

El cultivo de la microalga *Chlamydomonas* sp. en el biorreactor Biostat A Plus de 5 L, se observa en la figura 8 utilizado el medio BBM durante 26 días de cultivo, bajo las condiciones de pH 6,8, temperatura $20 \pm 2^\circ\text{C}$, agitación 100 rpm, aire filtrado, velocidad 1,7 L/min, lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips), fotoperiodo de 20 horas luz/4horas oscuridad llegando a una concentración celular de 8×10^6 células/mL.

Figura 9. Crecimiento a gran escala de *Chlamydomonas sp.* en medio BBM en el biorreactor Biostat A Plus de 5 L

Obtención de biomasa algal por medio del fotobiorreactor, de izquierda a derecha, primer día de inóculo hasta el día 26 de crecimiento.



Fuente: tomada por la autora, 2022

Con los datos de crecimiento de la microalga por medio del análisis en el software SPSS de regresión y estimación curvilínea, se obtiene que el crecimiento del alga, la cual se ajusta al modelo logarítmico con un R^2 de 0,962, (ver tabla 6 y anexo 3) tiene un intervalo de tiempo de 26 días. Como se muestra en la figura 10, la tasa de crecimiento de *Chlamydomonas sp* y la biomasa incrementó en la fase exponencial entre los días 5 y 12 con un tiempo de duplicación de 3,92 días y una tasa de crecimiento específica máxima de (μ_{max}) de 0,077, esto se relaciona con los resultados obtenidos (57) en donde la productividad de la biomasa y la tasa de crecimiento aumentó entre los días 4 a 12.

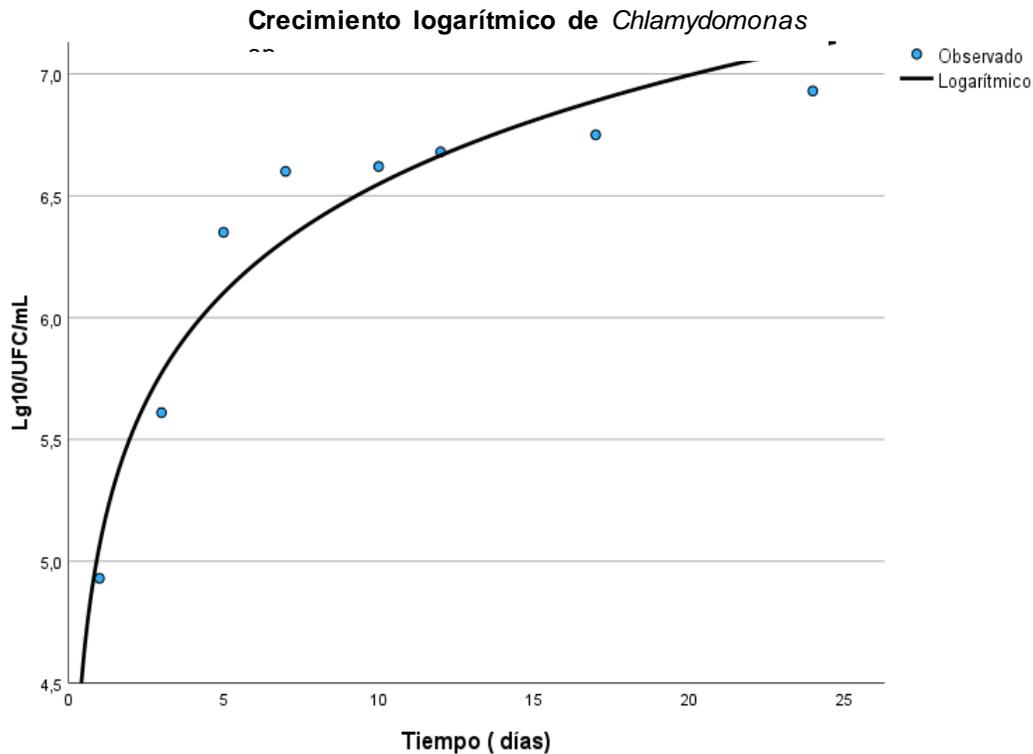
Tabla 6. Matriz de coeficientes del modelo logarítmico₁₀ ajustado para el medio de cultivo BBM

Medio de cultivo	Nº Datos	Dato Mínimo	Dato Máximo	Velocidad de crecimiento	Coefficiente de determinación
BBM	9	4	7,878	0,077	96,2%

ANOVA (95%) detectó diferencias significativas entre tratamientos (F=75;p<0,001;gl1)

Figura 10. Gráfica crecimiento logarítmico de *Chlamydomonas* sp.

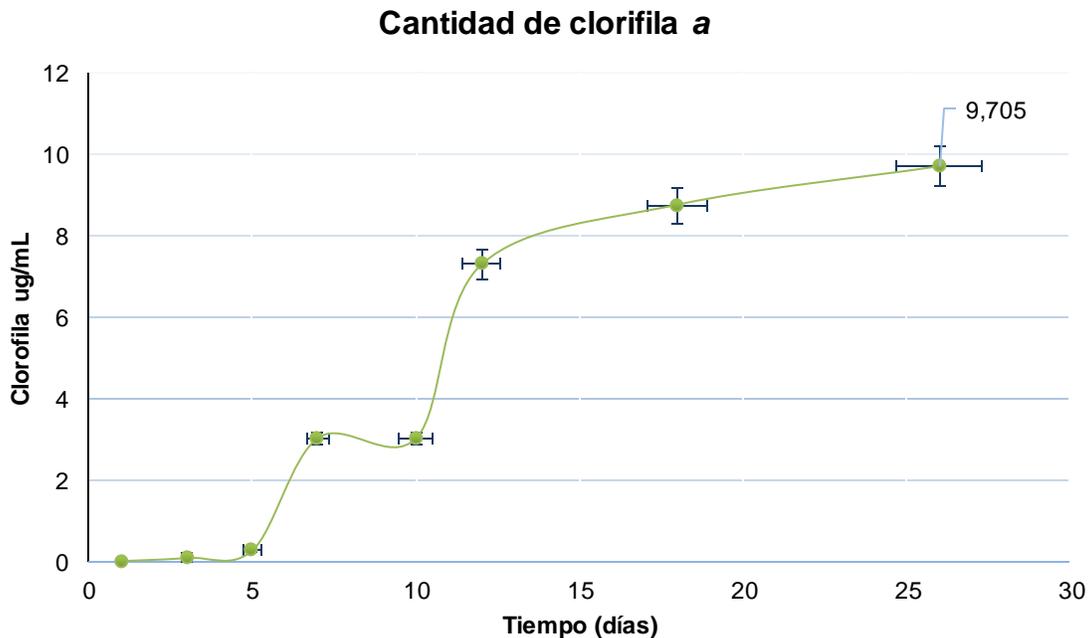
Valores registrados en 26 días dentro del biorreactor



Fuente: elaboración autora, 2022

El crecimiento logarítmico de *Chlamydomonas* sp. (ver figura 9) se relaciona con lo obtenido en la cantidad de clorofila *a* registrada durante el crecimiento celular. Debido a que la tasa de crecimiento de los organismos fotosintéticos incrementa de acuerdo a la intensidad lumínica presente en el fotobiorreactor, la capacidad de usar dicha fuente lumínica del alga es clave para la generación de energía, compuestos y duplicación celular evidenciando en la cantidad de clorofila (ver anexo 4) presente en cada una de las muestras tomadas, donde se obtuvo un incremento de 3,03 ug/ mL a una cantidad de 7,30 ug/ mL al día 12 y 8,76 ug/ mL al día 18 como se muestra en la figura 11 (61). En este modelo logarítmico se encuentra que la cantidad de células desde la fase exponencial inicial y la fase de saturación celular está presente su duplicación celular (62).

Figura 11. Concentración de clorofila en el crecimiento de *Chlamydomonas* sp.



Fuente: elaboración autora, 2022

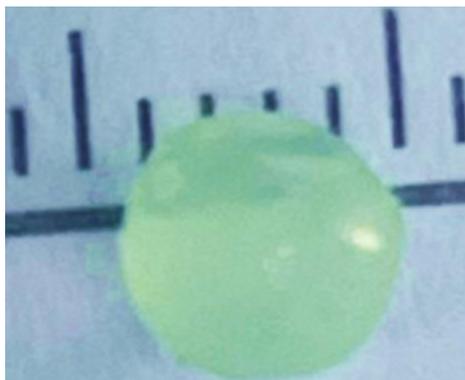
5.3 Diseño del biofiltro

5.3.1 Microencapsulación

La selección de las condiciones óptimas para el proceso de microencapsulación con alginato de sodio se realizó utilizando el diseño factorial multinivel que se caracteriza por combinar distintos factores y distintos niveles, de la cual fue previamente descrito en la metodología, determinando el tamaño, rendimiento y frecuencia, según las concentraciones de alginato de sodio, cloruro de calcio y agitación en rpm. Los resultados de las variables de respuesta durante el proceso de microencapsulación se encuentran en el anexo 5.

En todos los tratamientos se obtuvo la formación de partículas de tamaño y forma variable, con diámetros que oscilaron entre 4 y 6 mm (ver figura 12 y anexo 6).

Figura 12. Esferas de alginato con microalga aislada, medición de diámetro



Fuente: tomada por la autora, 2022

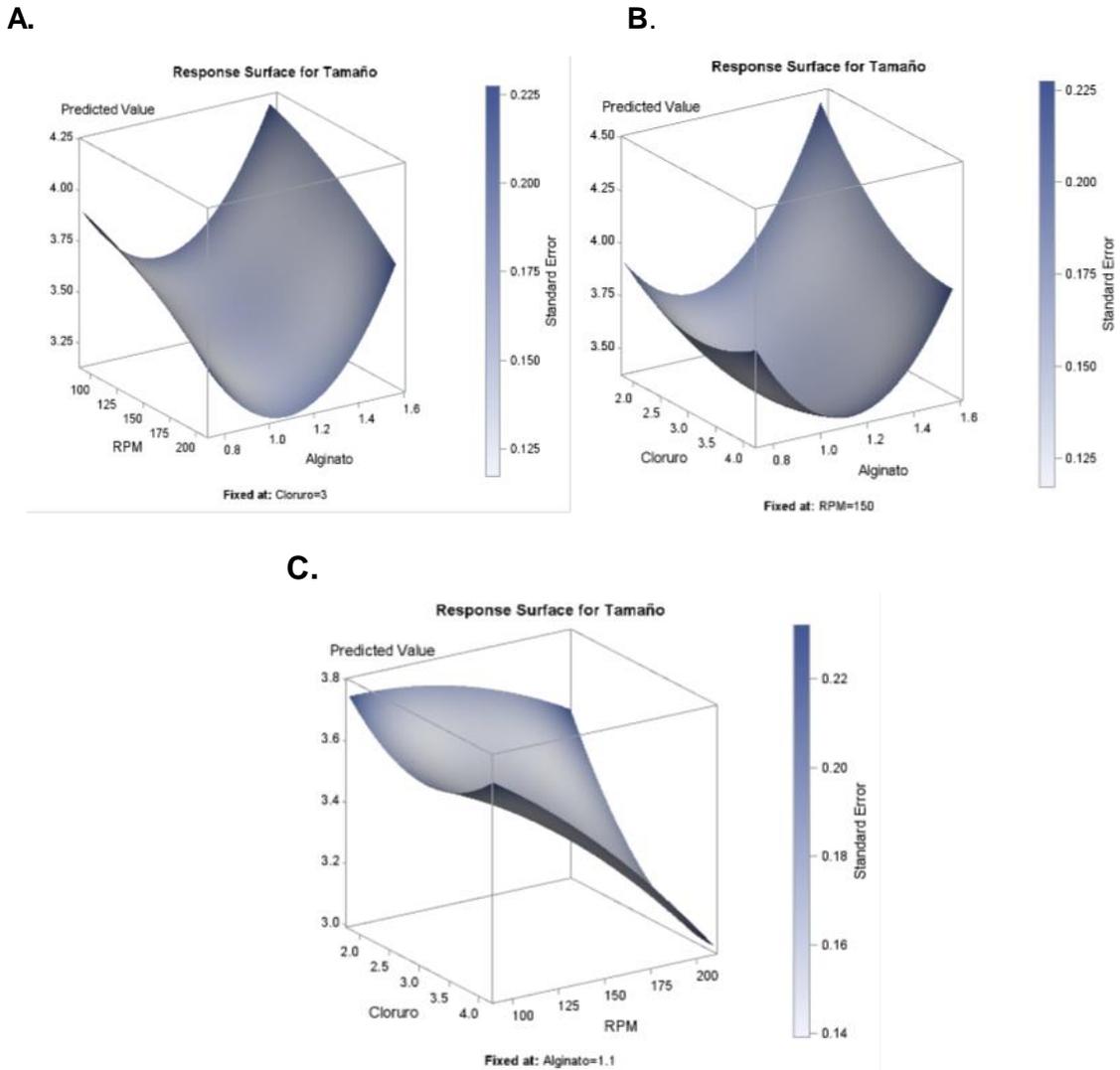
- **Tamaño y morfología de las macrocápsulas.**

En la superficie de respuesta obtenida para la variable tamaño partícula (diámetro) como función de la concentración de alginato de sodio y agitación 150 rpm (Figura 8A), se observa que se maximiza la respuesta cuando la concentración de alginato de sodio aumenta y la agitación tiende a 100 rpm.

