

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



**Determinación de la capacidad de una mezcla de microalgas
Chlorella-Scenedesmus aisladas de un humedal artificial en
El Progreso, Guatemala, para la fijación de dióxido de
carbono y limpieza de agua de humedal**

Trabajo de graduación presentado por Andrea Mariel Morales Esquivel para optar al grado
académico de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala,

2024

Determinación de la capacidad de una mezcla de microalgas
Chlorella-Scenedesmus aisladas de un humedal artificial en El
Progreso, Guatemala, para la fijación de dióxido de carbono y
limpieza de agua de humedal

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Determinación de la capacidad de una mezcla de microalgas
Chlorella-Scenedesmus aisladas de un humedal artificial en El
Progreso, Guatemala, para la fijación de dióxido de carbono y
limpieza de agua de humedal

Trabajo de graduación presentado por Andrea Mariel Morales
Esquivel para optar al grado académico de Licenciada en
Bioquímica y Microbiología

Guatemala,

2024

V.ºB.º:

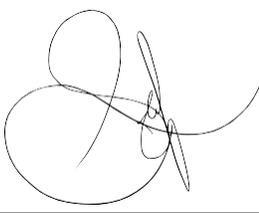
(f) 

Msc. Anna Yunuen Soto Fernández

Tribunal examinador:

(f) 

Msc. Anna Yunuen Soto Fernández

(f) 

Ing. Sofía María Citrón Maegli

(f) 

PhD. Patrizia Lupo
Directora
Departamento de Bioquímica y Microbiología

Fecha de aprobación: Guatemala, 26 de enero de 2024.

Prefacio

La elaboración de este trabajo de graduación surgió del interés del Cementos Progreso por utilizar microalgas en la reducción de emisiones de carbono y producción de biomasa con fines comerciales. El uso de agua residual como alternativa para el cultivo de las microalgas surge del interés por el impacto ambiental y su capacidad de ser utilizadas en el cultivo y producción industrial. Se espera que este estudio funcione como un antecedente para el uso de microalgas nativas de humedal e inspire otra serie de estudios y análisis que permitan comprender más a profundidad las microalgas utilizadas, sus características y potencial uso.

Esta tesis fue posible gracias a Cementos Progreso y al Centro de Estudios en Biotecnología (CEB) quienes en colaboración con el Centro de Estudios Ambientales y Biodiversidad (CEAB) y el Departamento de Biología de la Universidad del Valle apoyaron con el análisis de muestras, préstamo de equipos y donación de reactivos. Quiero darle las gracias a mi asesora Anna Yunuen Soto, por todo su conocimiento, paciencia y apoyo a lo largo de este proyecto, a mis padres, es especial, y a toda mi familia, cuyo apoyo y cariño incondicional me acompañaron en todo momento.

Agradecimientos

Dedico este trabajo de tesis:

A **Jehová Dios**, cuya presencia me ha acompañado a lo largo de toda mi vida siendo la lámpara a mis pies y lumbrera de mi camino, a quien le debo el estar aquí.

A mi madre, **Heydi Xiomara Esquivel Lemus**, quien me ha dotado de su amor incondicional, y cuyo esmero y cuidado me ha permitido alcanzar este logro.

A mi padre, **Iván Alfredo Morales Salazar**, quien ha sido un modelo a seguir, cuyo amor y sacrificio me han formado en la persona que soy hoy.

A mi hermano, **Javier Iván Morales Esquivel**, a quien doy las gracias de tener, cuyo cariño ya tención me han sido una fuente de apoyo constante.

A toda mi **familia** quienes me llenan de satisfacción al poder compartir este logro. Les agradezco su apoyo y atención a lo largo de este proceso.

A todos mis **amigos** con quienes celebro el fin de este proceso recordándoles con cariño mientras empiezo un nuevo capítulo de mi vida.

Índice

Prefacio	I
Agradecimientos	II
Lista de figuras	V
Lista de tablas	VII
Resumen	IX
1. Introducción	1
2. Objetivos	3
2.1. Objetivo general.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. Justificación	4
4. Marco Teórico	6
4.1. Microalgas.....	6
4.1.1 Clasificación.....	7
4.1.2 Cultivo.....	8
4.1.2.1 Sistemas de cultivo.....	12
4.2. Biomasa.....	14
4.1.1 Métodos de extracción.....	15
4.1.2 Fijación de dióxido de carbono.....	18
4.1.2.1 Reacciones de luz.....	19
4.1.2.2 Reacciones de oscuridad.....	21
4.1.3 Cuantificación de dióxido de carbono.....	22

4.1.3.1	Métodos directos.....	23
4.1.3.2	Métodos indirectos.....	25
4.2	Limpieza de aguas.....	26
4.2.1	Metabolismo de nitrógeno.....	27
4.2.2	Metabolismo de fósforo.....	31
5	Metodología	34
5.1	Sitio de estudio.....	34
5.2	Sujetos de estudio.....	34
5.3	Enfoque, diseño y tipo de estudio.....	34
5.4	Tipo y tamaño de muestra.....	34
5.5	Variables.....	35
5.6	Materiales y métodos.....	36
5.6.1	Preparación de medio BG-11.....	36
5.6.2	Cultivo y mantenimiento de las colonias.....	37
5.6.3	Curva de clorofila y biomasa.....	38
5.6.4	Determinación de dióxido de carbono fijado.....	38
5.6.5	Limpieza de agua de humedal.....	40
6	Resultados	42
6.1	Cultivo de microalgas del humedal.....	42
6.2	Determinación de la capacidad de fijación de carbono.....	43
6.3	Regresión lineal para la relación de biomasa y absorbancia.....	44
6.4	Limpieza de agua de humedal y alternativa de medio de cultivo.....	48
7	Análisis de resultados	52
8	Conclusiones	62
9	Recomendaciones	63
10	Referencias	65
11	Anexos	74

Lista de figuras

Figura 1. Fosforilación no cíclica de las reacciones de luz de la fotosíntesis.....	19
Figura 2. Flujo de energía entre los fotosistemas I y II.....	20
Figura 3. Ciclo de Calvin-Benson en las reacciones de oscuridad de la fotosíntesis.....	21
Figura 4. Organización de proteína y enzimas involucradas en la asimilación de nitrógeno en <i>Chlamydomonas</i> como organismo modelo.....	28
Figura 5. Esquema de la regulación negativa de la asimilación de nitrato detectado en <i>Chlamydomonas</i> como organismo modelo.....	31
Figura 6. Esquema general del metabolismo del fósforo en las microalgas.....	32
Figura 7. Morfología microscópica de las colonias de microalgas sanas vistas en microscopio óptico con aumento de 1000x.....	42
Figura 8. Regresión lineal para la concentración de biomasa de las microalgas según su absorbancia.....	46
Figura 9. Regresión lineal para la concentración de dióxido de carbono fijado en la biomasa según la absorbancia de la clorofila a 670nm.....	47
Figura 10. Disminución de contaminantes en cada Erlenmeyer individual.....	50
Figura 11. Comparación de la producción de biomasa en cultivos BG-11 y agua residual..	51
Figura 12. Cromatogramas para el análisis elemental de carbono en biomasa seca	74
Figura 13. Estado inicial de las microalgas al llevar a cabo la experimentación.....	77
Figura 14. Apariencia de las colonias descartadas identificadas como viejas o muertas....	77

Figura 15. Obtención de colonias sanas.....	78
Figura 16. Sistema de aireación proveído por bomba de pecera para cultivos de 50mL.....	78
Figura 17. Contaminación observada en las colonias 20 días de iniciar la incubación.....	79
Figura 18. Controles de microalgas cultivadas en medio BG-11.....	79
Figura 19. Incubación de colonias experimentales realizadas con agua residual en diferentes Erlenmeyer.....	80
Figura 20. Biomasa del cultivo experimental.....	80

Lista de tablas

Tabla 1. Contenido de carbono en diferentes microalgas utilizando equipo analítico.....	23
Tabla 2. Variables involucradas en el proceso de determinación de capacidad de fijación de carbono y limpieza de agua.....	35
Tabla 3. Datos originales reportados por el laboratorio de carbono para el análisis de carbono orgánico para biomasa fresca.....	44
Tabla 4. Promedio y desviación de los duplicados para el análisis de carbono orgánico en biomasa.....	44
Tabla 5. Promedio y desviación de las medidas para biomasa y absorbancia.....	45
Tabla 6. Dióxido de carbono fijado por las microalgas según la cantidad de biomasa producida y absorbancia de clorofila detectada.....	47
Tabla 7. Promedio de reducción y contaminantes en cada Erlenmeyer por separado.....	49
Tabla 8. Promedio e incertidumbre de la reducción de contaminantes e general.....	50
Tabla 9. Eficiencia del agua residual en producción de biomasa según la biomasa de los controles.....	51
Tabla 10. Datos originales para las lecturas de absorbancia y biomasa por triplicado.....	74
Tabla 11. Datos originales para la concentración de contaminantes en agua residual sin tratamiento.....	75
Tabla 12. Datos originales para la concentración de contaminantes en agua residual posterior al cultivo de microalgas.....	75

Tabla 13. Datos originales para la extracción de biomasa en cultivos de BG-11 y agua residual en Erlenmeyer individual.....76

Tabla 14. Promedio de producción de biomasa seca en controles de BG-11 y agua residual.....76

Resumen

Las microalgas corresponden a organismos eucariotas unicelulares, fotosintéticos que debido a su metabolismo son capaces de llevar a cabo tanto el secuestro de carbono como la eliminación de contaminantes del agua, razón por la cual son utilizadas tanto en la industria para la producción de biomasa como en la biorremediación de fuentes de agua. Un ejemplo de esto es su uso en el tratamiento de aguas residuales mediante las microalgas que aprovechan nutrientes presentes en el agua como especies de nitrógeno y fósforo, para la síntesis de macromoléculas como parte de la producción de biomasa.

El objetivo de esta investigación fue determinar la capacidad de una mezcla de microalgas de los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus*, aisladas de un humedal artificial ubicado en Sanarate, El Progreso, para llevar a cabo la fijación de carbono, así como su efectividad en reducir la concentración de contaminantes de nitrógeno y fosforo en agua. Para determinar la capacidad de las microalgas de capturar dióxido de carbono, se llevó un análisis elemental de porcentaje de carbono orgánico en biomasa, con lo cual se determinó la captura de dióxido de carbono mediante estequiometría, obteniendo un 32.29 % en colonias sanas. Por otra parte, se midió la absorbancia de clorofila a 670 nm de las colonias, lo cual se relacionó con la biomasa seca extraída para la generación de un modelo lineal que permitiera la determinación rápida de producción de biomasa y dióxido de carbono fijado; en este se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.77.

La capacidad de biorremediación de las microalgas se determinó al medir la concentración de fosfatos, nitratos y nitritos en agua residual antes y después del cultivo de microalgas para calcular el porcentaje de reducción de estos contaminantes el cual corresponden a, 96.62 %, 92.96 % y 37.86 %, respectivamente. Asimismo, se determinó la

capacidad del agua residual de ser utilizado como alternativa de medio de cultivo para las microalgas cuantificando su producción de biomas y comparándola con la obtenida en cultivos de control de BG-11, la cual presentó un aumento de 138.81 % correspondiente a un total de 238.81 % en base al control. Por lo tanto, se establece el cultivo de microalgas como una opción viable para la reducción de carbono como también para la limpieza de contaminantes en agua de humedal, la cual puede ser utilizada como alternativa para el medio de cultivo.

1. Introducción

El dióxido de carbono se trata de una molécula polar compuesta por un átomo de carbono unido covalentemente a dos de oxígeno el cual es producido de forma natural a partir de la respiración de los seres vivos. Al ser un compuesto gaseoso, se halla presente en la atmósfera donde cumple la función de ser el sustrato principal de la fotosíntesis como la regulación térmica gracias a sus propiedades de gas invernadero. Por miles de años las concentraciones de dióxido de carbono no habían sobrepasado los 300 ppm en la atmósfera, pero desde el principio de la revolución industrial las actividades humanas de quema de combustibles fósiles, deforestación, crianza de ganado y demás han aumentado la tasa de producción de dióxido de carbono llegando a sobrepasar las 400 ppm en 2015 y con 421 ppm para junio del 2023. Actualmente la concentración de dióxido de carbono en la atmósfera es 50 % más alta que a principios del siglo XIX, equivalente al 150 % de su valor durante 1750 (National Aeronautics and Space Administration, s. f.). El efecto de tal desbalance se hace cada vez más presente, según los informes de la Administración Nacional Oceánica y Atmosférica (NOAA por sus siglas en inglés), se calcula que el año 2022 fue el sexto año con las temperaturas más elevadas registradas desde 1880. En ese mismo año, se reportó un aumento en la temperatura global promedio de 13.9°C a comparación de la que existía en el siglo XX.

Con el aumento brusco en la temperatura, los ciclos naturales que regulan el clima y comportamiento de los ecosistemas se ven gravemente en peligro. En respuesta a esta problemática, los expertos han determinado la necesidad de reducir de forma urgente las emisiones de dióxido de carbono en el mundo con el objetivo de frenar el aumento en la temperatura global y mitigar los daños provocados.

Por otra parte, las actividades humanas también han tenido un impacto negativo en otras áreas, particularmente en el tema de la contaminación del agua. El agua se trata de un recurso vital para el mantenimiento de la vida siendo conocido como el solvente universal. Esto lo hace un componente vital para el metabolismo de los organismos, pero, al mismo tiempo lo vuelve extremadamente vulnerable a la contaminación, ya que es afectado por la

cantidad y tipo de sustancias a las que se exponga (Chaudhry y Malik, 2017). Más del 80% del agua regresa a las fuentes de agua donde los contaminantes adquiridos se extienden a los cuerpos de agua afectando la salud de los ecosistemas, presentando una fuente de riesgo para las comunidades. Esto puede provocar grandes problemas en la salud humana, así como en la fauna y ecosistemas a largo plazo. Cuando los residuos de origen agrícola e industrial inundan los cuerpos de agua, llevan un exceso de nutrientes como el nitrógeno y fosfato los cuales promueven la proliferación de algas de forma desmedida. Como resultado, se da el proceso de eutrofización donde grandes concentraciones de algas se acumulan en la superficie provocando la falta de oxígeno en el agua, así como la contaminación debido a la producción de toxinas las que les pueden envenenar tanto a animales y a humanos (Smith, 2009).

Las microalgas son organismos eucarióticos unicelulares capaces de llevar a cabo fotosíntesis oxigénica debido a la presencia de cloroplastos en su interior, los cuales llevan a cabo la captura de dióxido de carbono para su transformación en carbono orgánico. Se estima que son capaces de fijar de 10 a 50 veces más dióxido de carbono que las plantas terrestres representado por un total de 100 Gt de dióxido de carbono convertido a biomasa anualmente, lo que las convierte en uno de los sumideros de carbono más importantes (Onyeaka et al., 2021). Gracias a su metabolismo han demostrado ser capaces de reducir la contaminación de las fuentes de agua mediante la remoción de nutrientes como metales pesados, patógenos y contaminantes de preocupación emergente (Salgado et al., 2022). Por lo tanto, el cultivo de microalgas para la reducción de emisiones de carbono y su uso en la biorremediación consiste en una alternativa viable y prometedora que, a su vez, tiene la ventaja de generar biomasa la cual consiste en una materia prima de gran interés industrial debido a su aplicaciones (Ummalyma et al., 2020).

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Determinar a escala de laboratorio la capacidad de una mezcla de microalgas *Chlorella* y *Scenedesmus* para la fijación de dióxido de carbono y la reducción de contaminantes de nitrógeno y fósforo en aguas residuales.

2.2 Objetivos específicos

- Generar una curva de calibración que relacione la absorbancia de la clorofila a 670 nm con los gramos de biomasa seca que se obtengan de una misma colonia de microalgas.
- Cuantificar la cantidad de dióxido de carbono fijado por unidad de peso seco en la biomasa de las colonias de microalga utilizando el método de cromatografía de gases para la detección de carbono orgánico.
- Determinar la capacidad de la mezcla para reducir contaminantes de nitrógeno, y fósforo en aguas residuales comparando la concentración antes y después del cultivo con microalgas.
- Establecer la capacidad de usar agua de humedal como alternativa de medio BG-11 para el cultivo de microalgas comparando la producción de biomasa seca que exhiban los organismos en ambos medios.

3. Justificación

Una de las problemáticas más importantes de este siglo y que más atención ha adquirido en años recientes es la necesidad de llevar a cabo esfuerzos colectivos por mitigar los daños producidos al planeta debido a la actividad humana. Dos de los enfoques más relevantes la disminución de las emisiones de carbono y la conservación de las fuentes de agua dulce. Por una parte, se busca frenar el calentamiento de la temperatura global a un límite de 1.5°C sobre las condiciones preindustriales a partir de la reducción de gases invernadero en la atmósfera. Para ello, 192 países han firmado los Acuerdos de París y se han comprometido en reducir sus emisiones. Lograr dicho objetivo requiere de una inversión en infraestructura e innovación ya que se requieren nuevas alternativas que nos permitan aprovechar todas las opciones disponibles en capturar dióxido de carbono (El Acuerdo de París | CMNUCC, s. f.).