En la superficie de respuesta obtenida para la variable tamaño partícula como función de la concentración de cloruro de calcio y la concentración de alginato de sodio (Figura 13B), se observa que la concentración de alginato de sodio que está entre 0 y 1,6 % tiene mucha más influencia en la función de diámetro que la concentración de cloruro de calcio que está en el rango 2.0 a 4.0 %, lo cual sugiere que la concentración de alginato de sodio influye de forma marcada sobre el tamaño de partícula. Esto concuerda con lo reportado por Soo y colaboradores (63) en donde el tamaño y diámetro de las esferas cambia y se afecta cuando se aumenta la concentración del polímero, en este caso alginato de sodio, a mayor concentración de alginato, mayor diámetro y pérdida de estabilidad de la esfera.

En la superficie de respuesta generada para la variable tamaño partícula como función de la concentración de cloruro de calcio y la agitación en rpm (Figura 13C), se puede observar que se tiene un tamaño adecuado 3,6mm cuando la agitación esta entre 120 y 150 rpm y una concentración de cloruro de calcio entre 2,5 y 3,0%.

Figura 13. A B y C Superficie de respuesta de la variable de tamaño en función de concentración de alginato de sodio, cloruro de calcio y agitación en rpm, para la elaboración de macrocápsulas.



Fuente: autora, 2022

Análisis de superficie de respuesta teniendo en cuenta el rendimiento fijado por el programa Statgraphics 8.1 con valores de concentración de cloruro de 3%, RPM de 150 y concentración de alginato de 1,1%.

- **Rendimiento**

El rendimiento en general para los veintisiete tratamientos osciló entre 74,93 % y 127,94% (ver anexo 7)

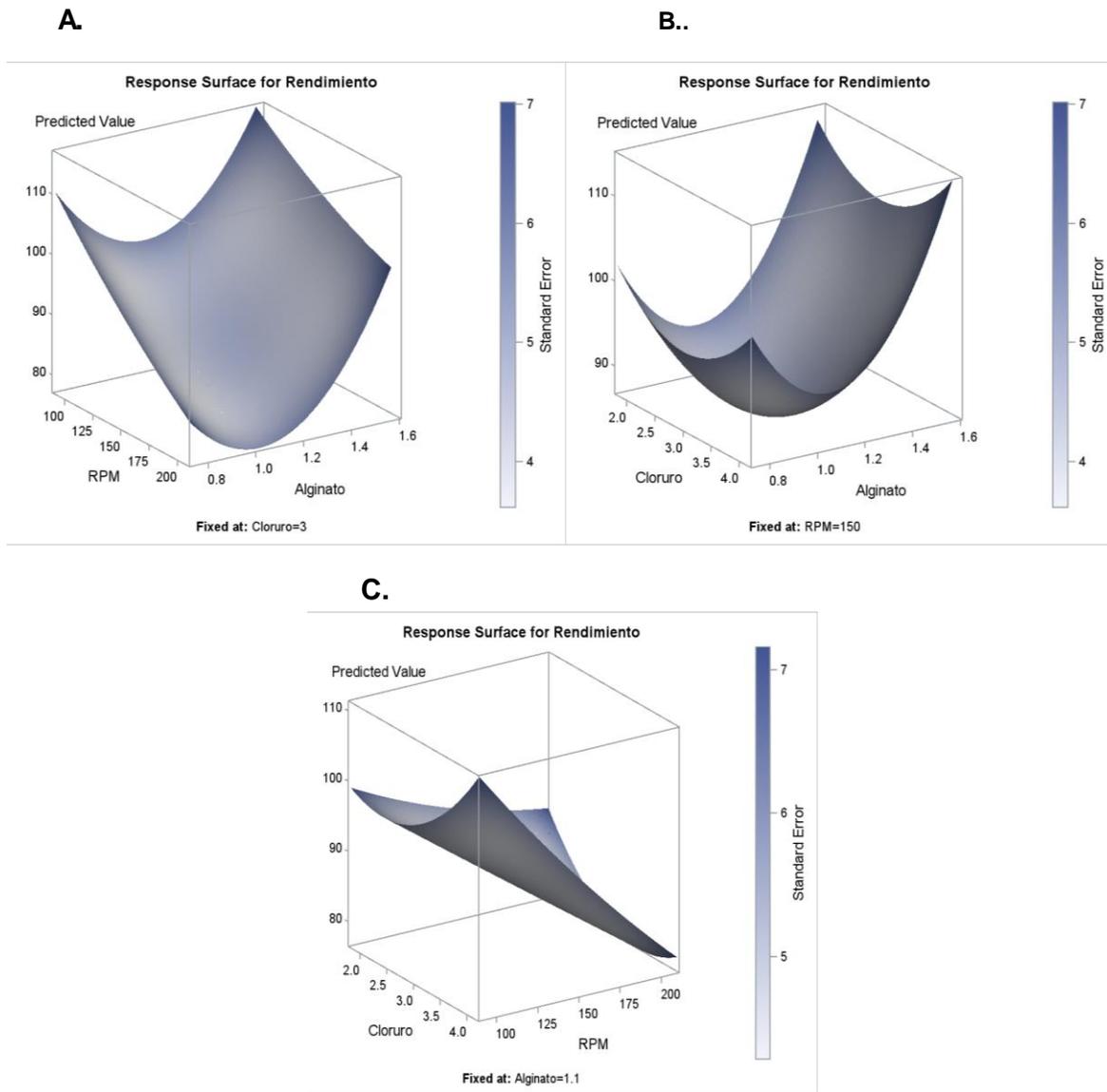
La figura 14A muestra el análisis de superficie del rendimiento de las macrocápsulas como función de la concentración de alginato de sodio y agitación 150 rpm, donde se observa que la mejor respuesta correspondiente al 100% de rendimiento se obtuvo cuando la concentración de alginato de sodio se encuentra entre 1,3 y 1,4% y la agitación se encuentra entre 134 y 135 rpm, punto donde se destacó el tratamiento que presentó el mayor rendimiento con un valor de 101,1%.

En la superficie de respuesta obtenida para el rendimiento como función de la concentración de cloruro de calcio y la concentración de alginato de sodio (ver figura 14B), observándose que cuando la concentración de alginato de sodio tiende a 1,2% y la concentración de cloruro de calcio entre 2,5% y 3,0% se obtiene un rendimiento del 100%.

En la figura 14C, se presenta el rendimiento en función de la concentración del cloruro de calcio y la agitación en rpm, se observa la máxima respuesta cuando la concentración de cloruro de calcio es de 2,5% y la agitación se encuentra entre 125 y 150 rpm.

El valor que más influyó en el rendimiento fue el de la agitación en rpm, similar a lo reportado por Geisse y colaboradores (64) en donde se ha informado que las partículas más pequeñas conducen a un mayor rendimiento o productividad del proceso porque la difusión disminuye a medida que aumenta el tamaño de la esfera.

Figura 14. A, B y C Superficie de respuesta de la variable rendimiento en función de agitación (rpm), concentración de alginato y concentración de cloruro de calcio, para la elaboración de macrocápsulas



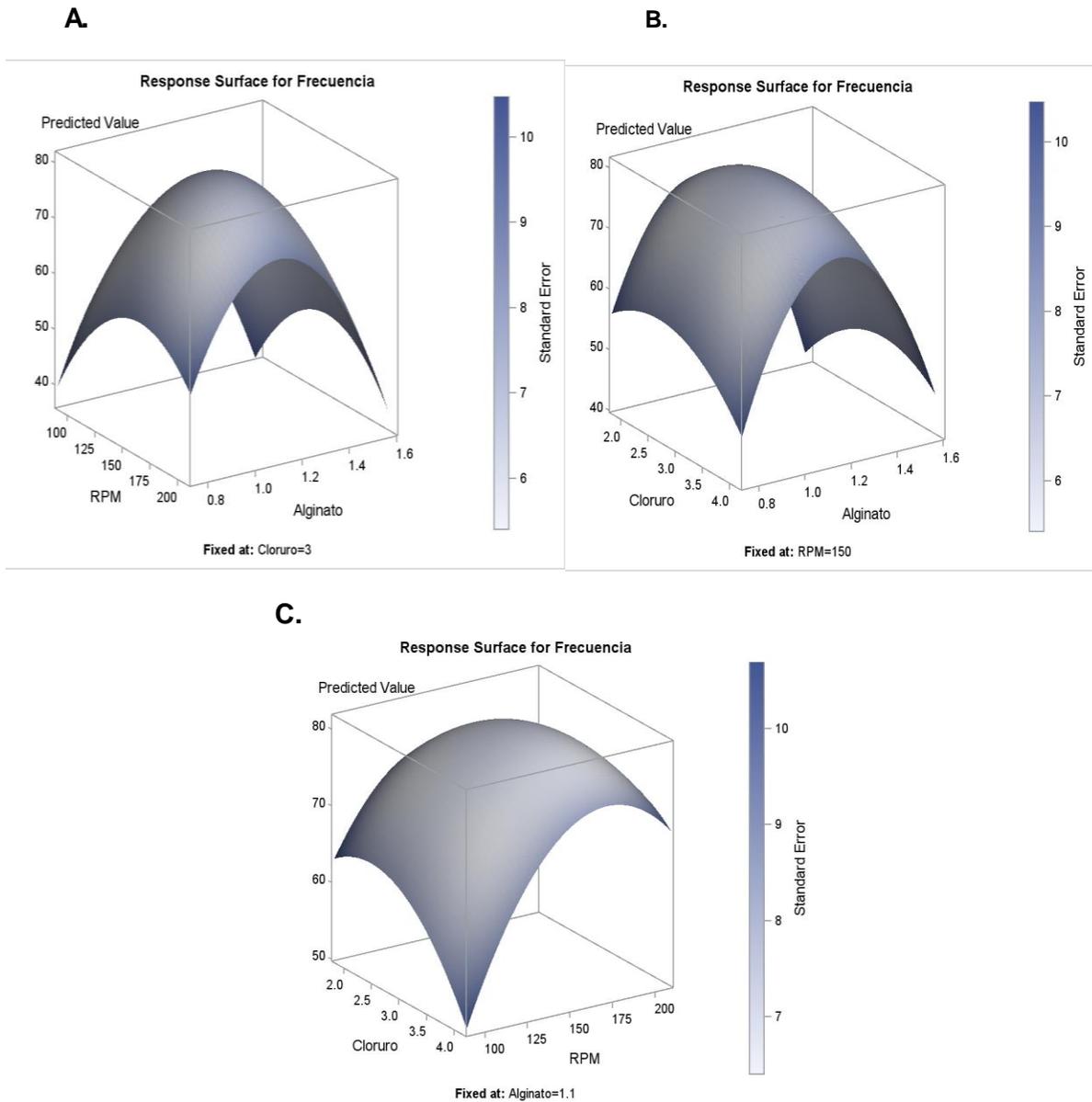
Fuente: autora, 2022

Análisis de superficie de respuesta teniendo en cuenta el rendimiento fijado por el programa Statgraphics 8.1 con valores e concentración de cloruro de 3%, rpm de 150 y concentración de alginato de 1,1%.

Para el caso de la frecuencia, (ver figura 15) los valores máximos reportados teniendo en cuenta la concentración de alginato y rpm se encuentran cuando el parámetro

frecuencia se encuentra entre 79,21, registrando valores de alginato de sodio de 1,12% y rpm de 178,6 (ver figura 15 A y B). Esto valores se registraron igualmente, cuando la concentración de cloruro de calcio CaCl_2 está entre 3,5 y 3,6%

Figura 15. A B y C Superficie de respuesta de la variable frecuencia en función de agitación (rpm), concentración de alginato y concentración de cloruro de calcio, para la elaboración de macrocápsulas



Fuente: autora, 2022

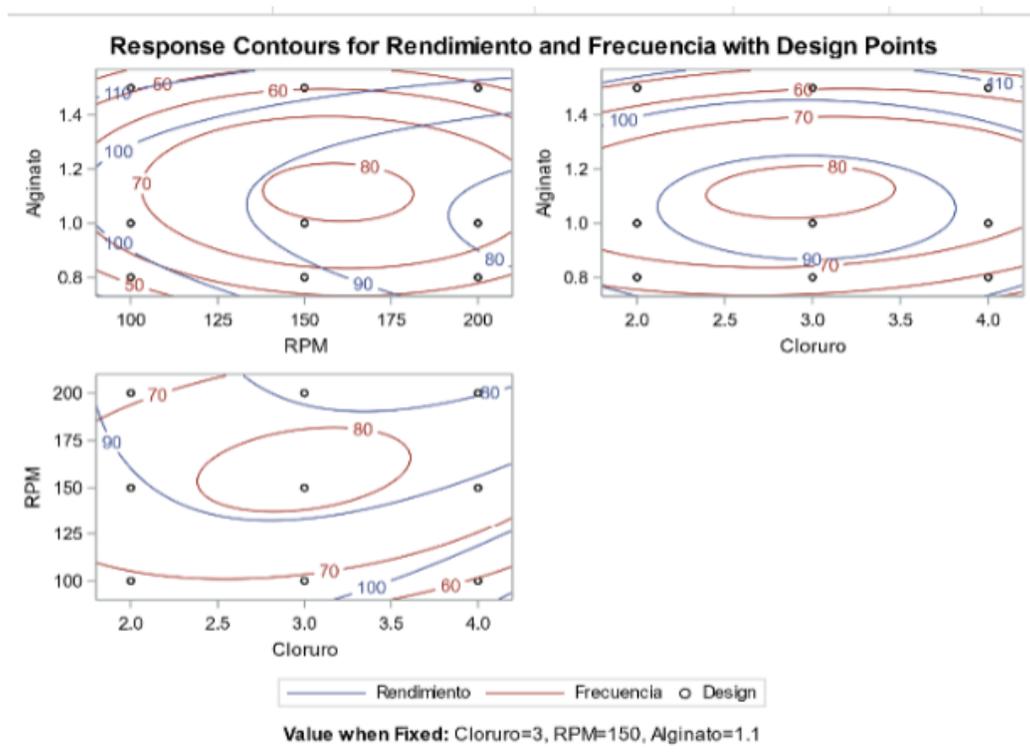
Análisis de superficie de respuesta teniendo en cuenta la frecuencia fijado por el programa Statgraphics 8.1 con valores de concentración de cloruro de 3%, rpm de 150 y concentración de alginato de 1,1%.