Por otra parte, la contaminación del agua representa un peligro no menos inminente ya que del 70 % de la cobertura acuática solo el 2.5 % es apta para consumo y alrededor del 1 % es accesible (Owusu et al., 2016). En Guatemala se tiene un grave problema con respecto al manejo del agua, ya que alrededor del 90 % presenta índices altos de contaminación, lo que, en gran medida, se relaciona a la falta de control y manejo de aguas residuales provenientes de los sectores agrícola, industrial y doméstico que se vierten nuevamente en las fuentes de agua (Méndez, 2023). Esto genera un grave desbalance en los ecosistemas, ya que no solo se liberan sustancias tóxicas incapaces de biodegradarse, sino que aun los compuestos orgánicos representan una fuente de nutrientes que promueven la proliferación excesiva de algas. Estas generan el fenómeno de eutrofización el cual es una grave amenaza para los ecosistemas acuáticos, como también, la formación de compuestos tóxicos que al ser ingeridos provocan graves problemas de salud (Smith, 2009).

El objetivo de esta investigación fue determinar de forma cuantitativa la capacidad de un cultivo mixto de microalgas *Chlorella* y *Scenedesmus* para llevar a cabo tanto el secuestro de carbono como la limpieza de contaminantes de nitrógeno y fosfato inorgánico

en el agua. Esto es posible debido a que su metabolismo es capaz de llevar a cabo la fotosíntesis oxigénica, la cual utiliza la luz para dar la transformación de dióxido de carbono en moléculas orgánicas (Tebbani et al., 2020). Esto lo convierte en una solución viable para la reducción de dióxido de carbono atmosférico. Se analizó su potencial en la limpieza de agua residual debido a que también son capaces de utilizar especies de nitrógeno y fósforo para la síntesis de macromoléculas por lo que pueden aprovechar compuestos como nitratos, nitritos y fosfatos libres los cuales representan los contaminantes más comunes en agua, permitiendo llevar a cabo la biorremediación de cuerpos de agua. En el caso de los organismos mencionados, ya han sido estudiados para su aplicación tanto en fijación de dióxido de carbono como limpieza de aguas dando resultados favorables en ambos casos (Chacón et al., 2004).

Esta investigación es por lo tanto una opción viable debido a que se tiene certeza de que los organismos escogidos pueden llevar a cabo los procesos que nos interesan. Sin embargo, los organismos escogidos provienen de un humedal artificial el cual es por naturaleza una matriz compleja por lo que las muestras obtenidas no corresponden a un cultivo puro, sino que se tiene una mezcla de dos géneros distintos sin conocer de forma clara las especies que los conforman. Por ello, se vuelve necesario llevar a cabo una investigación exploratoria que determine las características más importantes del uso de microalgas *Chlorella-Scenedesmus* nativas de humedal en la captura de dióxido de carbono, así como su efecto en la calidad del agua y productividad de biomasa.

4. Marco teórico

4.1 Microalgas

Las microalgas se definen como organismos unicelulares los cuales debido a la presencia de pigmentos fotosintéticos en su interior son capaces de llevar a cabo la producción de biomasa a partir de energía lumínica y dióxido de carbono (CO₂). Son consideradas responsables de llevar a cabo el 70 % de la producción global de oxígeno, lo cual viene acompañado con la mayor tasa de producción de biomasa (Messa Ruiz, s. f.). Son capaces de crecer en un amplio rango de ambientes que incluye lagos, ríos, estanques, océanos e incluso aguas contaminadas. Su versatilidad se debe en gran medida a su capacidad de adaptarse a una gran cantidad de condiciones en términos de temperatura, salinidad, valores de pH y demás (Barsanti et al., 2008). Aunque el término microalgas no tiene valor taxonómico, ya que se conforma de un grupo polifilético de organismos, se estima que existen alrededor de 100,000 especies de microalgas con diámetros entre 0.2 y 2 μm , compuestas principalmente de proteínas, carbohidratos y lípidos cuya, proporción varía según la especie y las condiciones de cultivo en las que se encuentren (Mathieu-Rivet et al., 2020).

Dentro de las microalgas se distinguen dos grupos: procariotas también denominadas cianobacterias, y las eucariotas. Ambas llevan a cabo fotosíntesis, sin embargo, poseen diferencias importantes entre sí. La más evidente es la presencia de organelos definidos en los eucariotas, pero no en los procariotas, por otra parte, las cianobacterias son capaces de fijar nitrógeno lo cual no ocurre en las microalgas eucariotas (Abed et al., 2009). Aunque ambas presentan un gran potencial para su uso en biotecnología, las microalgas eucarióticas conforman una parte importante de las aplicaciones debido no solo a su capacidad de fijar CO₂, sino también a la amplia gama de bioproductos que son capaces de sintetizar, desde antibióticos, alguicidas, toxinas, reguladores de crecimiento y otros compuestos activos. (Katrçolu et al., 2004)

Por otra parte, la biomasa generada por las microalgas representa una fuente considerable de materia prima con aplicación en otras industrias, un ejemplo claro es la

posibilidad de utilizar los lípidos para la producción de biodiésel, lo cual es considerado como la alternativa más posible de reemplazar por completo el diésel de origen fósil (Tan et al., 2011). De igual forma, otra gran aplicación es su uso en la biorremediación, siendo organismos acuáticos, las microalgas han sido utilizadas en la limpieza de agua debido a su capacidad de hacer uso de los contaminantes presentes como una fuente de nutrientes para su crecimiento. Hay reportes de su capacidad de eliminar compuestos tóxicos como herbicidas, pesticidas y metales pesados, como el cadmio y mercurio, gracias a su capacidad de bioacumular compuestos tóxicos sin afectar su actividad biológica (Romero et al., 2022).

4.1.1 Clasificación

La naturaleza de las microalgas es polifilética por lo que taxonómicamente no representa una verdadera clasificación. Por ello, existen diversas formas de agrupar a los organismos según sus características físicas como por sus relaciones genéticas (Parra, 2006). Dentro de las especies eucarióticas de microalgas la mayoría se distribuyen en dos supergrupos: los linajes de Archeplastida y Cromoalveolata, los cuales surgieron a raíz de una serie de eventos de endosimbiosis llevando a varios organismos fotosintéticos (Gould et al., 2008). Un primer evento de endosimbiosis generó que una cianobacteria fuera absorbida por una célula eucariota, lo que dio origen a la presencia de plastidios primarios en los tres linajes fotosintéticos: *Chlorophyta*, *Rhodophyta* y *Glaucophyta*. Estos tres linajes conforman el supergrupo de los Archeplastidia, llamado el “linaje verde”. (Rodríguez- Ezpeleta et al., 2005)

Por otra parte, un segundo evento de endosimbiosis dio origen al supergrupo de *Chromoalveolata*, donde células eucariotas con plásmidos primarios fueron nuevamente absorbidos por una segunda célula eucariota, lo que resultó en un segundo linaje donde la fotosíntesis es llevada a cabo en plásmidos secundarios. Este linaje se distingue por haber tenido a una célula de *Rhodophyta* como célula huésped (Mathieu-Rivet et al., 2020).

Otra forma de clasificar a las microalgas es según los pigmentos fotosintéticos que poseen, de acuerdo con la presencia o ausencia de estos las microalgas pueden clasificarse

en tres grandes grupos: *Chlorophytes* o algas verdes (poseen clorofila a y b), *Rhodophytes* o algas rojas (son aquellas con clorofila a y ficobilinas) y *Chromophytes* o algas pardas (poseen clorofila a y c) son a su vez aun grupo polifilético dividido en cuatro taxones: *Haptophytas*, *Dinoflagelados*, *Criptophytas* y *Xanthophytas* (Ben Ali et al., 2001).

Por otra parte, la clasificación filogenética tiene en cuenta la ascendencia de los organismos al realizar árboles filogenéticos para explicar la relación entre cada uno de los microorganismos según características morfológicas como también datos moleculares. Para el año 2000 se propuso una clasificación de las algas en 12 grupos: cianobacteria, algas rojas, algas verdes, euglénidos, algas verde-amarillo, crisofitas, haptofitas, sinurofitas, diatomeas, dinoflagelados, criptomónadas y algas pardas. Las secuencias de ADN han sido la base principal para las diferentes clasificaciones propuestas, sin embargo se sigue teniendo relaciones inconclusas entre algunos clados (Ayala M., 2016).

4.1.2 Cultivo

El cultivo de las microalgas debe tomar en cuenta varios factores asociados a nutrientes y condiciones para asegurar la proliferación y rendimiento. Aunque ciertas especies pueden tener requerimientos particulares, la mayoría de las microalgas son capaces de adaptarse a una amplia gama de condiciones, las cuales, a su vez, dependiendo de cómo se manipulen, determinarán las características y propiedades de los cultivos favoreciendo un fenotipo de interés.

Entre los factores más importantes a tomar en cuenta para un cultivo de microalgas están los siguientes:

- **Luz:** la energía lumínica es uno de los factores más importantes a tomar en cuenta para el cultivo de microalgas debido a su naturaleza fotosintética. Cada especie cuenta con una tasa de crecimiento específica que se correlaciona proporcionalmente con la intensidad de luz hasta llegar a un punto de saturación (Park et al., 2011). Una vez se pasa de este límite ocurre un efecto de fotoinhibición, un proceso de desactivación de la maquinaria fotosintética como un mecanismo de

protección contra la concentración elevada de intermediarios fotosintéticos que puedan dañar a las células (Xue et al., 2011). Dicho efecto puede reducirse con cultivos más densos que otros más diluidos gracias al efecto de autosombreado en donde capas superiores dan sombra a las inferiores disminuyendo la intensidad lumínica que impacta en estas.

- **Temperatura:** la temperatura óptima para las microalgas suele estar entre los 15°C y 30°C. Por debajo de 15°C, el crecimiento de las microalgas será lento y poco efectivo, mientras que por arriba de 30°C será inhibido. Sin embargo, ciertas especies son capaces de soportar rangos de temperatura mayores o inferiores, un claro ejemplo es el género *Chlorella* el cual tiene un rango de temperatura de 10°C a 39°C donde las temperaturas más bajas mejoran la producción de lípidos mientras que las más altas aceleran el crecimiento celular. Por otra parte, especies del género *Scenedesmus*, llegan a su máxima actividad fotosintética a temperaturas cercanas a 35°C o no presentan diferencias significativas en comparación con su crecimiento a temperaturas de 10°C a 30°C (Ruiz-Martínez et al., 2016).
- **Dióxido de carbono y pH:** la mayoría de las microalgas tiene su rango óptimo entre los valores de pH de 7 a 9, aunque algunas favorecen condiciones más ácidas o alcalinas. Cabe mencionar que dicho parámetro está determinado en gran medida por la concentración de dióxido de carbono en el medio, ya que al ser diluido, establece un equilibrio químico entre todas las formas de carbono en el agua (CO_2 , H_2CO_3 , HCO_3^- , CO_3^{2-}). Una alta concentración de dióxido de carbono en el medio puede llevar a la acidificación de las condiciones lo que daría como resultado la inhibición del crecimiento celular. Aunque se favorecen condiciones neutras, ciertas especies son capaces de crecer en rangos más altos o bajos (Tebbani et al., 2020). El dióxido de carbono, junto con la energía lumínica, se consideran reactivos limitantes para el crecimiento de las microalgas por lo que, conforme se da la fotosíntesis, las concentraciones de este disminuyen junto con el pH.
- **Nitrógeno:** la disponibilidad de nitrógeno es esencial para la división celular activa ya que es vital para la síntesis de las estructuras celulares representado un 7 % de la biomasa seca de las mismas. Este nutriente puede ser de origen orgánico, como la urea, ó inorgánico, como el nitrato, (NO_3^-), nitrito (NO_2^-) amoníaco (NH_4^+). Una

falta de nitrógeno reduce la proliferación y producción de biomasa mientras que promueve la acumulación de lípidos como ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácidos grasos poli-insaturados (PUFA) (Xu et al., 2001). Esto se debe a que las condiciones pobres en nitrógeno reducen la síntesis de proteínas, lo que a su vez, disminuyen el contenido de la membrana celular del tilacoide, activan las acilo hidrolasas y estimulan la hidrólisis de fosfolípidos, lo que resulta en un incremento del contenido celular de acyl-CoA graso (Yang et al., 2018).

- **Fósforo:** el fósforo consiste, junto con el nitrógeno, un nutriente esencial para las microalgas ya que interviene en procesos metabólicos como la transferencia de energía, la transducción de señales y fotosíntesis. Condiciones nutricionales desfavorables para el crecimiento, como lagos eutrofizados, tienden a generar mayor acumulación de fósforo en las microalgas; factores ambientales tales como luz, *shocks* osmóticos y disponibilidad de nutrientes también tienen un efecto en la tasa de asimilación de fósforo (Chu et al., 2013). Gracias a una enzima conocida como fosfatasa, las algas son capaces de asimilar tanto las formas orgánicas como inorgánicas del fósforo por medio de la hidrólisis (Corrales Ramírez, MSc et al., 2014).
- **Microelementos:** además de los nutrientes principales, las microalgas requieren de otros compuestos orgánicos e inorgánicos para su crecimiento, tales como azufre, hierro, magnesio, potasio, sodio y los denominados oligoelementos (cobalto, magnesio, zinc, cobalto, molibdeno, etc). Estos generalmente corresponden a cofactores enzimáticos que permiten la actividad de enzimas involucradas en la asimilación de nutrientes, lo que repercute tanto en la tasa de crecimiento como en el mantenimiento de la integridad celular. La deficiencia de azufre provoca la inhibición de síntesis de proteínas y de la fotosíntesis; la falta de hierro genera una disminución de la densidad y tamaño de las células, como también, una inhibición de la síntesis de proteínas y lípidos. Al ser también un catalizador en la síntesis de clorofila, su ausencia repercute en la capacidad de las microalgas de llevar a cabo la fotosíntesis. El magnesio es parte fundamental de la clorofila, ya que se encuentra como átomo central en su estructura y permite el flujo de electrones para la síntesis de ATP (K. Chen et al., 2017). El molibdeno, por otra parte, se relaciona con la

absorción de nitrógeno a nivel celular, por lo que su ausencia puede inhibir o frenar el crecimiento celular de las algas (Tebbani et al., 2020).

- **Agitación:** la agitación se refiere a un movimiento mecánico impartido en los cultivos de micro- alga con el objetivo de mantener la homogeneidad y mejorar la tasa de transferencia gas-líquido para la difusión de dióxido de carbono en el medio. Por lo tanto, es un factor crítico para la captación de dióxido de carbono como para la proliferación de la biomasa. Una agitación baja dificulta el acceso de las microalgas a la luz debido al efecto de “autosombra” donde las mismas células bloquean el acceso de la luz a otras. Una agitación adecuada asegura la homogeneidad de los parámetros de pH, temperatura, fuente de carbono y nutrientes, lo que evita la sedimentación de las células, ya que, la falta de agitación provoca que estas empiecen a precipitarse generando estancamiento en ciertas zonas donde se promueve la muerte celular debido a la acumulación de sustancias tóxicas. Por lo tanto, es un factor crítico para considerar en el diseño de cultivo para estos organismos.
- **Salinidad:** es uno de los factores más importantes, ya que tiene un efecto en el crecimiento y metabolismo de las microalgas siendo capaz de alterar su composición bioquímica. La salinidad está relacionada al estrés osmótico por lo que una alta salinidad induce la saturación de ácidos grasos, aumentando la producción de biodiésel. Las algas marinas suelen ser más tolerables a la salinidad en comparación a las de agua dulce, aunque en general la mayoría de las especies crecen mejor con salinidad ligeramente por debajo a la de su hábitat nativo. Una salinidad por arriba del 35 %, equivalente al agua de mar, conduce a una reducción de la tasa de crecimiento debido a la eficiencia fotosintética como a la respiración celular.

4.1.2.1 Sistemas de cultivo

Una vez se han tomado en cuenta todos estos factores, se procede a realizar el diseño del sistema de cultivo para el crecimiento de las microalgas. Dada la diversidad de especies y requerimientos específicos de cada una, los sistemas de cultivo deben tomar en cuenta todas las variables asociadas y adaptarse de forma específica a estos. Existen dos categorías principales para clasificar los sistemas de cultivo: abierto y cerrado.

Sistemas de cultivo abierto En los sistemas abiertos, la biomasa se encuentra expuesta al medioambiente, lo cual afecta las condiciones de cultivo, siendo más difíciles de controlar. Aun así, suelen ser el sistema de cultivo más común debido a su facilidad de construcción como lo conveniente de su manejo (Martínez 2008). Este tipo de sistemas incluye tanto los cuerpos de agua naturales, lagunas y estanques, como también versiones artificiales, los cuales se construyen tomando en cuenta factores como tamaño, profundidad, sistema de agitación, etc (Posten, 2009). Existen tres tipos de sistemas abiertos usados a escala industrial

- **Ecosistemas naturales** Estos se refieren a cuerpos de agua originales utilizados para el cultivo de microalgas. Son los más accesibles en términos de costos y construcción debido a que no requieren de mayor inversión en infraestructura. Sin embargo, tienen varias desventajas debido a la dificultad de controlar las condiciones de cultivo, incapacidad de controlar agitación, transferencia ineficiente de gases, vulnerabilidad a las condiciones climáticas, baja accesibilidad a la luz y riesgo elevado de contaminación. Sin embargo, son menos exigentes desde el punto de vista técnico, ya que son de fácil construcción y operación, además de tener alta durabilidad.
- **Cuencas circulares** Se trata de un depósito circular con agitación mecánica de pivote central, muy utilizado en procesos de limpieza de aguas residuales. Su uso se limita bastante debido a la ineficiencia del sistema de agitación para cuencas grandes debido al alto consumo de energía como de instalación.
- **Cuencas *raceway*** Se da por excavación de un estanque con profundidad de 15 a 30 cm dividido por un muro central formado por dos canales. En este, el cultivo es homogenizado por varias técnicas: ruedas de paletas, hélices ó bombas. Es uno de

los más rentables y utilizado para tratamiento de aguas residuales reportando disminución de costos por requerimientos nutricionales y dando una alta concentración celular como productividad por hectárea (Tebbani et al., 2020).

Sistemas de cultivo cerrado Los sistemas cerrados, también conocidos como fotobiorreactores, buscan aislar las células del cultivo del resto del entorno a diferencia de los sistemas abiertos, lo que permite el control de los parámetros evitando varios de los problemas presentados por los sistemas abiertos. Otra de sus ventajas es la posibilidad de cultivar microalgas, y mezclas de estas, a grandes concentraciones obteniendo alta densidad celular ó hasta ultra alta densidad celular (Contreras-Flores et al. 2003). El diseño de estos fotobiorreactores es variado tanto en su geometría, como en su sistema de agitación y material de construcción. En todos los casos, se utiliza algún material transparente que permita la exposición de las células a la luz. De igual forma, dentro de la variantes utilizadas se reconocen dos estilos principales: planos y tubulares.

Fotobiorreactores planos Consisten en paneles de forma rectangular transparentes dentro de los cuales circula una capa fina de cultivo. Existen diferentes geometrías para este diseño: vertical, horizontal e inclinada. Dentro de sus ventajas está una relación alta entre la superficie y el volumen, lo que resulta en un paso bajo de luz como también en una alta calidad de transferencia de gas. Sin embargo, esta construcción es difícil de diseñar y tiene las desventajas de tener fluctuaciones de pH y temperatura asociadas (B. Wang et al., 2012).

Fotobiorreactores tubulares Son de los más frecuentes y consisten en tubos transparentes dispuestos de manera horizontal, vertical o helicoidal. Se caracterizan por hacer que el cultivo pase a través de un tubo transparente, con un flujo turbulento, para evitar el asentamiento de células en el fondo o la generación de zonas oscuras (Chang et al., 2017). Dependiendo de la orientación del tubo, la circulación se hará por aireación si la columna es vertical o por bombas si es horizontal. Dentro de las variantes más importantes se encuentran las siguientes:

- **Reactor de eje agitado:** este tipo se utiliza generalmente para la acuicultura. Se trata de un tanque con un sistema de agitación de eje accionado por motor o barras

magnéticas. Es de fácil instalación y mantenimiento, aunque con baja relación superficie-volumen.

- **Reactor columna de burbujas:** la agitación se realiza mediante fase gaseosa por pequeñas burbujas lo que le da una relación superficie-volumen bastante alta. Tiene un costo bajo con transferencia de calor y masa considerable.
- **Reactor tipo *air-lift*:** se trata de un cilindro que posee dos zonas específicas, una llamada *riser*, donde se da la difusión de la mezcla de gases y otra llamada *downcomer*, donde no se suministra gas. La diferencia de peso entre las zonas con aireación y sin aireación hace que se dé un movimiento natural en la fase líquida mientras que el burbujeo del gas asegura la agitación del medio de cultivo (Tebbani et al., 2020).

4.2 Biomasa

La biomasa se define como la materia viva conformada por la conglomeración de células conforme crecen y se dividen en un medio de cultivo. Se conforma en un 28-70 % de proteínas, 10-20 % lípidos y 10-50 % carbohidratos (Hemaiswarya et al., 2011). La proporción exacta depende tanto de la especie como de las condiciones de cultivo en las que se haya producido, ya que ciertas condiciones de temperatura, pH y nutrientes pueden inducir a las microalgas a acumular más de un tipo de macromolécula de acuerdo al interés del experimento.

Debido al alto porcentaje de lípidos que tiene la biomasa de algunas especies de microalgas, han sido consideradas para la producción de biocombustibles. Se calcula que las microalgas son capaces de producir en promedio hasta 58,700 L/ha de aceites capaces de ser usados en biocombustible produciendo una mayor cantidad de lo obtenido de cultivos convencionales como la canola (Xin et al., 2010). Siendo la biomasa un compuesto rico en proteínas y carbohidratos, se ha considerado como una fuente de nutrientes para consumo ya que puede ser utilizado como una fuente de nitrógeno y fósforo en ganado para la producción de bio-hidrógeno y metano (Sankaran et al., 2018). Aunque la producción de biomasa es valiosa por sí misma gran parte del interés en el uso de microalgas se deriva de

su capacidad para fijar dióxido de carbono lo que puede ser utilizado para reducir su concentración atmosférica de este.

4.2.1 Métodos de extracción

El proceso de producción de biomasa de microalgas contiene tres fases principales: cultivo, cosecha o recolección y procesamiento. De estos tres procesos la extracción de la biomasa se considera la más desafiante debido a su alto costo, que puede llegar a ser un 20-30 % del costo de producción total, como de varios factores asociados que incluyen el tamaño de las microalgas ($<30\ \mu\text{m}$), baja concentración debido a la naturaleza de crecimiento de las microalgas ($<1\text{g/L}$), propiedades electronegativas de la membrana, tasa de crecimiento y la relación entre las condiciones de cultivo y la tasa de crecimiento (Zamalloa et.al, 2011). El propósito de la cosecha o recolección es remover la mayor cantidad de medio de cultivo de la biomasa de microalgas para facilitar el proceso de extracción de compuestos derivados. Por lo tanto, la selección del método de cosecha se basa en la naturaleza de la especie, densidad y tamaño de la célula, condiciones del producto final y reutilización del medio (Deepa et al., 2023). Por ello, varios métodos, tanto químicos como mecánicos, se han empleado tanto para facilitar el proceso como mejorar su rendimiento. Generalmente, se emplea una mezcla de diferentes técnicas que en conjunto mejoran el rendimiento del proceso. Entre las técnicas más comunes y de mayor uso están las siguientes:

- **Electrocoagulación:** se trata de una técnica en la que se hace uso de una combinación de cationes metálicos con células de microalgas cargadas negativamente, las cuales son atraídas hacia el ánodo por movimiento electroforético. Es una técnica bastante costo-efectiva que además es amigable con el ambiente y altamente selectiva. Tiene, sin embargo, la desventaja del costo de la electricidad para llevar a cabo el proceso y el cambio periódico de los materiales del ánodo. Es influenciada por diferentes factores, como el material del electrodo, densidad celular, temperatura, pH y presencia de otros iones coexistentes (Mollah et al., 2004).
- **Floculación:** esta ocurre cuando las partículas sólidas en una suspensión colisionan y se adhieren una a la otra. Es una técnica que funciona bien para separar células

de microalgas de su medio de cultivo (L. Chen et al., 2013). El principio del funcionamiento de la floculación está basado en la premisa de que las partículas de microalgas tienen cargas eléctricas idénticas por lo que se repelen entre sí. Los floculantes actuarían de manera que su naturaleza alcalina neutraliza la carga de la superficie de las células, lo que permitiría la formación de flóculos mucho más grandes (Soomro et al., 2016). Existen tres tipos principales de floculación: química, biológica y auto floculación.

- **Floculación química:** en esta, se requiere el uso de aditivos para inducir la conglomeración de las células. La mayoría corresponde a químicos inorgánicos con cationes multivalentes como el sulfato de aluminio, el cloruro y sulfato férricos. La efectividad de estos compuestos depende de su electronegatividad y solubilidad, ya que una sal más electronegativa generará floculación más rápido. Aunque las sales inorgánicas son efectivas no son amigables con el ambiente y generan mayor cantidad de sólidos disueltos. La eficiencia es altamente afectada por la dosis de polímeros, con bajas dosis resultando en uniones débiles con flóculos sueltos, mientras que altas dosis pueden reducir el potencial de unión debido a la intervención electrostática (Deepa et al., 2023).
- **Autofloculación:** se refiere a un proceso natural que no requiere de la adición de floculantes agregados y sucede en respuesta a alteraciones ambientales tales como cambios en la concentración de nitrógeno, pH y oxígeno disuelto. La gravedad provee un método natural de floculación, el cual es rápido, de bajo costo, simple y con menor disrupción a las células que en la centrifugación. Este proceso se induce en pH elevado con valores por arriba de 10, lo cual puede ser logrado por compuestos como el fosfato de calcio, hidróxido de calcio, magnesio, sodio y potasio. Se trata de un proceso con potencial de ser eco-amigable, con la desventaja de que es lento y variable por lo que no suele ser eficiente para su aplicación comercial (Singh & Patidar, 2018).
- **Biofloculación:** se trata de la floculación inducida por la secreción de biopolímeros ya sea por las células de microalgas bacterias. Esta técnica se logra ya sea por la adición de biofloculantes directamente o por el co-cultivo con organismos productores. Un ejemplo de esto son los polímeros orgánicos de origen microbiano,

siendo uno de los más comunes el quitosano el cual ha demostrado mejorar la eficiencia del proceso siendo una opción segura y de bajo costo. (Singh & Patidar, 2018) Algunos hongos poseen hifas cargadas positivamente que pueden interactuar con la superficie, cargada negativamente, de la célula causando la floculación, un ejemplo de esto es el uso de *Aspergillus* sp. como alternativa al uso de floculantes convencionales (Deepa et al., 2023).

- **Filtración:** consiste en una técnica donde un medio permeable restringe el movimiento de partículas sólidas mientras un líquido logra pasar. Existen diferentes tipos de filtración que pueden aplicarse a las microalgas incluyendo: filtración magnética, filtración al vacío, filtración a presión, filtración de flujo tangencial y filtración de flujo atravesado. Se trata de una técnica que posee varias ventajas para la cosecha de microalgas, tales como alta eficiencia, baja inversión de energía, bajo costo y reciclaje de medio (Soomro et al., 2016). Existen diferentes técnicas de filtración que incluye: microfiltración, ultrafiltración, filtración al vacío, filtración de presión, etc, donde todas pueden ser aplicadas para la obtención de biomasa. El uso de membranas es vital para la técnica de filtración donde el tamaño de poro determina en gran medida el tipo de filtración y categoriza la filtración como microfiltración (100-10,000 nm), ultrafiltración (2-100 nm) o nanofiltración (0.5-2nm). El estancamiento es el problema más grande que puede ocurrir ya que conforme se las partículas sólidas, microalgas y demás obstruyen los poros de la membrana lo que provoca la reducción en la velocidad de flujo (Deepa et al., 2023). Debido a esto, la filtración no suele ser utilizada para la obtención de biomasa debido a la pérdida de biomasa recuperada, cambio constante de membrana y costo de energético del bombeo.
- **Flotación:** se trata de un proceso en donde aire o burbujas de gas se utilizan para acarrear la materia suspendida a la superficie de un líquido donde pueden ser recolectados por roce. El transporte depende de varios factores como tamaño, posibilidad de colisión y adhesión. Suele requerir el uso de floculantes, y generalmente, está precedido por floculación, también utiliza surfactantes ya que incrementan la probabilidad de que las partículas y las burbujas se adhieran. Los factores que influyen en la eficiencia de la flotación incluyen el tipo de recolector,

surfactantes y floculadores, pH, fuerza iónica del medio, tipo de formación de burbujas, presión de aire, tiempo de retención hidráulica y tasa de flotación de partículas. Para que la flotación sea exitosa la célula debe ser hidrofóbica con un alto peso molecular, lo cual puede ser obtenido por medio de la adición de surfactantes y coagulantes. En algunas microalgas de baja densidad y capacidad de auto flotación este proceso puede ser más rápido y efectivo que la sedimentación (Singh & Patidar, 2018). Aunque se considera una técnica efectiva, tiene una serie de limitaciones asociadas las cuales incluyen el uso de surfactantes o floculadores en diferentes dosis para mejorar el rendimiento, lo cual requiere separación adicional, lo que aumenta los costos del proceso (Soomro et al., 2016).

- **Centrifugación:** se trata de una variante de la sedimentación donde la fuerza centrífuga cumple el rol de la gravedad separando las microalgas de su medio de cultivo. Este tipo de separación depende de dos características de la célula: tamaño y densidad (Singh & Patidar, 2018). Se trata de una técnica eficiente para la cosecha de biomasa, ya que es rápida, fácil y efectiva. Sin embargo, tiene la desventaja de que, al exponer las células de microalga a una fuerza gravitacional muy alta, puede provocar la disrupción y daño estructural de la célula (Knuckey et al., 2006). En cultivos industriales el gran volumen de cultivo por cosechar como el aumento de costo energético hace que el proceso de centrifugación sea económicamente inconveniente.

La selección del método de cosecha apropiado se basa principalmente en la naturaleza de la especie de microalgas como en el objetivo del experimento y uso del producto obtenido. Por lo tanto, existen varias técnicas para la recolección de la biomasa, las cuales se adaptan mejor a un caso que a otro; generalmente se llevan a cabo combinaciones de dos o tres métodos para mejorar la eficiencia del proceso.

4.2.2 Fijación de dióxido de carbono

La fijación de carbono es un efecto natural del metabolismo de las microalgas, provocado por la fotosíntesis. Se trata de una de las características más importantes, siendo considerada como una opción para la mitigación de los efectos de las emisiones de dióxido de carbono (Sondak et ál., 2016). El proceso que hace posible dicha captura es la

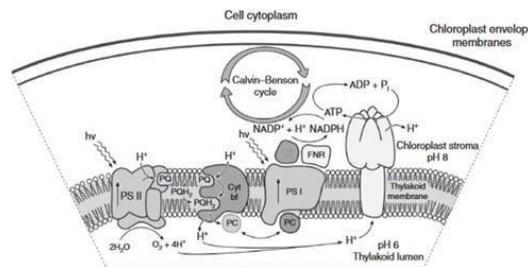
fotosíntesis oxigénica, la cual se define como una reacción *redox* en la que el dióxido de carbono es convertido en carbohidratos liberando oxígeno como subproducto (Masojídek et al., 2013). Tradicionalmente, la fotosíntesis se divide en dos etapas: reacciones de luz y reacciones de oscuridad. El nombre se deriva de la presencia o ausencia de luz, ya que esta actúa como reactivo limitante en la primera fase de la fotosíntesis, mientras que su ausencia activa la segunda fase.

4.2.2.1 Reacciones de luz

A grandes rasgos, las reacciones de la luz ocurren en la membrana de los cloroplastos donde la energía lumínica es transformada a energía química en un proceso conocido como fosforilación no cíclica donde complejos enzimáticos llamados fotosistemas utilizan la energía de la luz para generar electrones de alta energía a partir de la hidrólisis de agua, lo que genera oxígeno como subproducto, los cuales viajan de un fotosistema a otro perdiendo parte de su energía lo que permite la entrada de protones dentro del lumen de la membrana tilacoidal generando un gradiente de protones dentro del cloroplasto. Al final de proceso, los electrones son aceptados por el NADP⁺ dando la producción de NADPH mientras que el gradiente de protones es aprovechado por la enzima ATP sintasa para la producción de ATP (Masojídek et al., 2013).

Figura 1.

Fosforilación no cíclica de las reacciones de luz de la fotosíntesis.



Nota. Adaptada de Masojídek et al. (2023).

Cabe mencionar que el factor clave en estas reacciones es la presencia de pigmentos, como la clorofila, los cuales conforman la unidad principal de los fotosistemas. Cuando un fotosistema es impactado por la luz, las moléculas de clorofila transfieren la energía de una

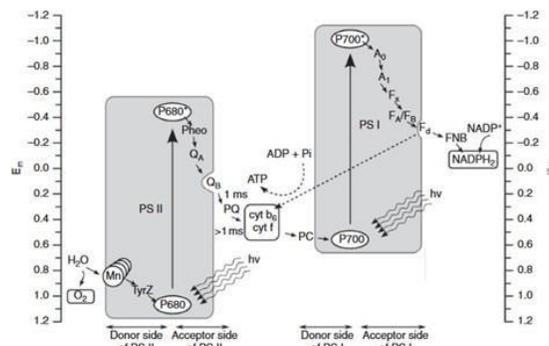
a otra hasta llegar al centro donde un par especial absorberá la energía y perderá un electrón, el cual será transportado de un fotosistema a otro para dar el proceso de fosforilación.