Posteriormente, se realizó un análisis multinivel para determinar los valores óptimos de los factores. El modelo de predicción indicó que los parámetros óptimos (ver tabla 7) para el proceso son: una agitación de 140 rpm, una concentración de alginato de sodio de 1,2% y una concentración de cloruro de calcio de 2,5%, niveles que permiten optimizar las respuestas de rendimiento teórico de 90,7% y una frecuencia de tamaño de 3,6 mm del 78,5% (ver figura 16).

Tabla 7. Resultados y valores óptimos del análisis multicriterio.

Factor	Valor
Agitación (rpm)	140
Concentración de cloruro de calcio (%)	2,50
Concentración de alginato de sodio (%)	1,20
Variable respuesta	Óptimo
Rendimiento (%)	90,70
Frecuencia – mm	78,59

Figura 16. Análisis de superficie rendimiento y tamaño



Fuente: autora, 2022

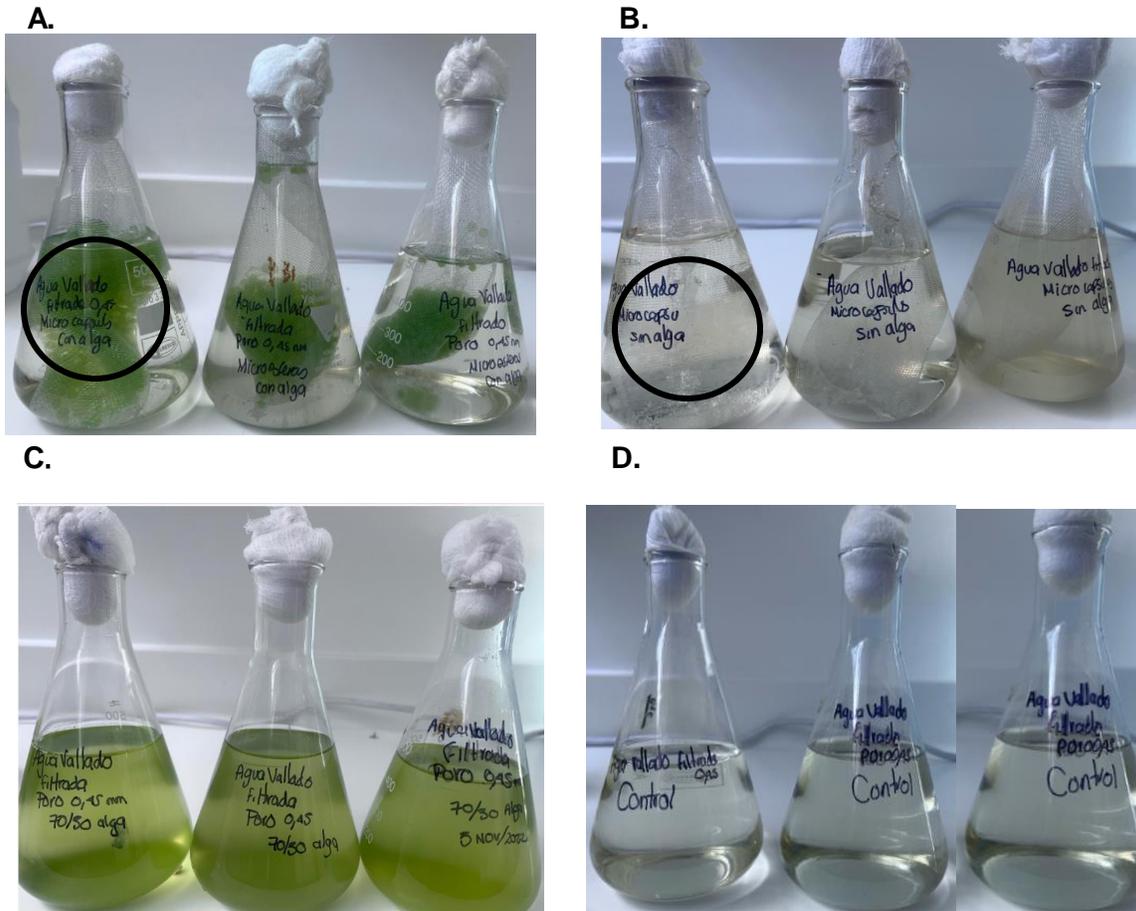
En cuanto a la significancia global de los factores de corrida evaluados (anexo 8), se encontró que el único factor con efecto significativo ($P < 0.05$) sobre las tres variables de respuesta fue el alginato de sodio. La agitación en rpm también fue un factor significativo para la variable rendimiento.

Considerando las concentraciones de cloruro de calcio de 2,5% establecidas por el programa, cercanas al valor más alto de 3% en los experimentos, se pueden obtener esferas más esféricas y homogéneas al igual que la normalización del diámetro de las esferas obtenidas (63). Las concentraciones de alginato están por debajo del 2% debido a que si se aumenta su concentración aumenta la densidad y la viscosidad imposibilitando el proceso de gelificación y encapsulación en el cloruro de calcio,

igualmente la baja concentración de cloruro de calcio puede influir en la disminución de los sitios activos COO^- que tienen interacción con NH_4^+ (50,65).

Estos valores se utilizaron para realizar la microencapsulación para el aislamiento nativo de microalga *Chlamydomonas* sp utilizadas en el biofiltro diseñado, colocándolas dentro de una malla plástica como se observa en la figura 16.

Figura 17. Diseño experimental de los distintos tratamientos.



Diseño experimental y montaje de los biorreactores. En las imágenes: A. réplicas tratamiento alga encapsulada. B. Réplicas tratamiento capsulas sin alga. C. Réplica microalgas libre. D. Agua vallado sin tratamiento. Foto tomada por la autora, 2022.

5.4 Valores de N-NH₄⁺ y NO₃⁻ después del tratamiento

El biofiltro diseñado con las macrocápsulas de la microalga *Chlamydomonas* sp., aumentó a 10,6 mg/l (menos valor de esfera sin alga) el contenido de amonio NH₄⁺. El biofiltro diseñado con microalgas de forma libre incremento a 20,0 mg/l (menos valor de esfera sin alga) el contenido de NH₄⁺ bajo las condiciones trabajadas, estableciéndose diferencias significativas entre los tratamientos (p<0,01), siendo el tratamiento donde se utilizó la microalga encapsulada, el que menos incrementó el valor final de amonio NH₄⁺, porque la estructura porosa de las macrocápsulas como lo reporta la literatura crea un ambiente micro-aeróbico con un efecto positivo sobre el tratamiento de amonio (30) (ver Tabla 8 y Tabla 9).

Tabla 8. Concentración de N-NH₄⁺, NO₃⁻ y pH después de cada tratamiento

Réplica	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Tratamiento	pH			N-NH ₄ ⁺ (mg/L)			NO ₃ ⁻ (mg/L)		
Vallado sin tratamiento	6,1	6,1	6,1	4,6	4,6	4,6	5,1	5,1	5,1
Esfera sin alga	5,9	5,1	5,9	11,9	4,5	4,6	8,9	5	5,1
Microalga encapsulada	6,1	6,2	6,1	14,1	12,8	26,0	35,1	33,7	32
Microalga libre	5,9	7,0	6,1	22,8	31,1	27,3	32,6	44,4	46,9

Tabla 9. Promedio y desviación concentraciones de NH₄⁺ según tratamiento

Nutriente	Factor	Promedio	Desviación
NH ₄ ⁺	Agua vallado sin tratamiento	4,6	0
	Esfera sin alga	7	4,2
	Biofiltro con microalga encapsulada	17,6	7,2
	Biofiltro con microalga libre	27,0	4,1

Con respecto a las concentraciones de NO₃⁻, se observó que el biofiltro diseñado con las macrocápsulas con microalga, incrementó su valor a 27, 7 mg/l (menos valor de esfera sin alga). El biofiltro diseñado con microalgas de forma libre incremento en promedio a 35,0 mg/l (menos valor de esfera sin alga) de NO₃⁻, bajo las condiciones trabajadas, estableciéndose diferencias significativas entre los tratamientos (p<0,01), siendo el tratamiento donde se utilizó la microalga encapsulada, el que menos incrementó el valor final de NO₃⁻ (ver tabla 10).

El tratamiento de macrocápsulas sin microalga no presentó cambios significativos ($p > 0,05$) con respecto a la concentración de NH_4^+ y de NO_3^- respecto al valor control, lo cual indica que las esferas hechas de alginato de calcio no tuvieron un efecto en el aumento o disminución de las concentraciones de estos compuestos.

Se observó una disminución del pH por debajo de 7 en los tratamientos realizados lo cual puede ser por un contenido alto de NH_4^+ influyendo en los procesos de bioabsorción, ya que el pH determina la solubilidad del CO_2 en el medio de cultivo e influye en la eliminación efectiva de nutrientes (60).

Tabla 10. Promedio y desviación estándar concentraciones de NO_3^- según tratamiento

Nutriente	Factor	Promedio	Desviación
NO_3^-	Agua vallado sin tratamiento	5,1	0
	Esfera sin alga	6,3	2,2
	Biofiltro con microalga encapsulada	33,6	1,5
	Biofiltro con microalga libre	41,3	7,6

Se observó en general que los biofiltros diseñados con la microalga *Chlamydomonas* sp. como células libres incrementaron el contenido de nitratos en el tiempo en un 44% (35 mg/l) con respecto a la concentración de amonio (20 mg/l). Esto puede ser debido a que las microalgas intentaron consumir NH_4^+ primero, y el NO_3^- no se utilizó, ya que se ha observado que la asimilación de NO_3^- es inhibida en las microalgas en presencia de NH_4^+ y una vez que el NH_4^+ se agota, puede ocurrir la asimilación de NO_3^- (60). Dado que el NH_4^+ ya estaba aumentado en 10,6 mg/l en el tratamiento donde se usó el biofiltro en el que se usa la microalga microencapsulada y 20 mg/l con el biofiltro en el que se usa la microalga libre en la finalización del experimento (~ día 18) posiblemente no se pudo consumir el NO_3^- incrementándose a 27,7 mg/l y 35 mg/l, respectivamente.

Este incremento de Nitrógeno en forma de amonio y nitratos en el medio líquido por parte de *Chlamydomonas* sp puede estar relacionado con las rutas metabólicas de asimilación de NH_4^+ y NO_3^- , donde es importante que para que estas se expresen, las concentraciones extracelulares en el medio deben ser suficientes para que puedan inducir la expresión de genes involucrados en el transporte, asimilación y transformación dentro de los organelos de *Chlamydomonas* sp, (25). Uno de estos genes indispensables

en la acumulación intracelular en *Chlamydomonas* sp, es el factor de transcripción NIT2 encargado de regular positivamente otros genes relacionados con la asimilación de NO_3^- tales como NII1, NRT2.1, NRT2.2, NRT2.3, NAR2, NIA1, NAR1.1; en comparación con el incremento de NO_3^- en la muestra de agua de vallado después de haber estado en contacto con el alga (ver tabla 8 y 10), existen mutantes de NIT2 que no pueden crecer en medios de nitratos (25).

La presencia de *Chlamydomonas* sp en forma libre o encapsulada en el medio de las muestras colectadas de vallado y el incremento de las concentraciones iniciales de nitrato y amonio también puede estar relacionada a la baja concentración y disponibilidad de carbono en el medio, pues se ha registrado que, en condiciones de estrés, el nitrato y el amonio se excretan fuera de la célula (25). Otra condición que pudo afectar el incremento de nitrato en el medio, fue que la concentración de amonio bloquea los genes de la asimilación de nitrato, puede llegar a ser una señal negativa para el factor transcripcional NIT2 o postranscripcional (66).

En este sentido, el crecimiento de microalgas directamente dentro de aguas contaminadas puede llegar a afectar su metabolismo de acuerdo a altas o bajas concentraciones de distintos inhibidores, en este caso el NH_4^+ puede llegar a generar toxicidad celular (67), debido a que puede ser un factor negativo para la fotosíntesis de *Chlamydomonas* sp en la transferencia de electrones, la síntesis de pigmentos y los productos de la fotosíntesis, lo que en general afectará la absorción de NH_4^+ y NO_3^- , ya que es un proceso que requiere energía (68). Por otro lado, el aumento y no disminución de nitratos después del día 15 de haber operado el biorreactor, puede estar asociado a que la forma preferida para las microalgas es el NH_4^+ porque no necesita pasos previos de transformación o reducción y es incorporado constantemente hacia las células para convertirlo directamente en aminoácidos por medio de la vía metabólica de la glutamina sintetasa, en donde la enzima glutamina sintasa toma el NH_4^+ y cataliza la formación de glutamina a partir de glutamato y trifosfato de adenosina (ATP) (69). Sin embargo, como no se evaluaron las concentraciones de amonio en distintos momentos de los tratamientos alga encapsulada y alga libre en los fotobiorreactores, se desconoce si la no bioabsorción fue debido a esto.