Existen dos tipos de fotosistemas; cada uno debe ser impactado por la luz para la fotosíntesis. Sin embargo, cada fotosistema absorbe la luz mejor a una determinada longitud, lo que ayuda a distinguir entre ellos. El fotosistema II, el primero de la reacción, absorbe la luz mejor a 680 nm mientras que el fotosistema I, el segundo en ser excitado, lo hace a 700 nm. Razón por la cual también se denominan como P680 y P700 (Sukenik et al., 1987).

Los fotosistemas no son los únicos complejos involucrados en el proceso ya que entre el P680 y P700 existe una molécula pequeña llamada plastoquinona de donde los electrones pasan a un complejo de citocromo para luego ir a una proteína unida a cobre denominada plastocianina. El paso a través de estas moléculas provoca la pérdida de energía de los electrones que alimentan el flujo de electrones hacia adentro del tilacoide. Una vez llega al P700, el electrón ha perdido demasiada energía, por lo que vuelve a ser excitado por la acción de un nuevo fotón. Del sistema P700, el electrón pasa a una ferredoxina que la transporta hacia una enzima llamada NADPH sintasa que, como indica su nombre, utiliza el electrón excitado para la síntesis de NADPH a partir de NAP^+ y H^+ (Falkowski & Raven, 2007).

Figura 2.

Flujo de energía entre los fotosistemas I y II.



Nota. Adaptada de Masojídek et al. (2023).

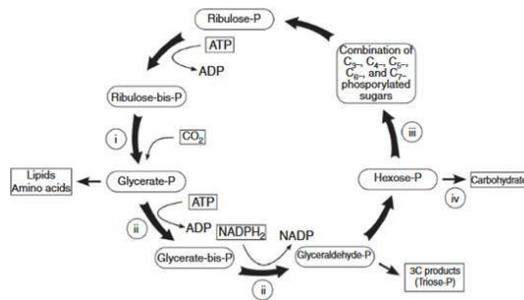
Al final del proceso se dará la síntesis de dos moléculas energéticas: ATP y NADPH. Estas serán la fuente principal de energía en las reacciones oscuras representadas por el ciclo de Calvin- Benson.

4.2.2.2 Reacciones de oscuridad

En las reacciones de fase oscura, se produce la fijación del dióxido de carbono específicamente. Para ello, las moléculas de ATP y NADPH, producidas durante la fase clara, se utiliza como fuente de energía para la conversión de CO₂ en azúcares de tres carbonos. El proceso se denomina cíclico debido a que no hay una línea de producción entre un producto inicial y final, sino que todos los intermediarios se encuentran activos al mismo tiempo. Su transformación se repite una y otra vez mientras que la entrada de CO₂ agrega carbonos mientras que la salida G3P, gliceraldehído 3-fosfato, los elimina.

Figura 3.

Ciclo de Calvin-Benson en las reacciones de oscuridad de la fotosíntesis.



Nota. Adaptada de Masojídek et al. (2023).

Las reacciones del ciclo de Calvin pueden, a su vez, dividirse en fases según el tipo de reacción química que se lleve a cabo:

- **Fase de carboxilación:** una enzima conocida como rubisco (ribulosa bifosfato carboxylasa/oxigenasa) agrega una molécula de dióxido de carbono a una azúcar de 5 carbonos (ribulosa bifosfato) la cual se fragmenta para dar dos moléculas de fosfoglicerato.

- **Fase de reducción:** el fosfoglicerato se transforma en un producto de 3 carbonos, conocido como triosa-P. El proceso tiene dos pasos: primero se agrega ATP para fosforilar el fosfoglicerato en difosfoglicerato liberando ADP y, segundo, la reducción de difosfoglicerato hacia fosfogliceraldehído por NADPH que se transforma nuevamente en NADP+.
- **Fase de regeneración:** la ribulosa fosfato es regenerada mediante una serie de reacciones que combinan fosfatos de 3, 4, 5, 6 y 7 carbonos. Enzimas transcetolasas y aldolasas se encargan de regenerar los azúcares de 5 carbonos a partir de azúcares de 6 y 3 carbonos. Este proceso permite la fijación de dióxido de carbono nuevamente.
- **Fase de producción:** a partir del gliceraldehído 3-fosfato que se libera con cada ciclo, se puede dar la síntesis del resto de macromoléculas desde azúcares más complejos como la celulosa, lípidos y aminoácidos. El tipo y proporción de compuestos producidos, depende tanto de la especie de microalgas que se utilice, como de las condiciones en las que esta se cultive.

4.2.3 Cuantificación de dióxido de carbono

Basándose en el proceso de fotosíntesis, se puede correlacionar la fijación de carbono con la producción de biomasa mediante la siguiente ecuación:



Esta establece que por cada molécula de glucosa se utilizaron 6 moléculas de carbono, lo cual es útil para estimaciones de la cantidad de dióxido de carbono requerido para la síntesis de glucosa y sus derivados, como celulosa y glucógeno. Sin embargo, la biomasa de las microalgas, como se mencionó, no se compone exclusivamente de azúcares. Existen muchas otras moléculas complejas que contienen carbono derivado de la fotosíntesis. Por lo tanto, la determinación de dióxido de carbono fijado por una colonia de microalgas puede ser llevada a cabo por diferentes métodos, tantos directos como indirectos:

4.2.3.1 Métodos directos

Alrededor de un 79 % de los estudios realizados para la determinación de dióxido de carbono fijado utilizan métodos directos. Pueden subdividirse según el tipo de carbono que se detecta, 45 % de los estudios constituyen análisis elementales, un 28 % por valores supuestos y el resto por medio de carbono orgánico total.

- **Valores supuestos:** este tipo de técnica es de las más simples y rápidas para la determinación de dióxido de carbono. Generalmente, se utiliza debido a la falta de métodos analíticos, por lo que se utilizan los contenidos de carbono reportados en estudios pasados. Tiene como desventaja principal el presentar porcentajes de error de hasta el 50 % debido a las diferentes especies y condiciones de cultivo. El supuesto principal es un contenido de carbono de 50 % para las microalgas generando una relación de 0.5 kg de dióxido de carbono con 1 kg de biomasa seca, dicha relación tiene su origen en Chisti (2007) el cual aproximó el 50 % de carbono de un experimento usando *Phaeodactylum tricornutum* con un analizador elemental. Aunque varias especies tienen contenidos de carbono redondeando el 50 %, muchas otras varían de forma considerable, aún más cuando se toma en cuenta el efecto de las condiciones de cultivo propias de cada experimento.

Tabla 1.

Contenido de carbono en diferentes microalgas utilizando equipo analítico.

Especie de microalga	Contenido de carbono
<i>Botryococcus braunii</i> SAG-30.81	58
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> SJTU-2	51.30%
<i>Chlorella</i> sp. BTA 9031	34.70%
<i>Chlorella</i> sp.	50.10%
<i>Chlorella vulgaris</i> ATCC 13482	50%
<i>Chlorella vulgaris</i> LEB-104	45%
<i>Chlorella vulgaris</i> P12	45.60%

<i>Chlorella ZY-1</i>	51%
<i>Desmodesmus sp.</i>	43.8%
<i>Dunaliella tertiolecta SAG-13.86</i>	36%
<i>Scenedesmus obliquus FACHB 417</i>	50.10%
<i>Scenedesmus obliquus SJTU-3</i>	49.50%
<i>Scenedesmus sp.</i>	52%
<i>Spirulina platensis LEB-52</i>	50%

Nota. Adaptado de Lim et al. (2021)

- Análisis elementales:** Son el método más utilizado (45 %). La técnica consiste en ingresar biomasa de microalgas seca en analizadores elementales donde, a través de combustión de alta temperatura, las muestras son oxidadas y transportadas por un gas acarreador a una sonda de conductividad térmica, la cual detecta la composición elemental de carbono en comparación a un estándar de calibración. Estos estándares suelen ser ácido sulfanílico, sulfamida o cisteína. Dicho proceso permite determinar el porcentaje de carbono presente en una muestra de microalgas, el cual permite saber, en base a la cantidad de biomasa seca, cuanto dióxido de carbono fue capturado para producirla. Cabe mencionar que tanto los métodos de valores supuestos como elementales utilizan una serie de ecuaciones que les permite determinar la tasa de captura de dióxido de carbono como la efectividad de este proceso. Son capaces de determinar variables como la tasa de fijación de carbono, eficiencia de fijación de dióxido de carbono y acumulación de dióxido de carbono fijado. Sin embargo, estas ecuaciones y modelos solo son aplicables para cultivos en fotobiorreactores ya que es necesario una cuantificación de parámetros como el volumen de cultivo, flujo de carbono, masa de dióxido de carbono inyectada, etc.
- Análisis de carbono total orgánico (TOC):** Los analizadores TOC se diferencian de los elementales en el hecho de que pueden detectar un solo elemento (carbono) lo que les permite determinar si se trata de carbono orgánico o inorgánico. Utilizan combustión de alta temperatura para detectar carbono orgánico total (TOC) como

carbono inorgánico total (TIC), siendo la suma de ambos el contenido total de carbono (TC). El carbono inorgánico se refiere al dióxido de carbono disuelto en agua, el cual existe en cuatro formas diferentes: carbonato (CO_3^{2-}), bicarbonato (HCO_3^-), ácido carbónico (H_2CO_3) y dióxido de carbono disuelto. Las microalgas realizan el ciclo de Calvin cuando el dióxido de carbono ingresa por difusión a su membrana o bien se encuentra en su forma de bicarbonato (Borowitzka, et. al, 2016). El dióxido de carbono fijado será transformado en dióxido de carbono orgánico en la biomasa de las microalgas. Aunque no es una técnica muy utilizada, el (TOC) determinado por este método es aplicable para la ecuación 1. Ya que los analizadores TOC tienen la capacidad de determinar TIC y TOC, es posible llevar a cabo balance de masas para determinar la fijación de dióxido de carbono. Este método toma en cuenta el carbono inorgánico disuelto, el cual puede ser importante en el cultivo de las microalgas, debido a que el carbono fijado puede ser a veces perdido en el medio de cultivo por difusión pasiva debido a factores de estrés sobre las microalgas. Otra es que el dióxido de carbono, proveído a las microalgas, puede ser transformado a otros compuestos que no sean biomasa necesariamente como es el caso de los compuestos orgánicos volátiles (VOC, por sus siglas en inglés)(Deprá et al., 2019). Estos consisten en compuestos orgánicos gaseosos, como alcoholes, cetonas y ésteres, que tienen un interés comercial por su uso en la industria de alimentos y cosmética, pero que, en el caso de fijar carbono, no forman parte de la biomasa y quedan libres en la atmósfera (Santos et al., 2016).

4.2.3.2 Métodos indirectos

A diferencia de los métodos directos los cuales se basan en la detección directa de carbono y su correlación estequiométrica con la fijación de dióxido de carbono, los métodos indirectos suelen ser más sencillos y se basan en cuantificar los cambios de dióxido de carbono dentro del fotobioreactor.

- **Cromatografía de gases:** es una técnica conocida por su alta sensibilidad y exactitud. Se compone de un inyector, una columna, un detector de conductividad térmica y un gas acarreador, como el hidrógeno, argón o helio, que transporta las muestras de gas hacia el detector. Muestras de la entrada y salida del fotobiorreactor

son capturadas e ingresadas al cromatógrafo para determinar la concentración de dióxido de carbono analizando la variación conforme el tiempo. Es posible determinar la tasa de fijación de dióxido de carbono como la cantidad exacta que está siendo fijada en un determinado intervalo de tiempo (Kargupta et al., 2015). Con una línea de tiempo para la concentración de dióxido de carbono, es posible obtener una representación gráfica de la fijación de dióxido de carbono, lo que permite obtener tasas promedio que mejoren la certeza de las mediciones, como la efectividad de las condiciones de cultivo (Lim et al., 2021).

- **Sensores infrarrojos:** son sensores ópticos similares a los detectores de gas. Las muestras de gas son expuestas a luz infrarroja en una onda específica que genera señales que son comparadas con una señal de referencia. La diferencia de ambas representa la concentración de dióxido de carbono. Los sensores infrarrojos son conocidos por su exactitud y estabilidad a largo plazo. Suelen ser utilizados para el monitoreo de dióxido de carbono a nivel industrial. Comparados con la cromatografía de gases los sensores infrarrojos ejecutan mediciones durante cultivo en masa. Sin embargo, se debe considerar que la diferencia de dióxido de carbono no necesariamente equivale a la fijación del mismo; ya se ha detectado que más de un 80 % de este se convierte en VOC, por lo que la relación no es exacta o infalible (Jacob-Lopes & Franco, 2013).

4.3 Limpieza de aguas

El uso de microalgas para el tratamiento de afluentes data aproximadamente de 1940 cuando se reportaron los primeros estudios de la posibilidad de utilizar el cultivo de microalgas a nivel masivo para el tratamiento de residuos industriales. Actualmente, esta técnica no solo se ha perfeccionado, sino que también ha demostrado ser una alternativa eficiente y de bajo costo, además de eco-amigable, es capaz de reciclar eficientemente los contaminantes para la producción de biomasa. Conlleva múltiples beneficios desde la remoción de contaminantes, como amonio, nitritos, nitratos y fosfatos, el aumento del pH, oxidación de materia orgánica, reducción de microorganismos patógenos, oxigenación del agua, remoción de metales pesados y producción masiva de biomasa, la cual posee diversas

aplicaciones en industria, medicina y biotecnología (Hernández-Pérez & Labbé, 2014). Existe un especial énfasis en lo referente a la remoción de contaminantes derivados de nitrógeno y fósforo, ya que no solo son los más comunes, sino que también se encuentran directamente relacionados a la contaminación provocada por el uso excesivo de fertilizantes y mal manejo de aguas residuales. Ambos elementos corresponden a nutrientes esenciales para el metabolismo de las microalgas por lo que estudios realizados con diferentes géneros han demostrado una alta efectividad de estos organismos en reducir o eliminar la presencia de estos contaminantes en el agua.

4.3.1 Metabolismo de nitrógeno

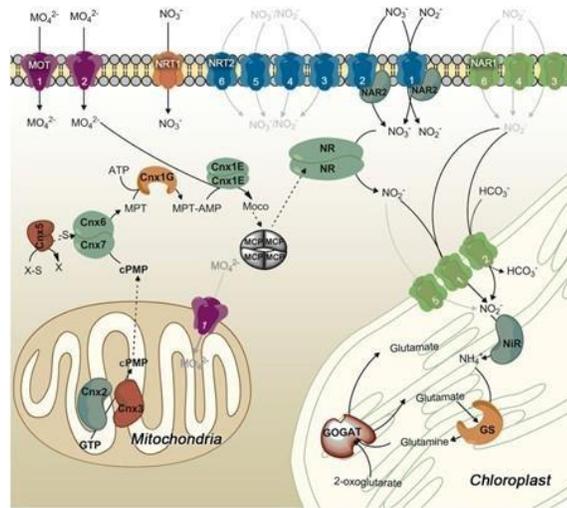
El nitrógeno consiste en un macroelemento, un componente clave para la formación de biomoléculas en los organismos vivos. Este puede ser incorporado en los organismos eucarióticos ya sea de fuentes orgánicas o inorgánicas, las cuales suelen estar disponibles en pequeñas concentraciones según el ambiente, lo que lo convierte en un limitante de crecimiento y productividad de las micro- algas. El amonio (NH_4^+), nitrato (NO_3^-) y nitrito (NO_2^-) son las fuentes de nitrógeno inorgánico más comunes capaces de ser asimiladas por los organismos fotosintéticos (Giordano & Raven, 2014). El proceso por el cual el nitrógeno es asimilado en los eucariotas fotosintéticos, incluyendo las microalgas, es llevado a cabo por un proceso de reducción: en primer lugar, el nitrato es transportado al interior de la célula donde una enzima de nitrato reductasa (NR) cataliza su reducción en nitrito, el cual es subsecuentemente transportado al interior del cloroplasto donde la enzima nitrito reductasa (NiR) cataliza su reducción para convertirlo en amonio. Dicho amonio es incorporado en los esqueleto de carbono mediante la síntesis de glutamato a través del ciclo de glutamina sintasa/glutamina oxoglutarato amino transferasa o glutamina sintasa (GS/GOGAT). El amonio es incorporado en el grupo amida por la enzima glutamina sintasa, luego el grupo amida es transferido reductivamente al alfa-oxoglutarato para dar formación de dos moléculas de glutamina.