Para el caso de las microalgas encapsuladas en alginato de sodio y carbonato de calcio en ambos casos de concentraciones finales de NH_4^+ y NO_3^- (ver tabla 9 y 10) se obtuvieron valores negativos en el porcentaje de bioabsorción de -282% y -558% respectivamente. Valores negativos indican aumento de la concentración de estos contaminantes (70), que puede atribuirse al aumento total de amonio y nitrato a la bioconversión anaeróbica de proteínas que contienen aminoácidos para luego ser liberados en forma de amoniaco (71,72). De igual manera, este aumento podría atribuirse posiblemente a que como se ha reportado, *Chlamydomonas reinhardtii* encapsulada en la misma matriz de alginato puede llegar a perder afinidad para asimilar dichos compuestos en medios líquidos, dado que la difusión de nitrógeno inorgánico a través de esferas de alginato afecta el consumo de nitrato (73,74). Sin embargo, considerando que los valores de los tratamientos con microalgas libres para ambos casos, nitrato y amonio, incrementaron un poco más que las encapsuladas (ver tabla 8), es importante resaltar que la asimilación de nitrógeno por parte de *Chlamydomonas* sp puede verse afectada por la fotorrespiración que es ocasionada por las condiciones ambientales que rodean a la célula, donde la enzima Rubisco, encargada de fijar el CO_2 cuando este está en altas concentraciones, cambia su afinidad por el O_2 ocasionando que este proceso de oxigenación produzca exportación de Malato de los cloroplastos que se convierte en NADH, sustrato para la nitrato y nitrito reductasa produciendo NH_4^+ (75); o por el otro lado también existen una vía metabólica que contribuye a la liberación de NH_4^+ que impulsa la transformación de glicina proveniente de la mitocondria, a serina y amonio (76,77), posteriormente, estas cantidad de amonio en el medio actuarán como inhibidores de transportadores de NO_3^- como se nombró anteriormente. De igual manera, otro factor importante en la bioabsorción de compuestos nitrogenados por parte de las microalgas, puede estar influenciado por la temperatura y el pH del medio, puesto que se han registrado que valores altos o muy bajos, puede llegar a tener un efecto negativo en la asimilación de estos compuestos, en especial células que se encuentran libres y expuestas a cambios de pH y temperatura, ocasionando incluso inactividad celular (78).

El uso de microalgas aisladas de cuerpos de agua para bioabsorción y disminución de nitratos y amonio presentes ecosistemas acuáticos, se ha reportado con distintos resultados en las concentraciones finales, tal como en el caso del uso de *Chlorella*

vulgaris y *Scenedesmus dimorphus* libres en biorreactores batch, donde se reporta incremento de 5 a 45 mg/l de NH_4^+ (79), sin embargo, también se han reportado valores de reducción de nitrógeno amónico entre 86%, 87% y 93% con aguas artificiales recreadas en el laboratorio con distintas concentraciones de NH_4^+ , usando *Chlorella vulgaris*, en este caso, inmovilizadas en alginato de sodio a distintas cantidades (49). Para el caso concreto del uso de *Chlamydomonas* sp en la bioabsorción de dichos contaminantes, es importante tener en cuenta valores iniciales parecidas o iguales respecto a las concentraciones de amonio y nitrato en distintas investigaciones, en donde Ávila y colaboradores, en condiciones parecidas a las del presente trabajo, registraron una concentración inicial similar de 5,07 mg/l de nitrato y que después de tratamientos con *Chlamydomonas* sp libres e inmovilizadas con alginato de sodio y cloruro de calcio, se registra porcentaje de bioabsorción entre 56 y 75%, sin embargo, después del día 6 se registra incremento de un 47,5% de NO_3^- en el tratamiento con las microalgas inmovilizadas (48).

Debido a la no bioabsorción y al aumento en el tiempo de los valores iniciales de nitrato y amonio, se puede atribuir que, para los dos casos, ya sea libre o inmovilizada, los procesos de oxidación del amonio que eventualmente provocan el aumento de nitratos y nitritos en las aguas residuales, de igual manera, se ha reportado que al aumentar la intensidad de la luz los oxidantes de nitrato se vieron significativamente más afectados por la luz que los oxidantes de amonio, es decir, pueden ser foto inhibidos a altas irradiaciones que se encuentran típicamente en condiciones exteriores (71,80). Según Kaplan y colaboradores en el año 2000 en un estudio que realizaron en un cuerpo de agua natural, se encontró que la luz se fue un factor importante que inhibe la nitrificación y provoca la acumulación de nitrito durante la primavera y el verano (81), esto puede contrastarse con el aumento leve que se registró en el tratamiento con esferas de alginato sin microalgas. La luz intensidad lumínica es otro factor importante en el rendimiento fotosintético de las microalgas, pues intensidades lumínicas que superen el llamado punto de saturación, podrían llegar a provocar la fotooxidación lo que se traduce en daños en los receptores de luz alojados en los fotosistemas (82).

Considerando otros parámetros dentro del tratamiento se compararon los valores iniciales de pH del vallado y los obtenidos después de cada uno de los tratamientos y se encontró que dichos valores estuvieron entre 5,9 y 7,0 considerando la muestra control que fue de 6,1 (ver tabla 8). Esto demuestra que el factor pH no tuvo una influencia directamente proporcional y significativa con el aumento de las distintas concentraciones de NH_4^+ y NO_3^- , sin embargo, estos valores pueden considerarse como evidencia de la actividad fotosintética de *Chlamydomonas* sp. En medio acuoso esta microalga usa HCO_3^- generando en el medio liberación de iones hidroxilo ($\text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CO}_2 + \text{OH}^-$), para lo cual a medida que aumenta la actividad fotosintética a través del uso del CO_2 y generación de moléculas orgánicas y asimilación de otros compuestos por medio del uso de nitrógeno, debería aumentar el pH del medio en el que rodea a la microalga, la investigación de Yulistyorini y colaboradores, registraron mediciones de valores de pH a medida que las microalgas absorbían compuestos inorgánicos nitrogenados y obtuvieron valores aproximados de 9,6 cuando usaban NH_4^+ como única fuente de nitrógeno, con otras fuentes como solamente NO_3^- o en presencia de NH_4^+ y NO_3^- en el medio, se registraron valores de 9,8 y 9,7 (57).

Los resultados permiten establecer que la microalga *Chlamydomonas* sp. microencapsulada y en forma de libre estuvo activa y realizó bioprocesos durante los tratamientos, por lo que se sugiere seguir la investigación para optimizar los biofiltros diseñados con este microorganismo nativo aislado de aguas procedentes de vallados para la eliminación de los compuestos contaminantes presentes.

6. Conclusiones

La caracterización fisicoquímica del vallado ubicado en Mosquera Cundinamarca pertenece a un nivel 6 de estado de eutrofización, con una concentración de N-NH_4^+ Amonio 2,5 mg/l y de NO_3^- Nitrato 2,2 mg/l con una conductividad de dS/m 0.34 y un pH de 7, superando los criterios de calidad admisibles para la destinación del recurso humano y doméstico.

La microalga aislada de las muestras de vallado presentes en Mosquera- Cundinamarca pertenece al género *Chlamydomonas* sp de acuerdo al marcador molecular 18S y a las características morfológicas presentes en el ciclo de vida encontradas a través de la observación microscópica. Esta alga presenta un tiempo de duplicación de 3,92 días y una tasa de crecimiento específica máxima de (μ_{max}) de 0,077 bajo condiciones de pH 6,8, temperatura $20 \pm 2^\circ\text{C}$, iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips), irradiancia 75 luxes por 15 días y fotoperiodo 20h luz/ 4h oscuridad.

El biofiltro consistió en usar la microalga *Chlamydomonas* sp de forma libre y microencapsuladas bajo las condiciones de 1,2% de alginato de sodio, 2,5% cloruro de calcio y una agitación 140 rpm, obteniendo una frecuencia de 78,59% de tamaño óptimo de 3,63 mm y 90% de rendimiento. El uso del biofiltro diseñado se realizó colocando 300 macrocápsulas en una malla de plástico, y para el alga libre con una concentración con una agitación de 100 rpm, que imitaba el flujo constante de agua de vallado.

Los tratamientos donde se utilizó el biofiltro con la microalga *Chlamydomonas* sp. encapsulada produce un aumento de concentración de NH_4^+ y de NO_3^- de 10,6 mg/l y 27,7 mg/l respectivamente frente a 4,6 mg/l y 5,1 mg/l de valor inicial en el agua de vallado sin tratamiento. Para el caso del tratamiento del biofiltro con microalga libre las concentraciones aumentaron con un valor final de 20,0 mg/L para NH_4^+ y con un valor final de y 35,0 mg/L de NO_3^- .

El tratamiento con el biofiltro diseñado con la microalga *Chlamydomonas* sp. como células libres representó un factor muy influyente en el aumento de las concentraciones finales de NH_4^+ y de NO_3^- , en comparación con el biofiltro diseñado con la microalga

microencapsulada, por lo cual se sugiere seguir la investigación para optimizar los biofiltros diseñados con este microorganismo nativo aislado de aguas procedentes de vallados para la bioabsorción de los compuestos contaminantes presentes.

7. Recomendaciones

Se recomienda realizar análisis de las concentraciones de amonio y nitrato en intervalos de tiempo entre 24 a 48 h para determinar si existe un límite que provoque inhibición del proceso de absorción por parte de *Chlamydomonas* sp.

Para el tratamiento de bioabsorción es importante determinar una intensidad lumínica que favorezca la disminución de las concentraciones presumiblemente más baja a la trabajada debido a que puede afectar la oxidación de los compuestos y la actividad metabólica fotosintética.

Ensayar el biofiltro de la microalga con aguas a las cuales se les realizó tratamientos previos como el de una PTAR, dejándola más tiempo, debido a que puede mejorar concentraciones de amonio tolerable para el alga, además de otros compuestos no incluidos en el presente estudio, como detergentes, tenso activos, metales pesados, electrolitos de Sodio o Potasio, entre otros.

Continuar la investigación para optimizar los biofiltros diseñados con la microalga *Chlamydomonas* sp. nativa aislada de aguas procedentes de vallados para la eliminación de los compuestos contaminantes presentes.

8. Referencias

1. Villabona González SL, Benjumea-Hoyos CA, Gutiérrez-Monsalve JA, López-Muñoz MT, González EJ. Variables fisicoquímicas y biológicas de mayor influencia en el estado trófico de cinco embalses andinos colombianos. *Rev la Acad Colomb Ciencias Exactas, Físicas y Nat.* 2020;44(171).
2. Alori ET, Gabasawa AI, Elenwo CE, Agbeyegbe OO. Bioremediation techniques as affected by limiting factors in soil environment. *Front Soil Sci.* 2022;2.
3. Roldán-Pérez G, Ramírez-Restrepo JJ. Fundamentos de limnología neotropical. Vol. 2, Editorial Universidad de Antioquia. 2008.
4. Gupta S, Pawar SB, Pandey RA. Current practices and challenges in using microalgae for treatment of nutrient rich wastewater from agro-based industries. Vol. 687, *Science of the Total Environment.* 2019.
5. Mallick N. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. *BioMetals.* 2002;15(4).
6. Hameed MS a, Ebrahim OH, Suef B. Biotechnological potential uses of immobilized algae. *Int J Agric & Biol.* 2007;9(1).
7. Cárdenas Calvachi GL, Sánchez Ortiz IA. Nitrógeno en aguas residuales: orígenes, efectos y mecanismos de remoción para preservar el ambiente y la salud pública. *Univ y Salud.* 2013;15(1).
8. Royal G, Finlayson M. *Perspectiva Mundial Sobre los Humedales: Estado de los humedales del mundo y de los servicios que prestan a las personas 2018.* Convención Ramsar sobre los Humed. 2018;
9. O'Nei WB, Maurer M, Polanía O. Contaminacion industrial en Colombia. FEDESARROLLO; 1994. p. 151–75.
10. Instituto Humboldt, Investigación de Recursos Biológicos. Instituto Humboldt, Humedales Interiores de Colombia: Bases Técnicas para su Conservación y Uso Sostenible . 1999;
11. Gil-Izquierdo A, Pedreño MA, Montoro-García S, Tárraga-Martínez M, Iglesias P, Ferreres F, et al. A sustainable approach by using microalgae to minimize the eutrophication process of Mar Menor lagoon. *Sci Total Environ.* 2021;758.
12. Bernal R, Arias M, Domínguez M, Durán R, Valdés M, Sardiñas A. Bacterias como herramientas potenciales en el mejoramiento de humedales artificiales para el tratamiento de aguas. *Rev CENIC Ciencias Biológicas.* 2010;41(0253–5688).
13. Nagarajan D, Lee DJ, Chen CY, Chang JS. Resource recovery from wastewaters using microalgae-based approaches: A circular bioeconomy perspective. Vol. 302, *Bioresource Technology.* 2020.

14. Hernández-Pérez A, Labbé JI. Microalgas, cultivo y beneficios. Vol. 49, Revista de Biología Marina y Oceanografía. 2014.
15. de-Bashan LE, Bashan Y. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresour Technol.* 2010;101(6).
16. INECOL instituto de ecología México. Los humedales, sus funciones y su papel en el almacenamiento de carbono atmosférico.
17. UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. REVISIÓN PLAN BASICO ORDENAMIENTO TERRITORIAL MUNICIPIO DE MOSQUERA CUNDINAMARCA . Facultad de Artes. 2012.
18. Guadarrama , Rosendo, Kido J, Roldán , Gustavo, Salas M. Contaminación del agua. *Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales . Rev Ciencias Ambient y Recur Nat .* 2015 Sep;2:1–10.
19. Roldán G. Bioindicación de la calidad del agua en Colombia: propuesta para el uso del método BMWP Col. *Bioindicación de la calidad del agua en Colombia: propuesta para el uso del método BMWP Col.* 2003.
20. De Miguel-Fernández C, Vázquez-Taset YM. ORIGEN DE LOS NITRATOS (NO₃) Y NITRITOS (NO₂) Y SU INFLUENCIA EN LA POTABILIDAD DE LAS AGUAS SUBTERRÁNEAS. *Minería y Geol.* 2006;22(3).
21. Du H, Chen Z, Mao G, Chen L, Crittenden J, Li RYM, et al. Evaluation of eutrophication in freshwater lakes: A new non-equilibrium statistical approach. *Ecol Indic.* 2019;102.
22. ministerio de agricultura. Decreto 1594 de 1984. Ley 9 1979 - Ley 2811 1974. 1984;1984(Junio 26).
23. Moreno-Vivián C, Cabello P, Martínez-Luque M, Blasco R, Castillo F. Prokaryotic nitrate reduction: Molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. Vol. 181, *Journal of Bacteriology.* 1999.
24. Chen H, Wang Q. Microalgae-based nitrogen bioremediation. Vol. 46, *Algal Research.* 2020.
25. Sanz-Luque E, Chamizo-Ampudia A, Llamas A, Galvan A, Fernandez E. Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae. Vol. 6, *Frontiers in Plant Science.* 2015.
26. Soler-Jofra A, Pérez J, van Loosdrecht MCM. Hydroxylamine and the nitrogen cycle: A review. Vol. 190, *Water Research.* 2021.
27. McDonald AE, Ivanov AG, Bode R, Maxwell DP, Rodermeil SR, Hüner NPA. Flexibility in photosynthetic electron transport: The physiological role of plastoquinol terminal oxidase (PTOX). Vol. 1807, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics.* 2011.

28. Harris EH. The Chlamydomonas Sourcebook Volume1: Introduction to Chlamydomonas and Its Laboratory Use. Vol. 53, Journal of Chemical Information and Modeling. 2013.
29. Takeuchi T, Benning C. Nitrogen-dependent coordination of cell cycle, quiescence and TAG accumulation in Chlamydomonas. Vol. 12, Biotechnology for Biofuels. 2019.
30. Morando-Grijalva CA, Vázquez-Larios AL, Alcántara-Hernández RJ, Ortega-Clemente LA, Robledo-Narváez PN. Isolation of a freshwater microalgae and its application for the treatment of wastewater and obtaining fatty acids from tilapia cultivation. Environ Sci Pollut Res. 2020;27(23).
31. Bellinger EG, Sigeo DC. Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators. Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators. 2010.
32. Pröschold T, Darienko T, Krienitz L, Coleman AW. Chlamydomonas schloesseri sp. nov. (Chlamydomophyceae, Chlorophyta) revealed by morphology, autolysin cross experiments, and multiple gene analyses. Phytotaxa. 2018;362(1).
33. Bux F, Chisti Y. Algae biotechnology. Products and processes. Green Energy Technol. 2016;(March).
34. Huang Q, Jiang F, Wang L, Yang C. Design of Photobioreactors for Mass Cultivation of Photosynthetic Organisms. Engineering. 2017;3(3).
35. Qin L, Gao M, Zhang M, Feng L, Liu Q, Zhang G. Application of encapsulated algae into MBR for high-ammonia nitrogen wastewater treatment and biofouling control. Water Res. 2020;187.
36. Lebeau T, Robert JM. Biotechnology of immobilized micro algae: a culture technique for the future? Algal Cult Analog Bloom Appl. 2006;2(January 2006).
37. Razak SBA, Sharip Z. The potential of phycoremediation in controlling eutrophication in tropical lake and reservoir: A review. Vol. 180, Desalination and Water Treatment. 2020.
38. Kumar SD, Santhanam P, Park MS, Kim MK. Development and application of a novel immobilized marine microalgae biofilter system for the treatment of shrimp culture effluent. J Water Process Eng. 2016;13.
39. Ecological and Genetic Implications of Aquaculture Activities. Ecological and Genetic Implications of Aquaculture Activities. 2007.
40. Persson F, Långmark J, Heinicke G, Hedberg T, Tobiasson J, Stenström TA, et al. Characterisation of the behaviour of particles in biofilters for pre-treatment of drinking water. Water Res. 2005;39(16).
41. Youcai Z, Ziyang L. Leachate Pollution Control Technology at Sanitary Landfill. In: Pollution Control and Resource Recovery. 2017.

42. Kirisits MJ, Emelko MB, Pinto AJ. Applying biotechnology for drinking water biofiltration: advancing science and practice. Vol. 57, Current Opinion in Biotechnology. 2019.
43. Claydon LS. Rigour in quantitative research. Vol. 29, Nursing standard (Royal College of Nursing (Great Britain): 1987). 2015.
44. Mohajan HK. Quantitative Research: A Successful Investigation in Natural and Social Sciences. J Econ Dev Environ People. 2020;9(4).
45. Galarza CR. Los alcances de una investigación. CienciAmérica. 2020;9.
46. APHA. American Public Health Association (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st Edition. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC. Stand Methods Exam Water Waste Water. 2005;
47. Montenegro Ruiz LC. Aproximación al tratamiento de aguas residuales del lavado del café con las microalgas *Parachlorella kessreli* y *Desmodesmus armatus*. Rev Mutis. 2021 Dec;11:32–43.
48. Ávila Peltroche JGJ. Remoción de nitratos y fosfatos por cepas nativas de *Chlorella* sp. (Chlorellaceae) y *Chlamydomonas* sp. (Chlamydomonadaceae) libres e inmovilizadas en aguas residuales municipales. Arnaldoa. 2018;25(2).
49. Oluwole OR, Tobin CM, Banjo TT, Efunwoye OO, Awoyemi SO. The use of immobilized microalgal bead concentrations in the removal of ammonium nitrogen from synthetic wastewater. Niger J Biotechnol. 2019;36(1).
50. Kamaruddin MA, Yuso MS, Aziz HA. Preparation and characterization of alginate beads by drop weight. Int J Technol. 2014;5(2).
51. Posadas E, García-Encina PA, Domínguez A, Díaz I, Becares E, Blanco S, et al. Enclosed tubular and open algal-bacterial biofilm photobioreactors for carbon and nutrient removal from domestic wastewater. Ecol Eng. 2014;67.
52. Lee K, Lee CG. Nitrogen removal from wastewater by microalgae without consuming organic carbon sources. J Microbiol Biotechnol. 2002;12(6).
53. Gao Y, Yu J, Song Y, Zhu G, Paerl HW, Qin B. Spatial and temporal distribution characteristics of different forms of inorganic nitrogen in three types of rivers around Lake Taihu, China. Environ Sci Pollut Res. 2019;26(7).
54. Radu G, Racoviteanu G. Removing ammonium from water intended for human consumption. A review of existing technologies. In: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2021.
55. Jeon SM, Kim JH, Kim T, Park A, Ko AR, Ju SJ, et al. Morphological, molecular, and biochemical characterization of monounsaturated fatty acids-rich *chlamydomonas* sp. Kiost-1 isolated from Korea. J Microbiol Biotechnol.

- 2015;25(5).
56. Xie P, Ho SH, Xiao QY, Xu XJ, Zhao L, Zhou X, et al. Revealing the role of nitrate on sulfide removal coupled with bioenergy production in *Chlamydomonas* sp. Tai-03: Metabolic pathways and mechanisms. *J Hazard Mater.* 2020;399.
 57. Yulistyorini A, Camargo-Valero MA. Microalgae Growth and Phosphorus Uptake of *Chlamydomonas Reinhardtii* 11/32C under Different Inorganic Nitrogen Sources. *Int J Integr Eng.* 2020;12(9).
 58. Ruiz-Marin A, Canedo-Lopez Y, Campos-Garcia S del C, Sabido-Perez MY, Zavala-Loria J del C. Biodegradation of wastewater pollutants by activated sludge coimmobilized with *scenedesmus obliquus*. *Agrociencia.* 2013;47(5).
 59. Salbitani G, Carfagna S. Ammonium utilization in microalgae: A sustainable method for wastewater treatment. Vol. 13, *Sustainability (Switzerland)*. 2021.
 60. Taj Khanzada Z. Growing Fresh Water Microalgae in High Ammonium Landfill Leachate. *Am J Mech Appl.* 2018;6(2).
 61. Virtanen O, Valev D, Kruse O, Wobbe L, Tyystjärvi E. Photoinhibition and continuous growth of the wild-type and a high-light tolerant strain of *chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynthetica.* 2019;57(2).
 62. Bonente G, Pippa S, Castellano S, Bassi R, Ballottari M. Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to different growth irradiances. *J Biol Chem.* 2012;287(8).
 63. Soo CL, Chen CA, Bojo O, Hii YS. Feasibility of Marine Microalgae Immobilization in Alginate Bead for Marine Water Treatment: Bead Stability, Cell Growth, and Ammonia Removal. *Int J Polym Sci.* 2017;2017.
 64. de Jesus GC, Gaspar Bastos R, Altenhofen da Silva M. Production and characterization of alginate beads for growth of immobilized *Desmodesmus subspicatus* and its potential to remove potassium, carbon and nitrogen from sugarcane vinasse. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2019;22.
 65. Banerjee S, Tiwade PB, Sambhav K, Banerjee C, Bhaumik SK. Effect of alginate concentration in wastewater nutrient removal using alginate-immobilized microalgae beads: Uptake kinetics and adsorption studies. *Biochem Eng J.* 2019;149.
 66. Sanz-Luque E, Ocaña-Calahorra F, Llamas A, Galvan A, Fernandez E. Nitric oxide controls nitrate and ammonium assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Exp Bot.* 2013;64(11).
 67. Shen Y, Qiu S, Chen Z, Zhang Y, Trent J, Ge S. Free ammonia is the primary stress factor rather than total ammonium to *Chlorella sorokiniana* in simulated sludge fermentation liquor. *Chem Eng J.* 2020;397.

68. Hong M, Ma Z, Wang X, Shen Y, Mo Z, Wu M, et al. Effects of light intensity and ammonium stress on photosynthesis in *Sargassum fusiforme* seedlings. *Chemosphere*. 2021;273.
69. Gonçalves AL, Pires JCM, Simões M. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. Vol. 24, *Algal Research*. 2017.
70. Roy D, Hassan K, Boopathy R. Effect of carbon to nitrogen (C:N) ratio on nitrogen removal from shrimp production waste water using sequencing batch reactor. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2010;37(10).
71. Vergara C, Muñoz R, Campos JL, Seeger M, Jeison D. Influence of light intensity on bacterial nitrifying activity in algal-bacterial photobioreactors and its implications for microalgae-based wastewater treatment. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2016;114.
72. Su F, Li Z, Li Y, Xu L, Li Y, Li S, et al. Removal of total nitrogen and phosphorus using single or combinations of aquatic plants. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(23).
73. Garbayo I, León R, Vígara J, Vílchez C. Inhibition of nitrate consumption by nitrite in entrapped *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Bioresour Technol*. 2002;81(3).
74. Garbayo I, León R, Vílchez C. Diffusion characteristics of nitrate and glycerol in alginate. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2002;25(1).
75. Bloom AJ. Photorespiration and nitrate assimilation: A major intersection between plant carbon and nitrogen. *Photosynth Res*. 2015;123(2).
76. Inokuchi R, Kuma KI, Miyata T, Okada M. Nitrogen-assimilating enzymes in land plants and algae: Phylogenetic and physiological perspectives. Vol. 116, *Physiologia Plantarum*. 2002.
77. Hagemann M, Bauwe H. Photorespiration and the potential to improve photosynthesis. Vol. 35, *Current Opinion in Chemical Biology*. 2016.
78. Garbayo I, Vígara AJ, Conchon V, Dos Santos VAPM, Vílchez C. Nitrate consumption alterations induced by alginate-entrapment of *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Process Biochem*. 2000;36(5).
79. González LE, Cañizares RO, Baena S. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresour Technol*. 1997;60(3).
80. Akizuki S, Kishi M, Cuevas-Rodríguez G, Toda T. Effects of different light conditions on ammonium removal in a consortium of microalgae and partial nitrifying granules. Vol. 171, *Water Research*. 2020.
81. Kaplan D, Wilhelm R, Abeliovich A. Interdependent environmental factors controlling nitrification in waters. In: *Water Science and Technology*. 2000.

82. Almomani F, Al Ketife A, Judd S, Shurair M, Bhosale RR, Znad H, et al. Impact of CO₂ concentration and ambient conditions on microalgal growth and nutrient removal from wastewater by a photobioreactor. *Sci Total Environ.* 2019;662.