Componentes asociados Las microalgas del género *Chlamydomonas* han sido el organismo modelo en el cual se han identificado la mayoría de las rutas asociadas a la asimilación de nitrato y su regulación. El proceso de asimilación inicia con el transporte de nitrato y nitrito al interior de la célula, lo cual se trata de un proceso complejo con una gran

cantidad de proteínas asociadas. Los transportadores se clasifican según su especificidad de sustrato, afinidad y características de expresión. Estructuralmente hablando existen tres familias de proteínas involucradas en el transporte de nitrato/nitrito identificadas en *Chlamydomonas*. Estas se denominan como NRT1, NRT2 y NAR1.

Figura 4.

Organización de proteínas y enzimas involucradas en la asimilación de nitrógeno en Chlamydomonas como organismo modelo.



Nota. Adaptado de Sanz-Luque et al. (2015)

- **NRT1:** estos transportadores consisten en transportadores peptídicos, los cuales han sido re- bautizados como NPF. Estos han sido ampliamente identificados en los genomas de las plantas, contrario a los genomas de las algas donde se encuentran en bajo número. La mayoría de estos genes codifican transportadores de nitrato de baja afinidad.
- **NTR2:** estas proteínas pertenecen a la familia de los porteros de nitrato nitrito (NNP por sus siglas en inglés) y, a su vez, a la superfamilia de facilitadores mayor. Los genes NRT2 se encuentran presentes en organismos capaces de asimilar nitrato como plantas, algas, fungi y bacterias. Pueden transportar tanto nitrato como nitrito. En *Chlamydomonas*, existen 6 miembros de esta proteína, pero solo 1 consiste en un sistema de 2 componentes que requiere de una segunda proteína NAR2 para funcionar. Por lo tanto, se ha detectado que las proteínas de tipo NTR2.1/NAR2

consisten en transportador de alta afinidad bi-específico que funcionan tanto para nitrato como nitrato mientras que NTR2.2/NAR2 es un transportador de alta afinidad únicamente para nitrato.

- **NAR1:** esta familia también se denomina como componente relacionado a la asimilación de nitrato 1 (NAR1 por sus siglas en inglés) y se conforma por transportadores relacionados con las proteínas transportadoras de nitrato formato (FNT). En *Chlamydomonas*, NAR1.1 se trata de un transportador de nitrato hacia el cloroplasto mientras que NAR1.2 es un transportador de HCO₃⁻ presente en la envoltura del cloroplasto. Este último es parte del mecanismo de concentración de dióxido de carbono (CCM) el cual opera a bajas concentraciones de dióxido de carbono; lo que lo hace esencial, para acumular dióxido de carbono cercano a la enzima RUBISCO, volviendo eficiente la fotosíntesis en microalgas.
- **Nitrato reductasa (NR):** esta enzima cataliza la reducción de nitrato en nitrito utilizando los electrones de NADH o bien NADPH. En eucariotas, se caracteriza por poseer grupos prostéticos correspondientes a cofactores FAD, hemo y de molibdeno. Las algas suelen poseer un único gen codificante para NR, el cual posee dos actividades aparte de la reducción de nitrato. La primera es la deshidrogenasa de NADH/NADPH que cataliza la transferencia de electrones de nucleótidos de pirimidina a aceptores de electrones artificiales como citocromo c o dicloro fenol. En la segunda actividad, se cataliza la transferencia de electrones de donadores de los electrones artificiales hacia el nitrato, lo cual requiere de un dominio conocido como Moco.
- **Nitrato reductasa (NiR):** esta enzima cataliza la reducción que produce amonio dentro del estroma de los cloroplastos. La ferredoxina reducida, generada a partir de la fotosíntesis, actúa como el donador para la reducción del nitrito, aunque en condiciones de oscuridad el NADPH también puede actuar como donador. La NiR algal, presente en cianobacterias y plantas, consiste en un monómero codificado por un solo gen en *Chlamydomonas*, el cual se encuentra agrupado con otros genes esenciales para la asimilación de nitrato/nitrito.

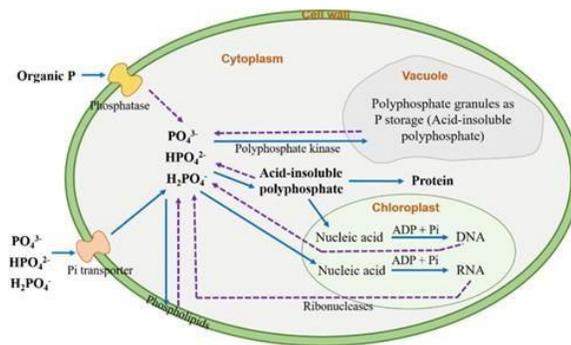
- **GS/GOGAT:** finalmente, la incorporación de nitrógeno se da con el nitrógeno orgánico presente en el glutamato debido a la acción del sistema de GS/GOGAT, tal y como se describió (Sanz-Luque et al., 2015).

Regulación del proceso La regulación de la asimilación de nitrato es un proceso complejo que involucra varias proteínas y enzimas asociadas, dependiendo del organismo, los procesos y mecanismos involucrados pueden presentar variaciones entre sí. Sin embargo, basándose en la información obtenida de los estudios de organismos modelo como las *Chlamydomonas*, se pueden establecer ciertas generalidades. El nitrato, además de ser un nutriente esencial, actúa como molécula señalizadora ya que su presencia induce la expresión de las proteínas necesarias para su asimilación. Cabe mencionar la acción del amonio sobre el sistema, ya que el amonio presenta un estado de reducción apto para su asimilación en glutamina, suele ser preferido lo que resulta en un efecto negativo sobre la asimilación de nitrato tanto de forma transcripcional como post-transcripcional. La expresión del gen para nitrato reductasa (NR) es especialmente inhibido en presencia de un medio rico en amonio. Los transportadores de nitrato suelen ser expresados una vez se reducen las concentraciones de amonio. Esta inhibición del amonio es particularmente encontrada en las algas ya que se necesita un cambio en el balance de nitrógeno/amonio para inducir la expresión de NR (Cannons & Pendleton, 1994). El amonio tiene además un efecto post-transcripcional ya que, al agregar amonio a las células, se inhibe la acción de los transportadores de nitrato en segundos y la de la enzima NR en minutos.

general, el fósforo inorgánico, es la forma química del fósforo preferida para su asimilación en microalgas; ya que estas, poseen varios transportadores específicos ubicados en su membrana. Dependiendo de la disponibilidad del fósforo inorgánico (Pi), la forma y cinética de los transportadores varía considerablemente. En condiciones de escasez, los transportadores de alta afinidad, pero con baja tasa, son dominantes; en abundancia de fósforo se acumulan los transportadores de baja afinidad, pero se vuelven dominantes los de tasa alta. Una vez dentro de la célula Pi es transformado a polifosfato, cadenas largas conformadas por unidades de fósforo. Variables como la concentración de otros nutrientes limitantes, como el nitrógeno y la intensidad de la luz pueden influir en la tasa y afinidad para la entrada del Pi. Se tiene evidencia que microalgas pertenecientes a las divisiones de *Chlorophyta* o *Estreptophyta* requieren del ión Na^+ para la entrada de Pi (Su, 2021).

Figura 6.

Esquema general del metabolismo de fósforo en las microalgas.



Nota. Adaptado de Liu & Hong (2021)

La enzima responsable de la formación de polifosfato se trata de una kinasa llamada polifosfato polimerasa, la cual transfiere el Pi del ATP para alargar la cadena de los polifosfatos. En condiciones de luz, el polifosfato es utilizado para la síntesis de ADN y producción de proteínas, proceso asociado y promovido por una intensidad lumínica alta. La temperatura induce la acumulación de polifosfato no soluble como el consumo del fosfato soluble por lo que tiende a ser un factor importante en la regulación de uso y consumo del fósforo (Su, 2021).

- **Disponibilidad de fósforo:** al ser un elemento tan importante para el metabolismo el fósforo es considerado como uno de los reactivos limitantes para el crecimiento y proliferación de las microalgas por lo que estas han desarrollado diferentes mecanismos para adaptarse a entornos con diferente disponibilidad de este nutrientes.
- **Escasez de fósforo:** en condiciones ambientales el fósforo suele encontrarse en bajas cantidades, lo que lo convierte en un nutriente limitante en ecosistemas acuáticos, por lo que controla la tasa y capacidad de crecimiento de los organismos como algas y plantas (US Environmental Protection Agency, 2013). Por lo tanto, el metabolismo de las microalgas se halla en gran medida adaptado para condiciones de escasez de fósforo. Esto se refleja en una captura eficiente de fósforo externo por medio de la inducción de fosfatasa para captura de fósforo orgánico externo y la síntesis de transportadores de fósforo de alta afinidad. La escasez de Pi suele inducir un incremento de transportadores de fósforo, así como el aumento en la afinidad del sistema de transporte de fósforo para facilitar la entrada de Pi.
- **Abundancia de fósforo:** en este caso las microalgas acumularán una mayor cantidad de fósforo de la que necesitan para sobrevivir. Este fósforo en exceso es acumulado en forma de fosfato ácido-insoluble dentro de la vacuola para uso futuro. De igual forma, se estimula la acumulación de polifosfato, lo cual permite continuar la división en ausencia de fósforo externo hasta que se halla consumido. La razón por la cual las microalgas llevan a cabo la acumulación de polifosfato se debe al hecho de que facilita el uso del fósforo y elimina el costo energético requerido para llevar a cabo el transporte y asimilación del fósforo externo. Por otra parte, la acumulación de polifosfatos facilita a su vez la incorporación de metales pesados y, por lo tanto, promueve la remediación de contaminación provocada por metales (Su, 2021).

5. Metodología

5.1 Sitio de estudio

El estudio fue realizado en el laboratorio de bioquímica del Departamento de Bioquímica y Microbiología, así como en el laboratorio de carbono del Centro de Estudios Ambientales y Biodiversidad dentro de las instalaciones del campus central de la Universidad del Valle de Guatemala.

5.2 Sujetos de estudio

Los sujetos de estudio fueron organismos eucarióticos fotosintéticos identificados como microalgas de los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus* provenientes de la alguna artificial de la planta de tratamiento San Miguel de Cementos Progreso ubicado en Sanarate, El Progreso.

5.3 Enfoque, diseño y tipo de estudio

El diseño de estudio es de tipo experimental cuantitativo con enfoque exploratorio, ya que se busca describir de forma general las características más relevantes del consorcio de microalgas para la generación de un perfil que pueda ser utilizado como base en futuros estudios. Debido a temas de espacio, capacidad y presupuesto el tamaño de población y número de muestra es reducido por lo que no es posible determinar su distribución como tampoco aplicar estadística inferencial.

5.4 Tipo y tamaño de muestra

Se utilizaron cultivos de una mezcla de microalgas *Chlorella-Scenedesmus*, aislados de agua de humedal. Para el análisis de contenido de carbono, se utilizó un total de 2 g de biomasa seca extraída de un total de 10 colonias de microalga. En cuanto a la curva de absorbancia, se utilizaron 6 colonias para la medición de absorbancia y correlación con biomasa. Para la determinación de limpieza de agua, se realizaron 3 cultivos experimentales a partir de agua de humedal filtrada cultivada con microalgas los cuales se

compararon con un control correspondiente a otras 3 colonias de microalgas cultivadas en las mismas condiciones con la diferencia de utilizar medio BG-11 como control.

5.5 Variables

Las variables involucradas durante la experimentación, junto con su definición, naturaleza, unidades de medida e interrelación que hay entre ellas se describe en la siguiente tabla:

Tabla 2.

Variables involucradas en el proceso de determinación de capacidad de fijación de carbono y limpieza de agua.

Número de variable	Variable	Definición	Naturaleza	Interrelación	Unidades de medición
1	Cultivo de microalgas	Organismos eucariotas fotosintéticos correspondientes a una mezcla de los géneros <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i> crecidos en medio líquido	Cualitativa	Independiente	L
2	Absorbancia	Cambio en la intensidad de luz cuando pasa a través de las partículas de un compuesto	Cuantitativa	Dependiente	No aplica
3	Biomasa	Materia orgánica producida a partir del crecimiento de microalgas	Cuantitativa	Dependiente	g

4	Carbono orgánico	Cantidad del elemento de carbono detectado en muestras de biomasa	Cuantitativa	Dependiente	%
5	Contaminantes	Concentración de nitritos, nitratos y fosfatos detectados en agua de humedal	Cuantitativa	Independiente	mg/dL

5.6 Materiales y métodos

5.6.1 Preparación de medio BG-11

El medio se preparó de acuerdo con la receta de receta establecida por la Universidad de Texas en Austin para medio líquido (Algae, s. f.). Para ello se utilizó lo siguiente.

Stock 1:

- 0.1 g de Na₂Mg EDTA
- 0.6 g de Citrato de amonio férrico
- 6 g de Ácido cítrico
- 3.6 g de CaCl₂ *2H₂O

Stock 2:

- 7.5 g de MgSO₄ * H₂O

Stock 3:

- 3.05 g de K₂HPO₄

Stock 4:

- 0.222 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0.079 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- 0.050 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 0.391 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Stock 5:

- 1.5 g de NaNO_3
- 0.02 g de Na_2CO_3

Stock 6:

- 2.85 g de H_3BO_3

Con la excepción del *stock 5*, que fue agregado de forma directa al medio, los demás se disolvieron en agua destilada aforando a 100 ml. Para evitar contaminación, se esterilizaron en autoclave a 121°C, 15 psi por 30 minutos y se conservaron en refrigerador a 4°C. Para la preparación del medio, se agregaron los siguientes volúmenes:

- 1000 uL de *Stock 1*
- 1000 uL de *Stock 2*
- 1000 uL de *Stock 3*
- 300 uL de *Stock 4*
- *Stock 5* fue agregado de forma directa
- 100 uL de *Stock 6*

El medio se aforó con agua destilada hasta llegar a 1 L, además se esterilizó y conservó de igual manera que los *stocks*.

5.6.2 Cultivo y mantenimiento de las colonias

Previo a iniciar la experimentación, se realizó una limpieza profunda de la incubadora como un descarte de las colonias muertas o contaminadas. A partir de los cultivos viables, se establecieron nuevas colonias de microalgas, las cuales se mantuvieron en la incubadora con medio BG-11 en condiciones de 34°C, iluminación dada por lámpara de luz blanca de 9 W, 600 k en ciclos de 16 horas de oscuridad y 8 horas de luz con ajuste y mantenimiento

de pH a 9. Estos cultivos nuevos se analizaron por medio de microscopía para la confirmación de la presencia de los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus* con base en la morfología.

5.6.3 Curva de clorofila y biomasa

Cada semana se midió la absorbancia de una colonia aislada de *Chlorella-Scenedesmus* a 670 nm para la detección de clorofila “a” utilizando cubetas de plástico marca BRAND con dimensiones de 12.5 x 12.5 x 45 mm, BG-11 como blanco y un espectrofotómetro UV-VIS. Las lecturas se realizaron en triplicado y se estableció la absorbancia de la clorofila “a” en cada cultivo analizado. Posteriormente, se extrajeron 10 ml de cada colonia en triplicado, los cuales fueron colocados en tubos falcon de 50 ml para su centrifugación a 4,500 rpm, 4°C por 10 minutos. Una vez terminada la centrifugación se descartó el líquido sobrenadante de cada tubo dejando el pellet en el fondo; luego se envolvió el tubo en papel aluminio para colocarlo en horno a 50°C de 2 a 3 días o bien en la misma incubadora a 34°C de 1 a 2 semanas. Luego de secar por completo la biomasa, la cual quedó en forma de pellet, se pesó en balanza analítica obteniendo un triplicado de pesos correspondiente a un triplicado de concentración de clorofila en cada colonia aislada. Finalmente se estableció la relación directa entre estos dos conjuntos de datos utilizando un modelo de regresión lineal con absorbancia de clorofila “a” como la variable “X” y peso de biomasa como la variable “Y”.

5.6.4 Determinación de dióxido de carbono fijado

Se utilizó un total de siete colonias para la determinación de dióxido de carbono, cinco de las cuales correspondían a las colonias viejas descartadas, las cuales se caracterizaron por una coloración amarillenta, un pH bajo y una absorbancia menor que 0.5 a 670 nm. A partir de colonias sanas, confirmadas como *Chlorella-Scenedesmus*, se establecieron dos nuevos cultivos de 500 ml en Erlenmeyers de 1 litro, autoclaveados a los cuales se les agregó un 1 % (5 ml) de cultivo aforado con 99 % (495 ml) de BG-11 y se les agregó un sistema de inyección de aire utilizando un motor de pecera marca Shiruba modelo PRO-900 con flujo de 350 L/h a través de mangueras esté- riles para la agitación y aumento de la difusión

de CO₂. Semanalmente se monitoreó el pH, temperatura y concentración de clorofila con espectrofotómetro UV-VIS y, una vez se detectó una absorbancia de 0.5 a 1 en un cultivo, este fue apartado para la extracción de biomasa.