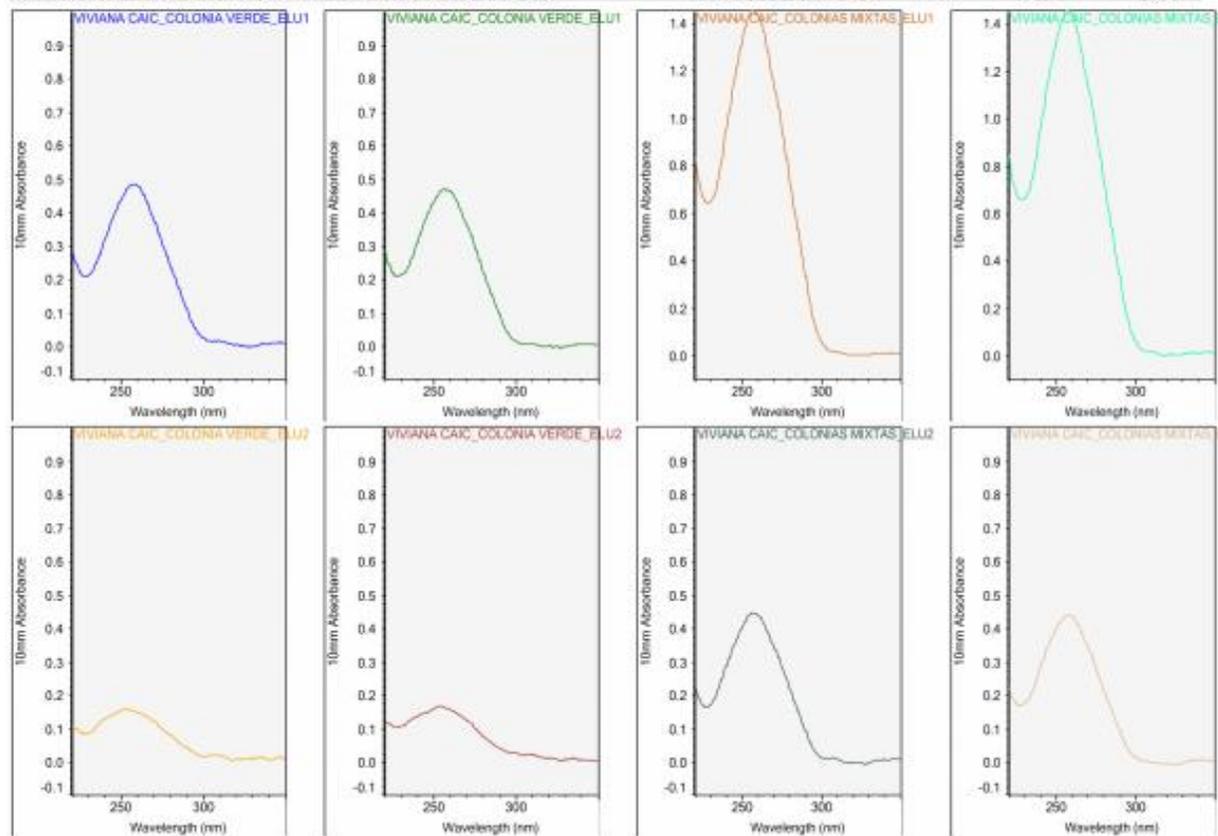
9. Anexos

Anexo 1. Resultados iniciales del estado fisicoquímico del vallado ubicado en Mosquera-Cundinamarca

ELEMENTO ANALIZADO	pH	C.E. dS/m	Cationes (mg * L ⁻¹ ó ppm)					Suma de Cationes	Aniones (mg * L ⁻¹ ó ppm)					Suma de Aniones	Fe Hierro	RAS	Clasificación
			K Potasio	Ca Calcio	Mg Magnesio	Na Sodio	N-NH ₄ ⁺ Amonio		N-NO ₃ ⁻ Nitro	Cl ⁻ Cloruro	S Azufre	HCO ₃ ⁻ Bicarbonato	CO ₃ ⁻ Carbonato				
RESULTADO DEL ANÁLISIS	7.0	0.34	4.2	22.3	6.8	26.3	2.5		2.2	17.7	2.92	140.4	0.0		0.38	1.2	C2 - S1
Resultado en meq/L			0.11	1.12	0.57	1.14	0.18	3.13	0.16	0.50	0.18	2.30	0.00	3.14			
OPTIMO meq/L	5 - 8	< 0.7	0.13-0.51	1 - 3	0.8-2.06		< 3.0		0.08 - 0.8	< 3.0	0.62 - 1.87	< 1.5			< 0.3	< 3.0	

Anexo 2. cuantificación de ADN extraído por absorción de luz a 260nm usando el NanoDropTM 2000-Thermo ScientificTM y secuencias obtenidas con los marcadores ITS y 18S

Sample ID	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
VIVIANA CAIC_COLONIA VERDE_ELU1	7/6/2022 1:15:42 PM	23.7	ng/μl	0.475	0.235	2.02	2.32	DNA	50.00
VIVIANA CAIC_COLONIA VERDE_ELU1	7/6/2022 1:16:15 PM	22.9	ng/μl	0.459	0.219	2.10	2.23	DNA	50.00
VIVIANA CAIC_COLONIAS MIXTAS_ELU1	7/6/2022 1:17:10 PM	71.4	ng/μl	1.428	0.730	1.95	2.23	DNA	50.00
VIVIANA CAIC_COLONIAS MIXTAS_ELU1	7/6/2022 1:17:18 PM	71.7	ng/μl	1.434	0.737	1.94	2.19	DNA	50.00
VIVIANA CAIC_COLONIA VERDE_ELU2	7/6/2022 1:21:42 PM	7.2	ng/μl	0.143	0.071	2.00	1.82	DNA	50.00
VIVIANA CAIC_COLONIA VERDE_ELU2	7/6/2022 1:21:50 PM	7.6	ng/μl	0.151	0.071	2.13	1.51	DNA	50.00
VIVIANA CAIC_COLONIAS MIXTAS_ELU2	7/6/2022 1:22:38 PM	21.6	ng/μl	0.432	0.214	2.02	2.63	DNA	50.00
VIVIANA CAIC_COLONIAS MIXTAS_ELU2	7/6/2022 1:22:46 PM	21.6	ng/μl	0.432	0.212	2.04	2.57	DNA	50.00



>ALGVIV ITS

CGAGCCTATCCTTGGCCGAGAGGTCGGGTAACTTTGAACTGCATCGTGATGGGGATAGATTATT
GCAATTATTAGTCTTCAACGAGGAATGCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCGTTGATTACGTCC
CTGCCCTTTGTACACACCGCCGTCGCTCTACCGATTGGGTGTGCTGGTGAAGTTCGGATTGG
CTCCATCTGGGGGCAACCTCTGGTGTGCTGAGAAGAATTAAACCTCCCACTAGAGGAAAGGA
GAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCAATTGAATCTATCAATACCAACACC
AACGTGAACCTATTTTGTGGTCTGCCGCTGGGATTTCAGTTCACAGGCGGTGCAGCTCAGCCTTTCC
GCTTCGCGGGGGTTCGGGCTGGTTCGCCCGGCTTCAAACCGGACGGGCTGGCCCCTTAA
CAAACCCACATTAACACCAAACCAAACCTTTACATAACTTATCAGTGCGGCAGGCCTAGCCTACGC
ATCTTAACAGAGACAACCTCAACAACGGATATCTTGCTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAA
TGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAAATCCGTGAACCATCGAATCTTTGAACGCAATGCGCTCGAG

GCTTTTGCCGAGAGCATGTCTGCCTCAGCGTCGGGTTTATATCGCTCCCCTCTTACATGTAAACAGT
GTGAGAGGCCAGGAGCGGACCTGGCCGTTCCAGTTAGGCGCTTGGCCTTGTGCCGAGCAAGTCCC
TGGATCGGCTGAAAGAGCAGAGCGCTAATCGAGGACCCGTTAAACGGGCCGCAACTGGGTGGGCAA
TCTAACAGTTGCTAAGCTTTAGTTGTTGGCCTGGGACCTCTTTACAAGCCCTCAAAACAGGAAACC
CTAACTTATATCCTCGACCTGAGCTCAGGCAAGAACAACCGCTGAACTTAA GCAATCAA TAAGCGG
AGGAAAAGAAAATAACAATGATGTCCC TAGTAA CGGCGAGTGAAAAGGACA TAGCCCAACTTGAAAA
TCTCCCTTTGGAGAA TTGTAGTCTAGAGAAGCGCCCTCTGCGGCGGCCTGAGCCCAAGTCCACTGG
AAAGTGGCGTCAGAGAGGGTGAGAACCCCGTCGGCTCTCGGCTTAGCTGCTCCACGAGGTGCTTTC
CA CGAGTCGGGTTGTTTGGGAA TGCAGCC

Para el caso de la secuencia obtenida con el marcador 18S se obtiene la siguiente
secuencia:

>ALGVIV_18S

TTAAGCCATGCATGTCTAAGTATAAACTGCTTATACGGTGAAACTGCGAATGGCTCA TTAATCAGTT
ATAGTTTATTTGATGGTACCTCCTACTTGGA TAACCGTAGGAAATCTAGAGCTAA TACATGCGTAAAT
CCCGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAAGGCCAGCCGGGCTTGCCCGACCTTAGGCGA
ATCATGATAACTCAAACGAA TCGCATGGCCTTGTGCCGGCGA TGTTCATTCAAA TTTCTGCCCTATC
AACTTTGATGGTAGGATAGAGGCC TACCATGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTGATT
CCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCA GCAGGCGCGCAAA TTA CCA
ATCCCGACACGGGGAGGTAGTGACAA TAAATAACAATACTGGGCA TTTATGCTGGTAA TTGGAA TG
AGTACAATGTAAATACTTAAACGAGTATCCA TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
TCCAGCTCCAA TAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGATTTCGGGTGGGTC
GACGCGGTCTGCCTCTGGTATGTACTGCGCTCGG TTCACCTTTCTGCTGGGGACGGGCTCCTGGGC
TTAACTGCTTGGGACCTGGAA TCAGCGAAGTGACCTTGAGCAAACAA GAGTGTTCAAAGCAAGCCGA
CGCTCTGAA TTTTTTAGCATGGAA TCACACGATAGGACTCTGGCCTATCTTGTTGGTCTGTAGGACC
GGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCA TTCGTATTTCA TTGTCAGAGGTGAAATCTTGAT
TTATGAAAGACGAAC TCTGCGAAAGCA TTTGCCAAGGATGTTTTCA TTGATCAAGAACGAAAGTTGG
GGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTCAACCA TAAACGATGCCGACTAGGGATTGGCAG
GTGCTCCATTTGATGACCCTGCCAGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTT TTGGGTTCCGGGGGAGTAT
GGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAA TTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGAGCCTGCGGCTT
AATTTGACTCAACA CGGGGAAACTTACCAGGTCCA GACACGGGGAGGATTGACAGATTGAGAGCTC
TTTCTTGA TTCTGTGGGTGGTGGTGCA TGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTTGCCTTGTGAGGTTGATT
CCGTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAA TAGTCACGCGTACCTTGGTACGCGCTTACTTCTTA
GAGGGACTATTGGCGTTTAGTCAATGGAAGTG TAGAGCAA TAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGT
TCTGGGCCGCA CGCGCGCTACTGATGCA TTCAACGAGCCTATCCTTGGCCGAGAGGTCCGGGTA
ATCTTTGAAACTGCATCGTGTAGGGGATAGATTA TTGCAATTA TTAGTCTTCAACGAGGAA TGCCTAG
TAAGCGCAAGTCA TCAGCTTGC

Anexo 3. Análisis SPSS crecimiento de la microalga aislada.

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	3,04	1	3,04	75,0	<,001
Residuo	0,24	6	0,04		
Total	3,29	7			

Resumen del modelo			
R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Desv. Error de estimación
0,96	0,92	0,91	0,20

Fuente: elaboración autores, 2022

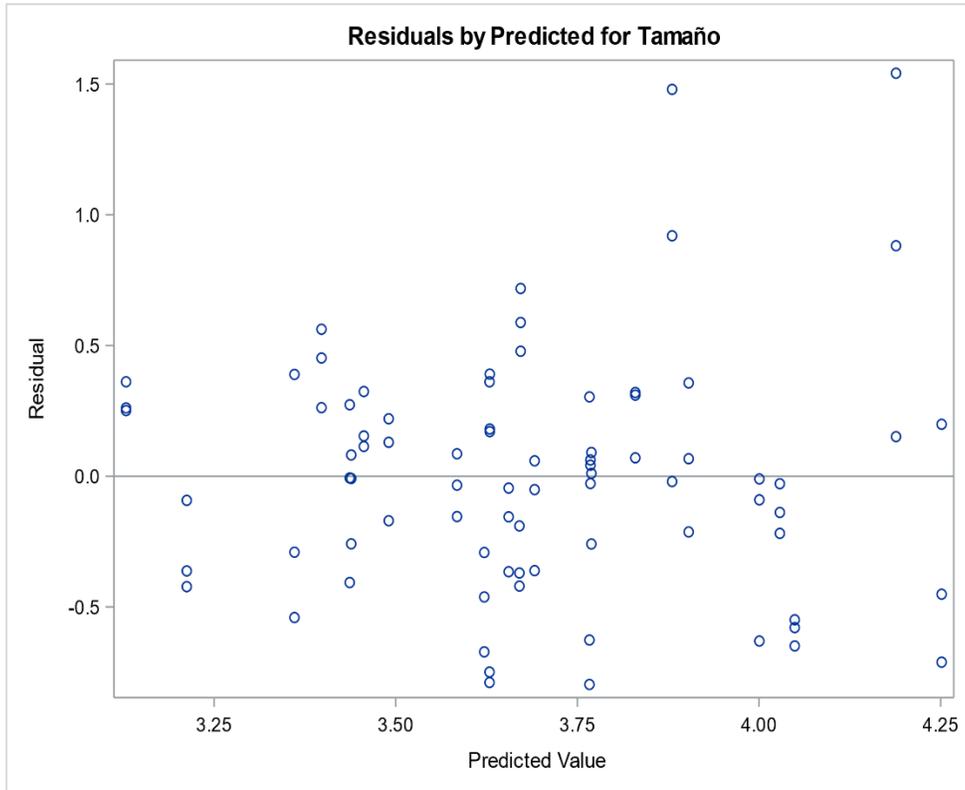
Anexo 4. Concentración ug/ mL de clorofila a de *Chlamydomonas* sp.

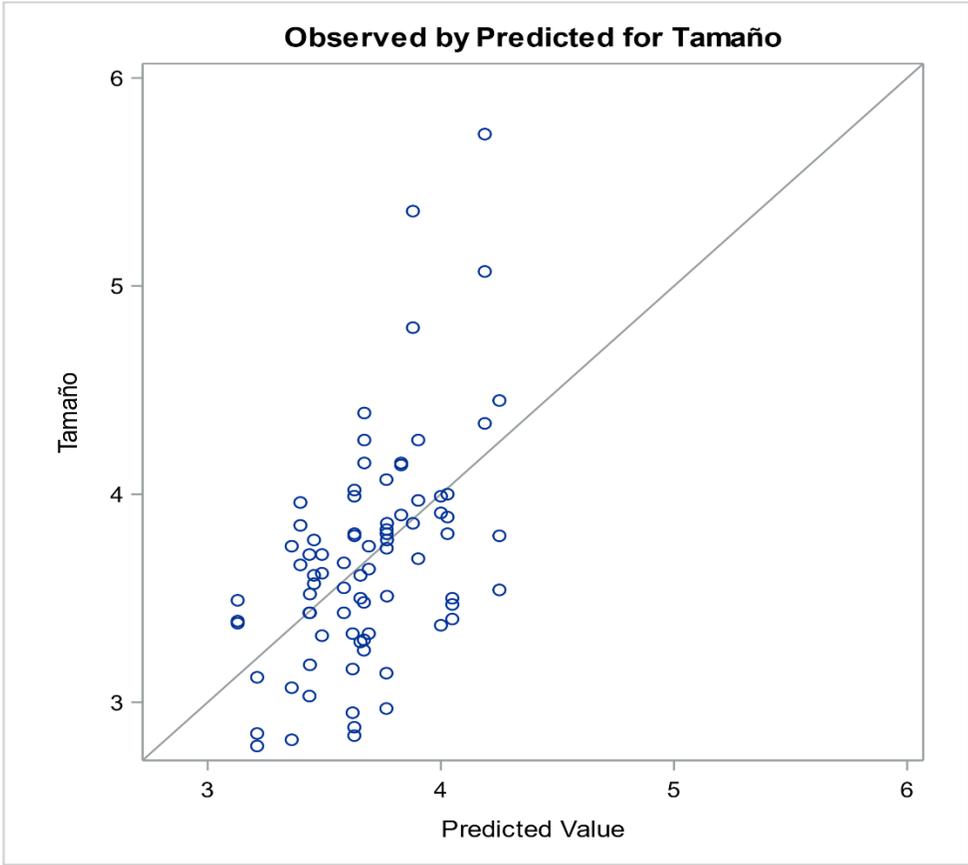
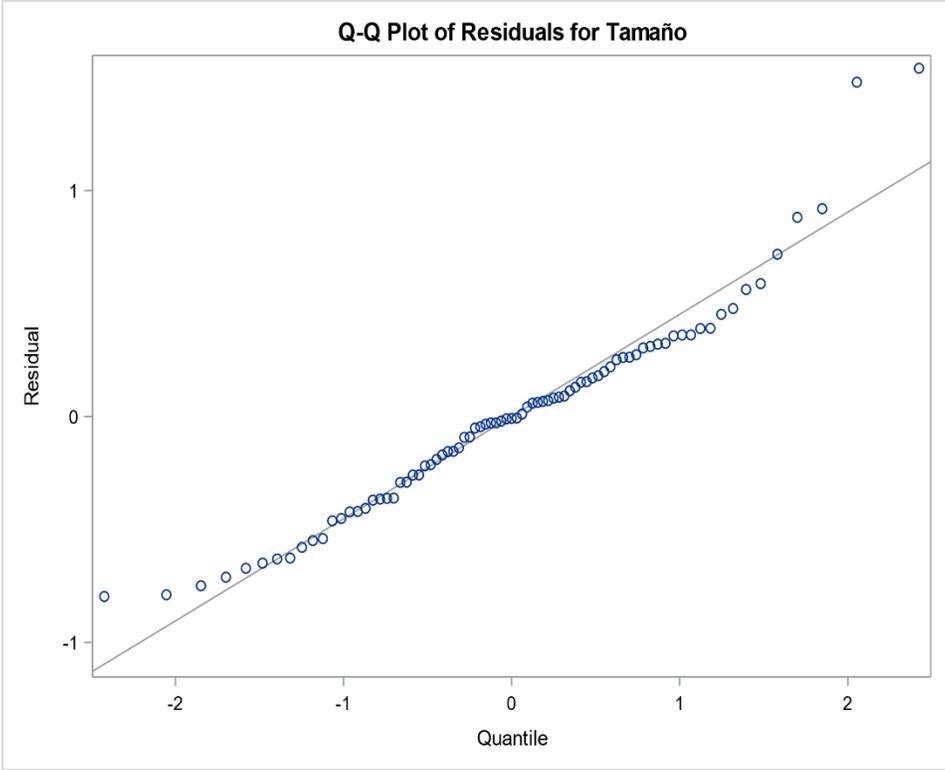
Días	Concentración Clorofila
1	0
3	0,08
5	0,28
7	3,03
10	3,03
12	7,30
18	8,76
26	9,70

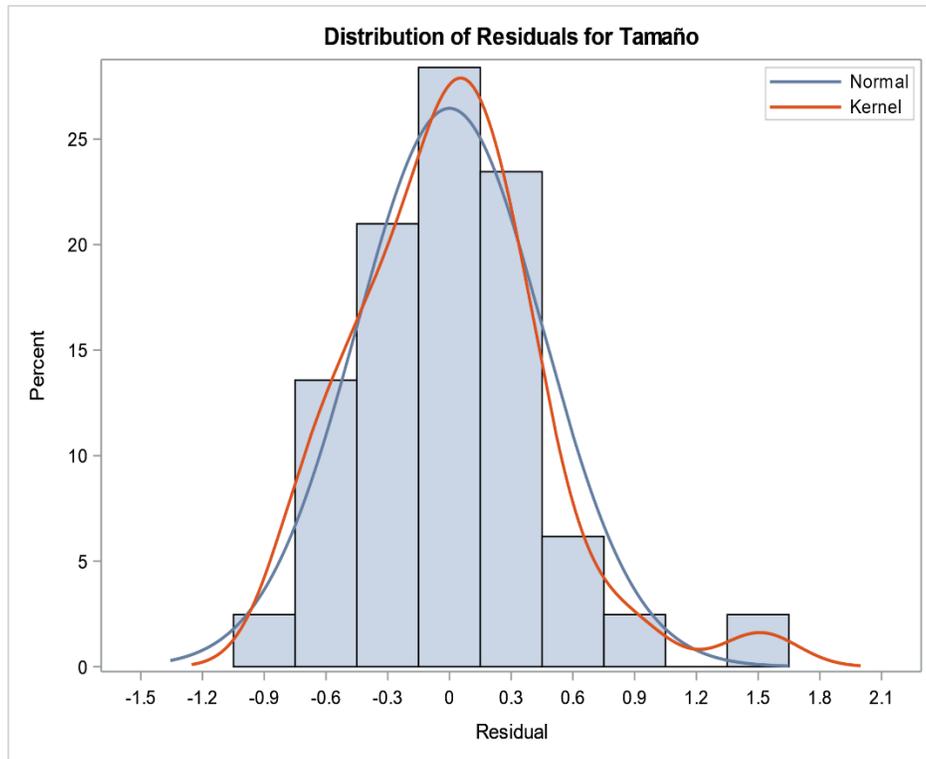
Anexo 5. Análisis de superficie tamaño

Estimated Ridge of Maximum Response for Variable Tamaño					
Coded Radius	Estimated Response	Standard Error	Uncoded Factor Values		
			Alginato	RPM	Cloruro
0,0	3,433778	0,159970	1,150000	150,000000	3,000000
0,1	3,460871	0,160271	1,171223	146,871841	2,950918
0,2	3,490954	0,159548	1,199434	144,698390	2,906148
0,3	3,525423	0,157496	1,231838	143,323284	2,867732
0,4	3,565190	0,154083	1,266053	142,459787	2,834732
0,5	3,610749	0,149544	1,300929	141,900485	2,805568
0,6	3,662367	0,144344	1,336011	141,526271	2,779029
0,7	3,720194	0,139191	1,371126	141,270387	2,754317
0,8	3,784317	0,135077	1,406210	141,094000	2,730914

0,9	3,854793	0,133275	1,441242	140,973376	2,708477
1,0	3,931658	0,135210	1,476217	140,893304	2,686770







Anexo 6. Promedios de tamaño según concentraciones de alginato CaCl_2 y parámetro rpm.

E1	Alginato 0,8%- Cloruro 2%- 100 RPM
E2	Alginato 0,8%- Cloruro 3%- 100 RPM
E3	Alginato 0,8%- Cloruro 4%- 100 RPM
E4	Alginato 0,8%- Cloruro 2%- 150 RPM
E5	Alginato 0,8%- Cloruro 3%- 150 RPM
E6	Alginato 0,8%- Cloruro 4%- 150 RPM
E7	Alginato 0,8%- Cloruro 2%- 200 RPM
E8	Alginato 0,8%- Cloruro 3%- 200RPM
E9	Alginato 0,8%- Cloruro 4%- 200 RPM
E10	Alginato 1%- Cloruro 2%- 100 RPM
E11	Alginato 1%- Cloruro 3%- 100 RPM
E12	Alginato 1%- Cloruro 4%- 100 RPM
E13	Alginato 1%- Cloruro 2%- 150 RPM
E14	Alginato 1%- Cloruro 3%- 150 RPM
E15	Alginato 1%- Cloruro 4%- 150 RPM
E16	Alginato 1%- Cloruro 2%- 200 RPM
E17	Alginato 1%- Cloruro 3%- 200RPM
E18	Alginato 1%- Cloruro 4%- 200 RPM
E19	Alginato 1,5%- Cloruro 2%- 100 RPM

E20	Alginato 1,5%- Cloruro 3%- 100 RPM
E21	Alginato 1,5%- Cloruro 4%- 100 RPM
E22	Alginato 1,5%- Cloruro 2%- 150 RPM
E23	Alginato 1,5 %- Cloruro 3%- 150 RPM
E24	Alginato 1,5 %- Cloruro 4%- 150 RPM
E25	Alginato 1,5% - Cloruro 2%- 200 RPM
E26	Alginato 1,5%- Cloruro 3%- 200RPM
E27	Alginato 1,5%- Cloruro 4%- 200 RPM

	E1	E2	E3		E4	E5	E6		E7	E8	E9
R1	4.15	3.86	4.26	R1	3.83	3.16	3.3	R1	3.8	3.66	3.75
R2	4.14	3.78	3.69	R2	3.74	2.95	3.48	R2	4.02	3.85	3.07
R3	3.90	3.51	3.97	R3	3.81	3.33	3.25	R3	3.81	3.96	2.82
PROMEDIO	4.06	3.72	3.97	PROMEDIO	3.79	3.15	3.34	PROMEDIO	3.8767	3.8233	3.2133

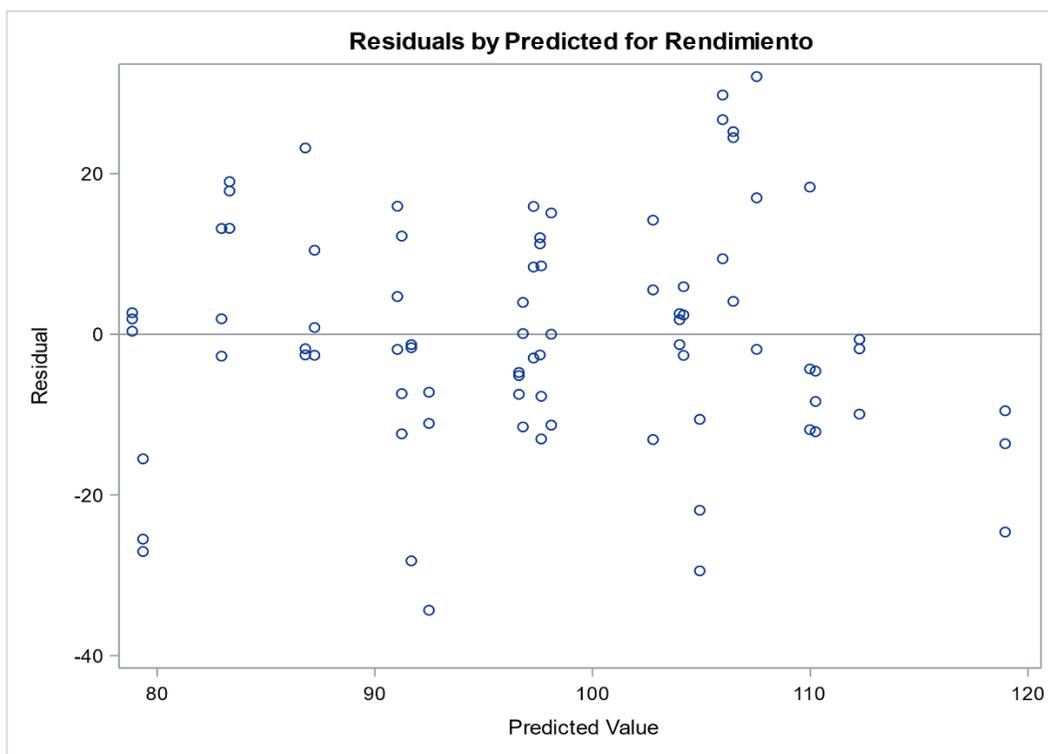
	E10	E11	E12		E13	E14	E15		E16	E17	E18
R1	3.33	3.67	4.26	R1	2.84	3.03	3.43	R1	3.71	2.79	3.39
R2	3.64	3.43	4.39	R2	3.99	3.71	3.18	R2	3.62	2.85	3.38
R3	3.75	3.55	4.15	R3	2.88	3.43	3.52	R3	3.32	3.12	3.49
PROMEDIO	3.57	3.55	4.27	PROMEDIO	3.24	3.39	3.38	PROMEDIO	3.55	2.92	3.42