La extracción se realizó mediante decantación del medio líquido sobrenadante dejando las colonias suspendidas en un volumen reducido de medio, las cuales se vertieron en cajas petri de vidrio y se colocaron en horno a 50°C por alrededor de dos días hasta eliminar toda la humedad. Una vez seco, se utilizó una espátula de metal para raspar las microalgas secas dejando un producto pulverizado, el cual se pesó en balanza analítica. Finalmente, se colocaron en sobres de papel aluminio y se enviaron al Centro de Estudios Ambientales y Biodiversidad en la Universidad del Valle donde fueron procesadas por el laboratorio de análisis de carbono para la determinación de carbono orgánico en porcentaje utilizando analizador elemental.

Se utilizó 1 g de biomasa para corrección de humedad y 0.5 para la determinación de carbono. Se preparó una curva de calibración usando ácido aspártico como estándar en concentraciones de 4, 8, 12 y 16 mg para el rango de detección de carbono. Las muestras fueron analizadas en duplicado utilizando 0.5 g en cada corrida. El equipo corresponde a un cromatógrafo de la marca Thermo Scientific modelo FLASH 2000 NC Analyzer el cual opera con helio como gas acarreador, por lo que el proceso y análisis de las muestras corresponden al establecido por el manual del equipo utilizado por el laboratorio. (Thermo Scientific, 2007.)

Los datos obtenidos para el porcentaje de carbono orgánico se utilizaron para la determinación de dióxido de carbono mediante la estequiometría de la ecuación 3, donde m se refiere a los gramos de biomasa seca y % al porcentaje de carbono orgánico.

Ecuación 1. *Estequiometría para determinación de dióxido de carbono a partir de porcentaje de carbono orgánico.*

$$g(\text{CO}_2) = m * \% * (1\text{molC})/(12.011\text{gC}) * (1\text{molCO}_2)/(1\text{molC}) * (44.01\text{gCO}_2)/(1\text{molCO}_2)$$

Ecuación 2. *Cálculo de media aplicada en el análisis de resultados.*

$$\text{Media (X)} = \frac{\sum_{i=1}^N X_i}{n}$$

Ecuación 3. *Cálculo de desviación estándar muestral aplicada en el análisis de resultados.*

$$\text{Desviación estándar muestral (S)} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - X)^2}{n - 1}}$$

Ecuación 4. *Cálculo de propagación de error en sumas.*

$$R = X + Y - Z$$

$$\delta R = \sqrt{(\delta X)^2 + (\delta Y)^2 + (\delta Z)^2}$$

Ecuación 5. *Cálculo de propagación de error en multiplicaciones.*

$$R = \frac{X * Y}{Z}$$

$$\delta R = R * \sqrt{\frac{\delta X^2}{X} + \frac{\delta Y^2}{Y} + \frac{\delta Z^2}{Z}}$$

Ecuación 6. *Cálculo de propagación de error al multiplicar por una constante.*

$$R = X * c$$

$$\delta R = \delta X * c$$

5.6.5 Limpieza de agua de humedal

Se extrajeron dos litros de agua de humedal, procedente de la planta de tratamiento San Miguel, utilizando un sistema de filtrado y membranas estériles de 0.40 μm . Se filtró un total de 700 ml de agua los cuales se conservaron en refrigeración a 4°C hasta su uso. Se utilizó un colorímetro HACH modelo DR 900, para la detección de contaminantes (nitrato, nitrito y fosfato). Dicho análisis se realizó según el protocolo establecido en el manual correspondiente (HACH, 2022). Para comprobar la capacidad de las microalgas de crecer en el agua de humedal, así como su capacidad para la limpieza de los contaminantes analizados, se realizaron tres cultivos experimentales utilizando 200 ml de agua de humedal

filtrada, a los cuales se les agregó un promedio de 0.001353 g, correspondiente a 2 ml de colonia de microalgas, cuya concentración de biomasa fue establecida por medio de peso seco, proveniente de los cultivos de *Chlorella-Scenedesmus*. Estos cultivos se dejaron incubar por 34 días en las condiciones establecidas.

Se prepararon otros tres cultivos control, los cuales se formularon e incubaron de forma idéntica a los experimentales con la diferencia de usar BG-11 en vez de agua de humedal. Pasados 34 días de incubación, se llevó a cabo un análisis de colorímetro HACH nuevamente en las colonias experimentales, para lo cual se separó la biomasa del medio, el cual fue filtrado nuevamente con membrana estéril antes de medir la concentración de nitratos, nitritos y fosfatos. Tanto la biomasa de las colonias experimentales como las de control fue extraída por medio de decantación, centrifugación y secado en horno. Con base a los resultados, se determinó la eficiencia del agua de humedal para actuar como sustituto del medio estándar.

Tanto para determinar la efectividad de las microalgas en reducir contaminantes como la eficiencia del agua residual como alternativa de medio para la producción de biomasa, se utilizó el cálculo de la diferencia porcentual en base a la concentración de contaminantes original y la biomasa producida por los controles.

Ecuación 7. *Diferencia porcentual obtenida.*

$$\text{Diferencia porcentual (DP)} = \frac{|X - Y|}{X} * 100$$

Nota. “X” representa el valor control y “Y” el valor obtenido.

En el caso de la biomasa, también se utilizó la ecuación de porcentaje para determinar cuánta fue producida en término de control.

Ecuación 8. *Porcentaje de biomasa producida en base al control.*

$$\text{Porcentaje biomasa (P)} = \frac{B}{C} * 100$$

Nota. “B” es la biomasa producida por el cultivo experimental mientras que “C” es la biomasa obtenida del control.

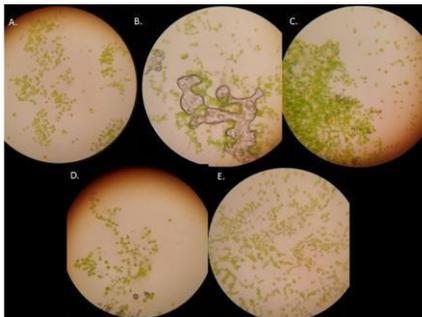
6.Resultados

6.1 Cultivo de microalgas de humedal

Antes de realizar la experimentación se llevó a cabo un proceso de limpieza en la incubadora utilizando etanol al 70 % al igual que un proceso de mantenimiento de las microalgas. Como resultado se obtuvieron cultivos sanos de microalgas de los cuales se mantuvieron en incubadora en sistemas semiabiertos. Estos sistemas correspondían a un Erlenmeyer cubierto con aluminio, el cual permitió el intercambio de gases, al mismo tiempo que redujo el contacto con el ambiente. Debido a la contaminación detectada en las primeras colonias, se realizó un análisis de microscopía en las colonias nuevas. Dicho análisis demostró falta de contaminación como una morfología correspondiente a los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus*.

Figura 7.

Morfología microscópica de las colonias de microalgas sanas vistas en microscopio óptico con aumento de 1000X.



Nota. A) Colonia WA9.1; B) Colonia WA10Re; C) Colonia WA11.1; D) Colonia WA10.1; E) Colonia WA7.1. La letra W indica la mezcla de *Chlorella* y *Scenedesmus*; los números enteros son el número de colonia; el punto decimal indica que es una colonia derivada de otra más vieja; y Re si ha pasado por más de un aislamiento.

Respecto a la morfología en sí, se puede observar una mezcla representada por células verdes, redondas, unicelulares y esféricas características para el género *Chlorella*. En todas las placas, se observó además la presencia de células de forma irregular y alargada, conglomeradas en grupos de 2 a 4, las cuales presentaron apéndices en forma de punta o bien prolongaciones en sus extremos, lo cual se asocia a lo reportado para el género de *Scenedesmus*. Puesto que las colonias analizadas comparten una misma morfología, se consideran una misma mezcla de los géneros *Chlorella-Scenedesmus* y fueron utilizadas de forma indiscriminada en el resto de la experimentación.

Para llevar a cabo la extracción en las colonias, el requisito fue detectar una absorbancia de 670 nm igual o mayor que 0.6 para la biomasa de las microalgas. Dicha característica, se detectó un mes después de iniciar la incubación; 20 días después de iniciar la incubación se observó contaminación en las colonias (Figura 17, ver Anexos), por lo fue necesario descartar las colonias y reiniciar el proceso. Con el objetivo de disminuir el riesgo de contaminación, se optó por lavar las mangueras y desinfectarlas inyectando etanol al 70 %, previo a ingresarlas en campana de flujo laminar, y esterilizarlas con luz UV por 15 minutos. así Se decidió conectar el sistema de aireación de forma completa dentro de la misma campana de forma que la manguera no entrara en contacto con el aire afuera de la incubadora. Como resultado, no volvió a observarse contaminación en los cultivos por lo que pasados 30 días se recolectó un total de 2.18 g de biomasa los cuales fueron enviados al laboratorio de carbono para su análisis.

6.2 Determinación de la capacidad de fijación de carbono

Además de la biomasa extraída de los cultivos de 500 ml, se extrajo la biomasa sobrante de las colonias viejas (Figura 14, ver Anexos) la cual se procesó igual que la biomasa fresca para su determinación de carbono con analizador elemental. Las muestras se analizaron por duplicado y se obtuvo un cromatograma para cada una, donde se indican los picos correspondientes a los elementos de carbono y nitrógeno (Figura 12, ver Anexos). El porcentaje de cada elemento corresponde a la integral de la curva para cada pico, calculado por el mismo equipo (Tabla 3). Al ser duplicados, se calculó el promedio y desviación para las lecturas de carbono utilizando las ecuaciones 1 y 2 (Tabla 4).

Tabla 3.

Datos originales reportados por el laboratorio de carbono para el análisis de carbono orgánico para biomasa fresca.

No.	Código muestra	Carbono orgánico (Base seca) (%)	Nitrógeno orgánico (Base seca) (%)
1	AMM-1a	32.04	7.78
2	AMM-1b	32.54	7.75
3	AMM-2	13.94	12.42
4	AMM-3	14.25	10.10

Nota. (AMM-1a) y (AMM-1b) se refiere a biomasa fresca; mientras que (AMM-2) y (AMM-3) se refiere a biomasa vieja.

Tabla 4.

Promedio y desviación de los duplicados para análisis de carbono orgánico en biomasa.

	Carbono %		Nitrógeno %	
	Promedio	Desviación	Promedio	Desviación
Biomasa fresca	32.29	0.35	7.76	0.02
Biomasa vieja	14.09	0.22	11.26	1.64

6.3 Regresión lineal para la relación de biomasa y absorbancia

Se cuantificó la concentración de biomasa seca producida por las colonias, y se relacionó con la absorbancia de la clorofila a 670 nm, detectada en espectrofotómetro. A partir de esto, se generó un modelo lineal, cuya ecuación que pudo determinar la concentración de biomasa seca, según la absorbancia de clorofila en la colonia (Figura 8).

Un problema detectado fue que, al momento de llevar a cabo las mediciones, la absorbancia detectada empezaba a disminuir inmediatamente. Como resultado, cada medida tenía que realizarse inmediatamente después de verter la porción alícuota en la celda, así como realizar varios intentos para una sola medida llegando a obtener diferentes rangos de absorbancia para una misma colonia. Por lo tanto, se optó por escoger las tres medidas más grandes asumiendo que representan la concentración real de la colonia completa. Por otra parte, en la extracción de biomasa, se tuvo el problema de que, en colonias con absorbancia baja, el producto final de la extracción era no recuperable ya que, en vez de un pellet, se generaba un polvo fino, el cual no podía ser extraído o pesado, por lo que algunos datos de absorbancia no fueron incluidos en las gráficas (Tabla 10, ver Anexos). Por lo tanto, luego de varias pruebas, se estableció que para que una colonia tuviera suficiente biomasa para dar la formación de pellet, debía tener una absorbancia mínima de 0.4 con mejores resultados a partir de 0.5.

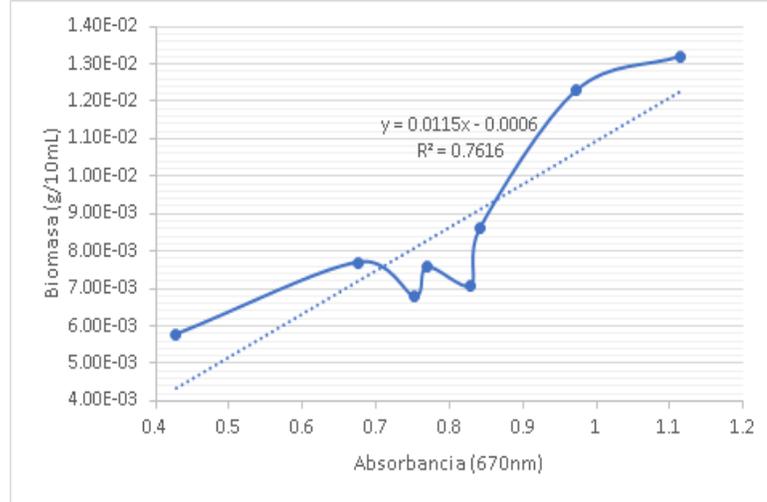
Tabla 5.

Promedio y desviación de las medidas para biomasa y absorbancia.

<i>No.</i>	Absorbancia 670 nm		Biomasa g/10 mL	
	<i>Promedio</i>	<i>Desviación</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación</i>
1	0.428	577E-06	577E-05	5.77E-05
2	0.676	1.36E-16	770E-05	141E-06
3	0.752	0.008	677E-05	153E-06
4	0.769	0.001	757E-05	5.77E-05
5	0.829	0.002	707E-05	5.77E-05
6	0.841	0.002	860E-05	265E-06
7	0.973	0.002	123E-04	141E-06
8	1.115	0.002	132E-04	347E-06

Figura 8.

Regresión lineal para la concentración de biomasa de las microalgas según su absorbancia.



Aplicando los datos obtenidos para la determinación de carbono a los resultados de biomasa seca obtenidos en la relación lineal (ecuación 1), se proyectó la captura de dióxido de carbono que tendrían las microalgas según su concentración representada por la absorbancia de clorofila (Tabla 6). Puesto que la fórmula para la determinación de dióxido de carbono fijado utiliza datos promedio, existe una fuente de incertidumbre representada por la desviación (ecuación 3). Por lo tanto, se utilizaron las fórmulas de propagación de error para determinar la incertidumbre de cada medición a partir de las desviación estándar calculadas (ecuaciones 5 y 6). Como resultado, se generó una regresión lineal que señala la concentración de dióxido de carbono fijado por volumen de cultivo según la absorbancia que presentaron a 670 nm.

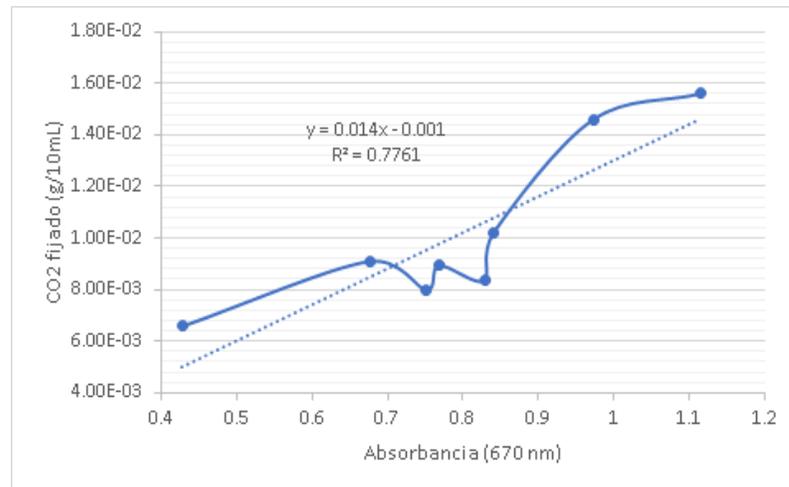
Tabla 6.

Dióxido de carbono fijado por las microalgas según la cantidad de biomasa producida y la absorbancia de clorofila detectada.

No.	CO ₂ (g/10 mL)	Incertidumbre	Absorbancia (670 nm)	Incertidumbre
1	659E-05	9.872E-05	0.428	577E-06
2	911E-05	194E-06	0.676	1.36E-16
3	800E-05	200E-06	0.752	755E-05
4	895E-05	119E-06	0.769	577E-06
5	836E-05	113E-06	0.829	173E-05
6	102E-04	332E-06	0.841	208E-05
7	146E-04	197E-06	0.973	0.002
8	156E-04	411E-05	1.115	252E-05

Figura 9.

Regresión lineal para la concentración de dióxido de carbono fijado en la biomasa de las microalgas según la absorbancia de la clorofila a 670 nm.



6.4 Limpieza de agua residual y alternativa de medio de cultivo

Para determinar el efecto de las microalgas en la limpieza de agua de humedal, se analizó la concentración de nitratos, nitritos y fosfatos, los contaminantes más comunes reportados para este tipo de aguas. Para evitar que otros organismos presentes interfirieran con el crecimiento y metabolismo de las microalgas el agua fue filtrada haciendo uso de membrana estéril de 0.4 μm . Luego, se obtuvo un total de 700 ml de agua residual filtrada, de la cual se utilizaron 90 ml para medir cada contaminantes por triplicado (Tabla 11) usando 10 ml en cada uno según el manual. El resto se dividió en tres cultivos de 200 mL cada uno, para generar tres nuevas colonias a cada una se les agregó 2 ml de la colonia correspondiente al dato número siete en la curva de biomasa vs absorbancia (Tabla 8). Esto permitió determinar la cantidad de biomasa inicial al empezar la colonia multiplicando el volumen usado por la concentración de biomasa detectada. El mismo día que se realizó la extracción de biomasa permitiendo determinar la cantidad de biomasa exacta agregada, así mismo se hizo con los controles correspondientes a otros tres Erlenmeyer con 200 ml de BG-11 en vez de agua.

Los cultivos fueron incubados por 34 días, luego de los cuales se llevó a cabo tanto la extracción de biomasa como la determinación de contaminantes en el caso de los cultivos con agua residual. Los cultivos control presentaron una apariencia sana y frondosa (Figura 18, ver Anexos). Con su biomasa disuelta en el medio se llevó a cabo la extracción de forma rutinaria con centrifugación, decantación y secado en horno. Los cultivos con agua residual, por otra parte, presentaron la característica que toda su biomasa se hallaba pegada al fondo del Erlenmeyer sin nada disuelto (Figura 20, ver Anexos), lo cual se determinó por la apariencia transparente que se observó en los tres cultivos (Figura 19, ver Anexos). Por lo tanto, el proceso de extracción consistió en decantar el medio por completo, conservando el líquido para análisis y separar la biomasa inyectando agua destilada a presión dentro del Erlenmeyer hasta suspender toda la biomasa. Una vez suspendida se procedió a centrifugar, decantar y secar de forma rutinaria. Con el objetivo de evitar que la biomasa libre interfiriera con la determinación de contaminantes, se filtró el medio obtenido de las colonias con agua residual haciendo uso de las dos últimas membranas estériles.

Utilizando los 24 reactivos sobrantes se realizó el análisis de contaminantes en cada Erlenmeyer por triplicado (Tabla 14) los cuales una vez obtenidos se compararon con los del agua residual original (Tabla 11) para dar el porcentaje de reducción de contaminantes. Puesto que el sistema de cultivo es semiabierto las condiciones no son controladas por lo que cada Erlenmeyer fue analizado de forma independiente (Tabla 7) con el objetivo de observar diferencias notables entre cada uno, como también en forma general (Tabla 8) para ver la efectividad de la mezcla de microalgas. Nuevamente se aplicaron las ecuaciones de propagación de error para determinar la incertidumbre de los promedios tanto en los análisis individuales como en el general. En este último, se calculó tanto la incertidumbre del promedio, según desviaciones de los datos, como también la desviación estándar entre las tres mediciones.

Tabla 7.

Promedio de reducción de contaminantes en cada Erlenmeyer por separado.

Reducción de contaminantes (%)						
<i>No.</i>	Fosfatos		Nitratos		Nitritos	
	<i>Promedio</i>	<i>Incertidumbre</i>	<i>Promedio</i>	<i>Incertidumbre</i>	<i>Promedio</i>	<i>Incertidumbre</i>
Erlenmeyer 1	97.07	1.91	97.5	12.42	61.79	19.37
Erlenmeyer 2	96.27	1.53	90.56	11.50	48.57	18.60
Erlenmeyer 3	96.54	1.63	90.83	11.29	3.21	16.53

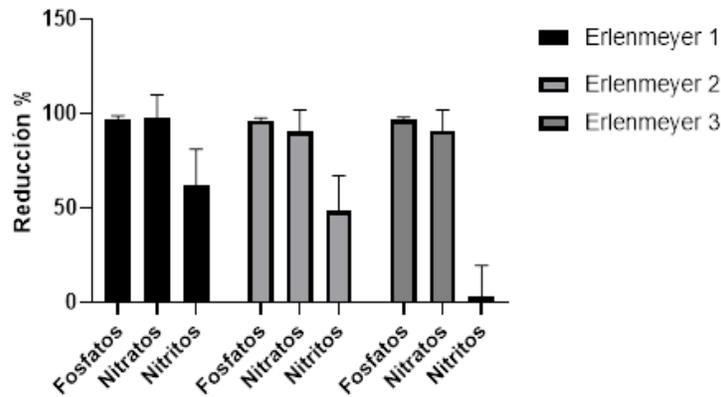
Tabla 8.

Promedio e incertidumbre de la reducción de contaminantes en general.

	Promedio	Incertidumbre	Desviación
<i>Fosfatos</i>	96.62	0.98	0.41
<i>Nitratos</i>	92.96	6.78	3.93
<i>Nitritos</i>	37.86	10.51	30.72

Figura 10.

Disminución de contaminantes en cada Erlenmeyer individual.



Finalmente, se compararon los resultados para la producción de biomasa de los controles con la de la de las colonias en agua residual. Para ello se compararon los pesos de biomasa extraída en cada Erlenmeyer del control con los de cada Erlenmeyer de agua residual (Tabla 13) para obtener su promedio y desviación (Tabla 14). Con base a esto se calculó el porcentaje de biomasa producida por el agua residual en base a lo obtenido en los controles (Tabla 9).

Figura 11.

Comparación de la producción de biomasa en cultivos de BG-11 y agua residual.

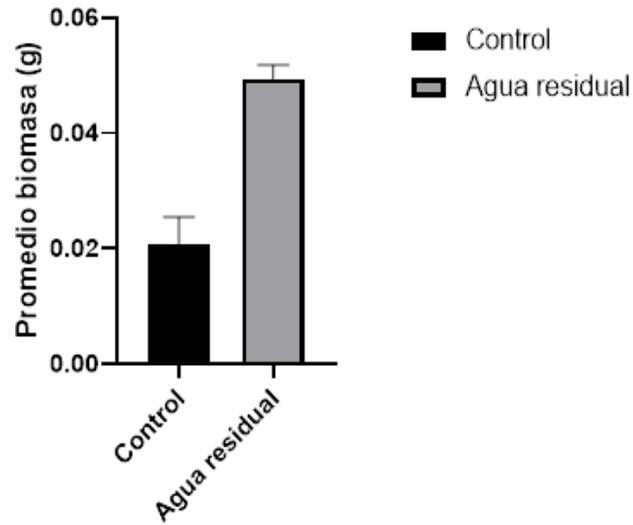


Tabla 9.

Eficiencia del agua residual en producción de biomasa en base a biomasa de controles de BG-11.

Producción de biomasa			
<i>Total%</i>	<i>Incertidumbre</i>	<i>Aumento %</i>	<i>Incertidumbre</i>
238.81	56.03	138.81	40.96

7. Análisis de resultados

Las microalgas son organismos fotosintéticos con la capacidad de capturar grandes cantidades de dióxido de carbono para la generación de biomasa, la cual, a su vez, posee un alto valor comercial debido a sus aplicaciones en industria y biotecnología (Tan et al., 2011). Por lo tanto, son una alternativa viable para la reducción emisiones de carbono como también para la producción de materia prima en masa. Sin embargo, esta capacidad de fijar dióxido de carbono y la efectividad con la que el proceso es llevado a cabo es determinado tanto por la especie como por las condiciones en las que sean cultivadas (Barsanti et al., 2008). Idealmente, al cultivar microalgas para la producción de biomasa y, por lo tanto captura de carbono, se utiliza una cepa pura o mezcla de especies conocidas con el objetivo de tener antecedentes que permitan determinar tanto las condiciones ideales como el efecto del cultivo. Sin embargo, puesto que las microalgas utilizadas para esta investigación fueron obtenidas de una matriz compleja, como lo es un humedal artificial, no fue posible aislar los organismos completamente, sino que se utilizó un consorcio conformado por microalgas nativas del humedal.

Por lo tanto, el proyecto consiste en la generación de un primer antecedente, puesto que no se conoce la especie de microalgas con las que se trabaja; no se tiene una base que permita saber sus características o propiedades. Por lo que uno de los objetivos principales fue la determinación de la capacidad de captura de carbono por las colonias; para lo cual, se hizo uso de análisis elementales de carbono, como de la generación de una curva de absorbancia. La determinación de captura de carbono trabaja sobre el supuesto que todo el carbono detectado en los análisis proviene de la fotosíntesis, y es convertido y conservado en forma de biomasa, la cual pudo ser analizada aun si la extracción no fuera eficiente. Lo cierto es que hay evidencia que demuestra que las microalgas, además de tener capacidad fotosintética, también pueden presentar una vía heterótrofa donde se utilizan fuentes de carbono orgánico presentes (Jareonsin & Pumas, 2021).

Por ello, medios estándar, como el BG-11, contienen una pequeña cantidad de carbono para promover el crecimiento de las microalgas; pero la mayor fuente de carbono alternativo serían los remanentes de las microalgas, luego de pasar por el proceso de muerte celular. La desintegración de la membrana y la liberación del contenido citoplasmático sería utilizada por otras microalgas para promover su crecimiento hasta que la falta de nutrientes provoque su muerte. Este proceso continuaría repitiéndose hasta terminar con la muerte de la colonia entera (Figura 14). Este tipo de cultivo presentó un porcentaje de carbono orgánico mucho menor al detectado para las colonias sanas, lo cual está ligado a la integridad celular de las colonias, ya que gran parte del carbono fijado por las microalgas se conserva dentro del citoplasma por lo que, si la membrana se desintegra, todo el carbono sería liberado al medio donde quedaría perdido puesto que el proceso de extracción solo puede recuperar los sólidos que queden al final.

En cuanto a las colonias sanas, basándonos en la morfología observada (Figura 3) se asume que consisten en una mezcla de los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus*. Sin embargo, al consultar con la literatura, se observa que el porcentaje de carbono detectado para las microalgas, al menos de las especies más comunes, es mayor al detectado por el laboratorio de carbono (Tabla 1). Especies como *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*, las cuales suelen ser las más abundantes, presentan porcentajes de captura de carbono alrededor del 50 % de su peso seco (Lim et al., 2021), una diferencia considerable al 32.29 % obtenido (Tabla 4). Existe tres posibles causas para esta diferencia.

La primera es que las cepas de microalgas que se analizaron son, por naturaleza, menos eficientes en llevar a cabo la captura de carbono ya que su metabolismo no lleva a cabo suficiente fotosíntesis. Esta posibilidad es particularmente fuerte ya que no solo hay cepas de *Chlorella* que presentan resultados similares a los obtenidos (Tabla 1) sino que tampoco hay certeza de la especie exacta de microalgas y la proporción en la que estas se encuentran. Por lo que el contenido de carbono detectado no es representativo para una sola especie, sino que es la contribución de dos organismos diferentes (Valdés-Santiago et al., 2018).

Por otra parte, partiendo de la misma idea de un metabolismo diferente para cada microalga, se tiene que tomar en cuenta que la determinación a partir de carbono orgánico se hace a partir del supuesto de que todo el dióxido de carbono fijado es transformado y

conservado en forma de biomasa sólida. Sin embargo, la evidencia apunta a que las microalgas conservan una gran cantidad de carbono en forma de productos solubles dentro de su citoplasma, muchos de gran valor e interés comercial, (Dolganyuk et al., 2020). En el caso de daño a la membrana, ya sea por muerte celular o por la disrupción de una acción mecánica, estos compuestos escaparían, quedando libres en el medio de cultivo, provocando que pasara lo mismo que en el caso de las colonias viejas, donde habría pérdida de carbono, debido al método de extracción empleado. La diferencia sería el hecho de que, al ser colonias recientes, las células resistirían mejor a la extracción dando menor pérdida de carbono. Las microalgas son capaces de sintetizar lo que serían los compuestos orgánicos volátiles (VOC, por sus siglas en inglés). Como lo indica su nombre estas moléculas toman forma gaseosa y son liberadas al ambiente en forma de gas por lo que no permanecen como parte de la biomasa y, por lo tanto, no pueden ser detectadas por el análisis elemental. Ejemplo de esto, los análisis de balance de masas para carbono en microalgas revelan que, en fotobiorreactores cerrados, un 92 % del dióxido de carbono inyectado es convertido en carbono orgánico gaseoso, representado principalmente por los compuestos orgánicos volátiles. Por otra parte, solo un 1.28% del carbono es transformando en biomasa sólida, lo que hace que una buena del carbono de las microalgas sea irrecuperable en condiciones de cultivo abiertas o semi-abiertas. (Lim et al., 2021 y Deprá et al., 2019).

Como último punto está lo referente a las condiciones de cultivo y su efecto en el crecimiento, proliferación y calidad de las microalgas. En un sistema cerrado, las condiciones se encuentran completamente controladas y monitoreadas, por lo que es fácil saber los cambios que ocurren en el medio y determinar su efecto en las microalgas. Sin embargo, en nuestro caso, esto no fue posible ya que el sistema utilizado corresponde a un tubo de Erlenmeyer, separado de su ambiente por una capa de aluminio y colocado en una incubadora de acceso libre, por lo que se trata de un sistema semi-abierto con agitación solo en caso de las colonias para producción de biomasa (Figura 16). De todas las condiciones asociadas a la fijación de carbono la luz y la agitación son de las más importantes, ya que la primera provee la energía necesaria para el funcionamiento del fotosistema mientras que la segunda acelera el intercambio gaseoso permitiendo mayor concentración de dióxido de carbono soluble en el medio (Tebbani et al., 2020). Aunque se

intentó proveer la agitación necesaria por medio del sistema de bomba de pecera, lo cierto es que, debido al cableado en la incubadora, un timer regulaba el fotoperíodo desconectando la electricidad en la incubadora durante las condiciones de oscuridad lo que, a su vez, provocaba que la agitación solo estuviera activa durante 8 horas al día. Puesto que la fijación del dióxido de carbono como tal se lleva a cabo durante el período oscuro, es durante esta fase que mayor demanda hay por el dióxido de carbono (Sankaran et al., 2018), por lo que es cuando mayor uso de agitación se requiere, haciendo al sistema deficiente en ese aspecto.

La importancia de las condiciones de cultivo se hace más evidente al analizar los resultados para la curva de clorofila-biomasa. En esta, se utilizaron colonias que no poseían agitación por lo que su proliferación y producción de biomasa era mucho menor que la obtenida en los cultivos grandes para extracción de biomasa. La generación de esta curva tenía el propósito de ser utilizada como un modelo para la predicción de biomasa, producida a partir de la concentración de clorofila detectada. Al ser un pigmento fotosintético, su sensibilidad a la luz suele ser bastante alta y estable, por lo que puede llegar a relacionarse con los resultados para la fijación de carbono a manera de predecir cuánto dióxido de carbono sería fijado al momento de escalar un cultivo. Sin embargo, tanto en la curva para biomasa (Figura 4) como en la de dióxido de carbono (Figura 5), se observó desviación de la regresión lineal representado por un coeficiente de correlación de 0.77, lo que significa que, si bien sí hay relación entre ambos valores con la biomasa, no es posible asegurar que la ecuación formulada de resultados certeros.

Dentro de las causas principales, se encuentra el fenómeno de auto floculación presente en las microalgas. Este fenómeno ocurre debido a la secreción de ciertos compuestos conocidos como sustancias poliméricas extracelulares (EPS por sus siglas en inglés), ya que en la naturaleza las microalgas no se mantienen de forma individual, sino que asumen la forma de agregados de varias células representadas por cenobios, biofilms, placas, etc. La secreción de dichas sustancias ocurre de forma natural en las microalgas, sin embargo, puede verse exacerbada por condiciones de estrés en las que estas sean cultivadas. Particularmente, se ha visto el efecto del estrés lumínico, asociado con el fenómeno de fotoinhibición, en el aumento de EPS secretadas, las cuales funcionan como fuente de

energía alternativa, así como presentar habilidad reductora para los ROS (especies reactivas de oxígeno), las cuales son producidas en mayor cantidad bajo condiciones de inhibición por luz (Z. Chen et al., 2021). En las condiciones en las que se llevó a cabo el cultivo de las microalgas los dos factores que se podrían señalar como fuentes principales de estrés serían luz y temperatura. La primera estaba proveída por cuatro lámparas horizontales ubicadas dentro de la incubadora, por lo tanto, cada colonia recibía la luz proveniente de por lo menos dos lámparas de forma directa. Al mismo tiempo, la alta potencia lumínica, proveída por las lámparas, y las condiciones herméticas de la incubadora contribuyeron a generar una temperatura elevada durante la incubación correspondiente a 34°C. Este último factor, temperatura, también está relacionado con la producción y secreción de EPS, ya que la literatura demuestra que a altas temperaturas, la producción de EPS se aumenta como respuesta al estrés térmico siendo una estrategia de protección de las rutas metabólicas (Babiak Krzemińska, 2021).