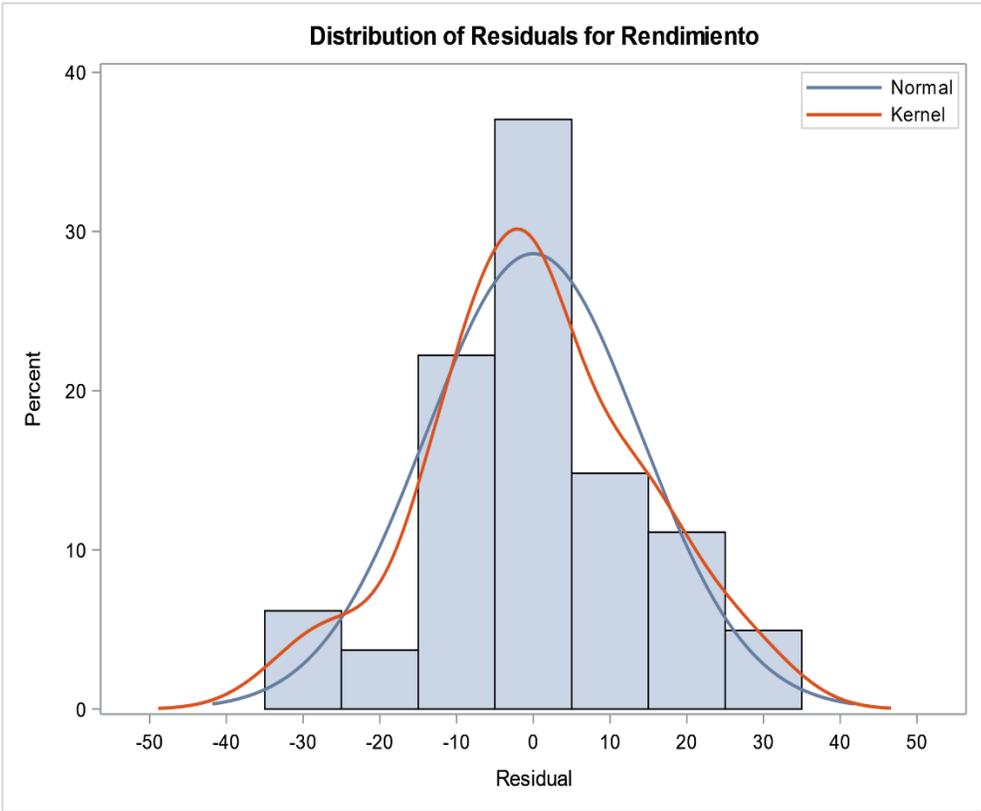
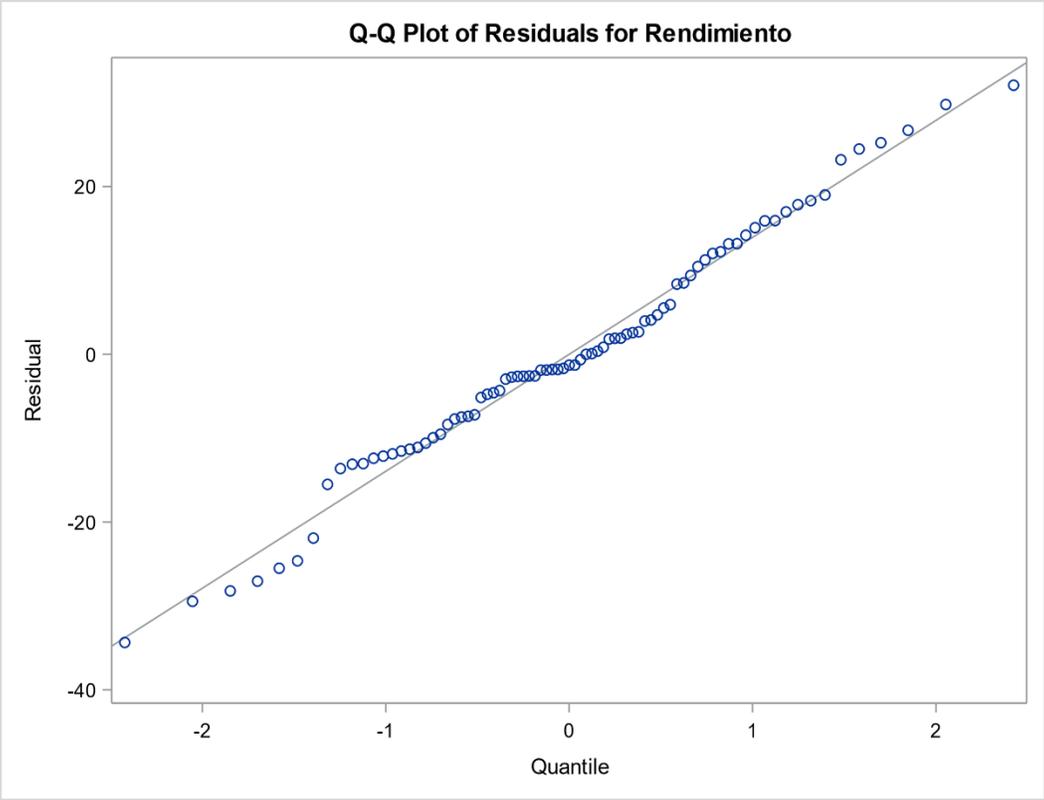
	E19	E20	E21		E22	E23	E24		E25	E26	E27
R1	4.45	3.81	3.99	R1	5.07	5.36	4.07	R1	3.47	3.5	3.57
R2	3.80	3.89	3.91	R2	5.73	3.86	2.97	R2	3.5	3.29	3.78
R3	3.54	4	3.37	R3	4.34	4.8	3.14	R3	3.40	3.61	3.61
PROMEDIO	3.93	3.9	3.76	PROMEDIO	5.05	4.67	3.39	PROMEDIO	3.4567	3.4667	3.653

Anexo 7. Análisis de superficie con el criterio de rendimiento

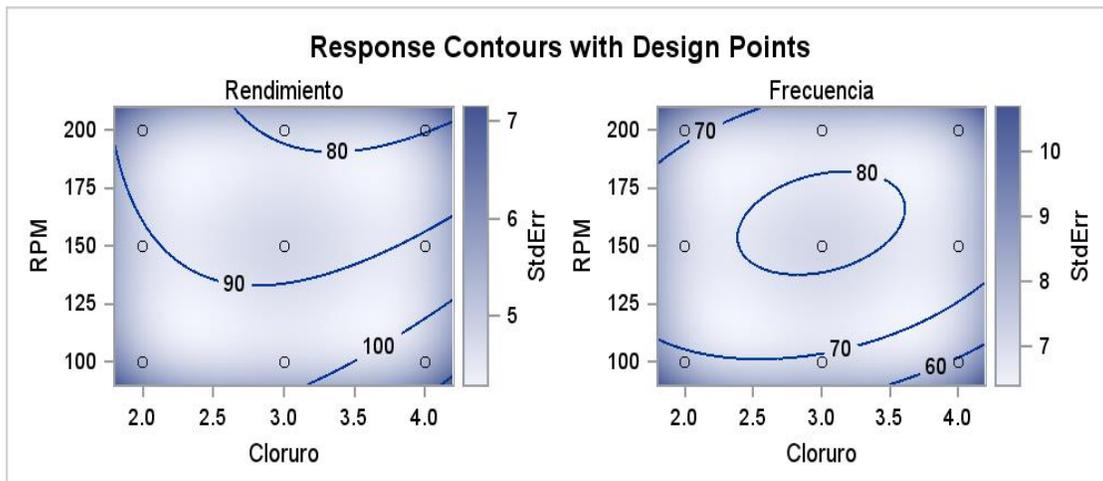
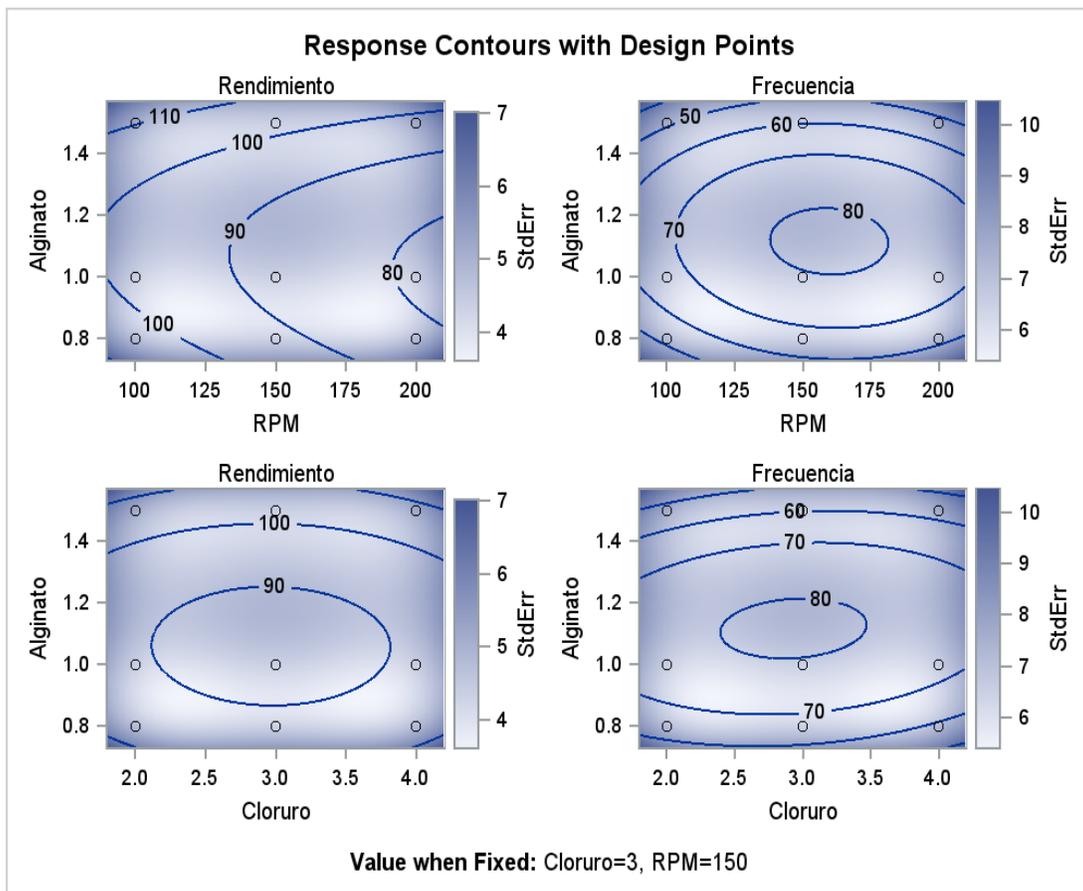
Estimated Ridge of Maximum Response for Variable Rendimiento

Coded Radius	Estimated Response	Standard Error	Uncoded Factor Values		
			Alginato	RPM	Cloruro
0,0	87,590264	4,931461	1,150000	150,000000	3,000000
0,1	88,614109	4,940068	1,170367	145,947406	3,006660
0,2	89,712908	4,917931	1,195645	142,479529	3,019220
0,3	90,912987	4,858912	1,225702	139,753408	3,034943
0,4	92,241042	4,758781	1,259409	137,783111	3,050816
0,5	93,719548	4,620734	1,295300	136,450426	3,064953
0,6	95,364904	4,458182	1,332238	135,595206	3,076763
0,7	97,188172	4,295312	1,369552	135,079619	3,086364
0,8	99,196643	4,167394	1,406904	134,803728	3,094100
0,9	101,395156	4,119749	1,444144	134,699283	3,100327
1,0	103,786990	4,201994	1,481210	134,720124	3,105345





Anexo 8. Resultados superficie de respuesta rendimiento vs frecuencia.



Anexo 9. ANOVA de un factor para NH_4^+ y NO_3^-

Nutriente	F	P
NH_4^+	14,5	<0,01
NO_3^-	63,1	<0,01