Esto nos lleva a la conclusión que si bien el foto-período fue establecido para solo 8 horas de luz al día, la intensidad lumínica recibida por las lámparas era lo suficientemente fuerte para generar estrés lumínico, lo que provocó un fenómeno de fotoinhibición, acompañado de estrés térmico derivado del aumento de temperatura debido al exceso de luz, lo que, a su vez, provocaría mayor adhesión en las células debido a la secreción de EPS. Por lo tanto, se puede indicar la secreción de EPS, derivada de condiciones de estrés, como la causa principal de la tasa de precipitación alta observada en las microalgas, lo cual, a su vez, provocó la discrepancia en las mediciones para la curva absorbancia vs biomasa. La secreción de EPS no solo pudo haber generado problemas para medir correctamente el cultivo en la cubeta, también provocaría conglomeración de microalgas en el medio, lo que afectaría la homogeneidad haciendo que las alícuotas tomadas tanto para medición de la absorción como para extracción de biomasa no fuesen iguales entre ellas como tampoco representativas de la concentración real en el medio.

Puesto que el cálculo de fijación de carbono se basa en la cantidad de biomasa detectada, la curva de fijación de carbono (Figura 9) presenta las mismas deficiencias que en la de biomasa (Figura 8), ya que, aunque ambas permiten tener una idea acerca del rendimiento y efectividad de las microalgas en fijar carbono para la producción de biomasa y su correlación con su densidad óptica, no es posible utilizarlos para dar predicciones certeras o asegurar resultados futuros aun utilizando las mismas condiciones.

Otra característica importante del cultivo de microalgas es el medio utilizado para su crecimiento. Este suele ser formulado para proveer de todos los nutrientes esenciales para el crecimiento de las algas, por lo que, ya sea preparado o adquirido, suele representar una buena parte de la inversión necesaria para el cultivo de microalgas. Esto se vuelve particularmente costoso al momento de escalar un cultivo a nivel industrial, por lo que, una de las alternativas principales ha sido el uso de aguas residuales debido a la gran cantidad de contaminantes que contienen. Una buena parte de estos contaminantes corresponden a nutrientes esenciales para el crecimiento de los organismos acuáticos como las microalgas, las cuales, al crecer, remueven los contaminantes del medio dando como resultado la limpieza de la misma agua (Ramos et al., 2018). Por ello, se utilizó agua residual proveniente del humedal artificial de Cementos Progreso en Sanarate, El Progreso, como alternativa de medio de cultivo para el crecimiento de microalgas. Así mismo, el uso de agua residual permitió determinar la capacidad de las microalgas en reducir la concentración de nitratos, nitritos y fosfatos, lo que genera un antecedente sobre la efectividad del agua, como medio de cultivo, como también de la capacidad biorremediadora de la mezcla de microalgas utilizadas.

Debido a limitación de materiales, se hizo una exploración de la capacidad de remediación de las microalgas escogiendo los tres contaminantes más comunes y representativos para las muestras de agua residual, y llevando a cabo un experimento que permitiera generar la mayor cantidad de datos mientras se abarcaban la mayor cantidad de variables involucradas. Por ello, se analizaron los contaminantes en triplicado para el agua recién filtrada asumiendo que esta tendría una concentración homogénea respecto a los compuestos presentes en ella (Tabla 11), sin embargo como se mencionó anteriormente, las condiciones de cultivo corresponden a un sistema semiabierto rudimentario en el cual

aunque se logra tener mayor control y monitoreo de las condiciones a comparación de los sistemas abiertos, estas todavía están sujetas a fluctuaciones las cuales pueden afectar el metabolismo de los organismos y, por lo tanto, los resultados. Por ello, se llevaron a cabo tres cultivos idénticos, los cuales se incubaron bajo las mismas condiciones; a los tres se les llevó a cabo los mismos análisis (Tabla 12), esto con el objetivo de reducir el ruido provocado por las fluctuaciones o variables no controladas durante la incubación para tener un rango más amplio de observaciones que nos permitiera detectar si un resultado se trataba de un punto atípico y si había un patrón asociado a los condiciones que estuviera afectando los resultados obtenidos.

En el caso del fosfato, presentó una reducción de casi el 100 % en los tres cultivos. Los análisis de propagación de error revelan congruencia tanto para las medidas de cada Erlenmeyer (Tabla 7) como para el promedio de los tres en general (Tabla 8) por lo que se puede decir que la variabilidad de las condiciones no es considerable generando poco ruido (Figura 6). A nivel biológico, esto se explica debido a la importancia que tiene el fósforo para el metabolismo de los organismos acuáticos siendo considerado como el nutriente limitante. En el caso de las microalgas, se encuentra adaptadas a las condiciones de baja concentración de fósforo produciendo una alta cantidad de transportadores de alta afinidad. Sin embargo, en el caso de haber un exceso de fósforo, las microalgas en vez de inhibir su transportadores acaparan mayor cantidad de fósforo de la que necesitan con el objetivo de generar reservas en caso de que haya escasez a futuro (Su, 2021). Por lo tanto, se aumenta la tasa de proliferación de las microalgas al mismo tiempo que cada célula acumula este nutriente en sus vacuolas hasta cuatro veces lo requerido por su metabolismo normal, lo que terminara por removerlas del medio, reduciendo su concentración en el agua. Se ha reportado el efecto de la intensidad lumínica la cual puede llevar a inducir una mayor asimilación de fósforo inorgánico (Su, 2021). Por lo tanto, el fósforo fue el contaminante con mayor tasa de remoción debido a la tendencia del metabolismo de las microalgas en acumularlo para futuro, lo que explica el alto porcentaje de reducción para este.

Tanto el nitrato como el nitrito son compuestos derivados del nitrógeno. El segundo es una forma reducida del primero, igual que el fósforo, ambos corresponden a nutrientes esenciales, sin embargo, en el caso del nitrógeno, puede ser adquirido de diferentes fuentes,

incluyendo amonio, urea, pirimidinas, péptidos y peptonas por mencionar algunas. El amonio, nitrato y nitrito son de las formas preferidas de las microalgas para asimilar nitrógeno y suelen tener prioridad en ese mismo orden (Parra, 2006). Tanto el nitrato como el nitrito necesitan de transportadores para ingresar a la célula y estos suelen ser específicos para el nitrato estando en mayor cantidad o bien pueden transportar tanto nitrato como nitrito con mayor afinidad y preferencia al primero (Sanz- Luque et al., 2015). Al analizar la concentración de contaminantes en el agua residual originalmente, se observa una mayor concentración de nitrato que nitrito. Por lo tanto, las microalgas habrán preferido usar el nitrato como fuente de nitrógeno, mientras que el nitrito habrá sido desplazado debido a la saturación de los transportadores a favor del nitrato. Es así que los porcentajes de reducción para el nitrito son bastante bajos puesto que no hubo necesidad de este compuesto para suplir la demanda de nitrógeno. Sin embargo, aunque la variación para los porcentajes de reducción de nitrato no es tan alta, tanto la incertidumbre y la variación son bastante considerables en el caso del nitrito, ya que, como se observa para el análisis de promedio, este último tiene la incertidumbre más alta con 10 y una desviación correspondiente a 30 (Tabla 8). También, las gráficas demuestran una clara diferencia para el porcentaje de reducción de nitritos en los tres casos siendo el tercero el más bajo (Figura 6), lo que representa una reducción casi nula tal y como se demuestra para lo calculado de cada caso (Tabla 7). La razón de una diferencia tan marcada puede deberse en gran medida a las variaciones asociadas al cultivo e incubación de las microalgas. Esto relacionado con lo mencionado al respecto a la adhesión de las células y a la heterogeneidad de los cultivos, significaría que, aunque se agregara la misma cantidad de cultivo a cada Erlenmeyer, cada uno podría no haber tenido la misma cantidad de células. Lo que afectaría no solo la cantidad de células, sino también la proporción entre las especies. Esto se debe a que estamos trabajando con un consorcio compuesto de dos géneros diferentes y especies desconocidas, por lo que puede que haya diferencias significativas en su metabolismo; una proporción diferente de estas dos especies en un cultivo puede verse reflejada en los resultados.

Con base en los resultados para la reducción de contaminantes, se pudo determinar la capacidad de este consorcio de microalgas para limpiar aguas residuales de tres de sus contaminantes principales. Según los parámetros aceptados para los cuerpos de agua lénticos, entiéndase aquellos donde el agua no fluye, una concentración por arriba de 1 mg/L para fosfatos, 30 mg/L para nitratos y 1 mg/L para nitritos son todos síntomas de mala calidad de agua (Ariano, 2016). En el caso del agua de humedal, este superó esos límites para fosfatos y nitratos mientras que los nitritos todavía quedaron en el rango para regular con concentración de 0.21 mg/L a 1 mg/L (Tabla 11). Sin embargo, posterior al cultivo con microalgas, aun cuando el porcentaje de reducción fue bastante alto para fosfatos, siguieron estando presentes en el agua por arriba del límite de 1 mg/L, mientras que los nitratos quedaron en el rango de 10-30 mg/L, correspondiente a calidad regular, y finalmente los nitritos que no presentaron mayor reducción siguen estando en el rango de calidad regular (Tabla 12). Es posible que el tiempo de incubación no haya sido suficiente, por ello, las microalgas no hayan podido remover todos los contaminantes de haberles dado más tiempo. Está el factor de la composición del agua residual, la cual se desconoce, por lo que existe la posibilidad de que hubiera presencia de compuestos que interfieran o disminuyan la efectividad de la limpieza, y así como la posibilidad de que careciera de suficientes minerales y cofactores necesarios para ejecutar el proceso. Por otra parte, se debe tomar en cuenta que para determinar la calidad de agua y, por lo tanto, la eficiencia de las microalgas para la biorremediación, se necesitan considerar otra serie de parámetros asociados como el oxígeno disuelto, conductividad, turbidez y otros contaminantes importantes como los sulfatos (Ariano, 2016).

Un punto de discusión importante es el hecho de que, aunque se detectó conglomeración en las colonias desde un principio, solo los cultivos experimentales presentaron la característica de tener toda la biomasa adherida en el fondo. Esto se relaciona claramente con la secreción de EPS con la diferencia que es mucho más alta que en las colonias control a pesar de haber sido incubadas en las mismas condiciones de pH, temperatura e intensidad lumínica. El factor clave en este caso sería el agua de humedal, la cual ha de contener alguna serie de compuestos que induzcan a las células a formar una capa de biofilm como la observada (Figura 20). Puesto que no se conoce la composición exacta del agua de humedal, no se puede dar una conclusión acerca de qué compuesto en particular

es el responsable o si se trata de la presencia de algún otro organismo de menor tamaño al poro de $0.40\ \mu\text{m}$ que haya pasado junto con el agua, ya que se sabe que ciertos organismos como los hongos son capaces de inducir una mayor secreción de EPS en las algas en un proceso conocido como bio-floculación (Deepa et al., 2023). La adhesión de las microalgas al fondo puede ser una característica beneficiosa que facilite la cosecha de la biomasa al permitir que se concentre en un punto en particular, evitando el uso de membranas y filtros para su separación, como también puede dar problema si la cosecha se lleva a cabo por sistemas automatizados que requieren un flujo constante de biomasa suspendida (Soomro et al., 2016).

Aunque se desconoce la composición del agua residual en su totalidad, el hecho de que posea una gran cantidad de nutrientes de forma natural la convierte en una potencial alternativa al uso de medio estándar para el cultivo de microalgas. Dicho potencial se ve reflejado en la producción de biomasa que presentó en comparación de los controles hechos con BG-11. Al comparar la producción de biomasa de las colonias experimentales, con la de los controles, se observa que las primeras tuvieron una producción de 138% más biomasa que la de los controles. Esto se traduce como una producción total de 238% de la biomasa producida por los controles (Tabla 9). Cabe mencionar que ambos valores presentan una considerable incertidumbre de 40 y 56 unidades respectivamente. Dicha incertidumbre se calculó según las ecuaciones de propagación de error en las que ligeras diferencias en las mediciones originales (Tabla 13) van acumulándose conforme los resultados se utilizan en otras ecuaciones. Aun así, la diferencia entre los cultivos experimentales y los controles es clara por lo que, en términos de productividad, el agua de humedal no solo puede ser utilizada como medio de cultivo alternativo, sino que es más eficiente para la producción y obtención de biomasa en mayor cantidad.

8. Conclusiones

- El uso de microscopía para la identificación de las microalgas solo pudo determinar el género, pero no la especie, de los organismos presentes en el consorcio utilizado para los experimentos.
- Se generó un modelo de regresión lineal para la determinación de biomasa producida por las microalgas en base a la absorbancia de la clorofila a 670 nm de longitud de luz, el cual presentó un coeficiente de correlación de 0.77.
- Se generó un modelo de regresión lineal para la fijación de dióxido de carbono según la absorbancia de la clorofila a 670 nm, el cual se basa en los valores de biomasa utilizados en la primera curva, por lo que el modelo corresponde exactamente a la curva de biomasa con un coeficiente de correlación de 0.77.
- Se asoció la adhesión observada en las microalgas con un aumento en la secreción de EPS debido a factores de estrés entre los cuales se identificó la intensidad lumínica de las cuatro lámparas y temperatura de 34°C para incubación.
- Las microalgas presentaron una alta capacidad para la remoción de fosfato y nitrato, representado por una disminución promedio del 96.62% y 92.96% respectivamente, de la concentración original.
- No se considera que las microalgas hayan sido eficientes en remover nitrito debido al promedio de reducción de 37.86%, además de la alta variación que hubo entre los resultados correspondiente a un 30.72.
- El agua residual demuestra capacidad de ser utilizada como medio de cultivo para las microalgas teniendo un aumento de 138.81% correspondiente a un total de 238.81% de biomasa producida en los controles.

9. Recomendaciones

- Considerando que la morfología es insuficiente para determinar la especie de las microalgas, es necesario llevar a cabo una identificación por medio de técnicas moleculares para la determinación exacta de las especies utilizadas. En particular, se recomienda el uso de secuenciación para genes como el 18s que permitan la identificación de bacterias que puedan estar asociadas por medio de simbiosis.
- Para mejorar las condiciones de cultivo y tener más control sobre las variables, se recomienda hacer uso de un sistema cerrado para el cultivo de las microalgas, el cual incluya agitación constante, tanto para fase clara como oscura, así como cuantificación de parámetros de volumen, flujo de carbono y masa de dióxido de carbono inyectada que permitan la aplicación de ecuaciones y modelos para la determinación de tasa de fijación y productividad de biomasa.
- Debido a la adhesión de las células y a la tasa alta de precipitación, no se recomienda utilizar la absorbancia de clorofila ni ninguna otra técnica que requiera homogeneidad de los cultivos como parámetro para la determinación de biomasa producida por las colonias de microalgas. En cambio, se recomienda optar por la técnica de peso seco de una colonia entera para determinar la producción de biomasa respecto al tiempo.
- Para un perfil más completo de la calidad de agua antes y después de llevar a cabo el cultivo de microalgas, se recomienda determinar la composición exacta del agua. Cuantificar todos los contaminantes presentes en esta y agregar parámetros a su análisis como conductividad, turbidez, oxígeno disuelto, demanda química de oxígeno, demanda biológica de oxígeno y presencia de patógenos.

- Se recomienda eliminar las fuentes de estrés como intensidad lumínica y temperatura elevadas para reducir la secreción de EPS. Esto con el objetivo de obtener un cultivo homogéneo que permita tomar medidas exactas en caso de trabajar con absorbancia y concentración de biomasa.

10. Referencias

- Abed, R. M., Dobretsov, S., & Sudesh, K. (2009). *Applications of cyanobacteria in biotechnology*. Journal of Applied Microbiology, 106(1), 1-12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03918.x>
- Algae, U. C. C. of. (s. f.). *BG-11 Medium*. UTEX Culture Collection of Algae. <https://utex.org/products/bg-11-medium>
- Ayala M., S. (2016). *Clasificación taxonómica de microalgas presentes en un consorcio mi- crobiológico que biorremedia el efluente de una planta de sacrificio de bovinos y porcinos*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4203.1764>
- Babiak, W., & Krzemińska, I. (2021). *Extracellular Polymeric Substances (EPS) as Microalgal Bioproducts: A Review of Factors Affecting EPS Synthesis and Application in Flocculation Processes*. Energies, 14(13), Article 13. <https://doi.org/10.3390/en14134007>
- Barsanti, L., Coltelli, P., Evangelista, V., Frassanito, A. M., Passarelli, V., Vesentini, N., & Gualtieri, P. (2008). *Oddities and Curiosities in the Algal World*. En V. Evangelista, L. Barsanti, A. M. Frassanito, V. Passarelli, & P. Gualtieri (Eds.), *Algal Toxins: Nature, Occurrence, Effect and Detection* (pp. 353-391). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8480-517>
- Ben Ali, A., De Baere, R., Van der Auwera, G., De Wachter, R., & Van de Peer, Y. (2001). *Phylogenetic relationships among algae based on complete large-subunit rRNA sequences*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51(Pt 3), 737-749. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-737>
- Cannons, A. C., & Pendleton, L. C. (1994). *Possible role for mRNA stability in the ammonium- controlled regulation of nitrate reductase expression*. The Biochemical Journal, 297 (Pt 3)(Pt 3), 561-565. <https://doi.org/10.1042/bj2970561>

- Chacón, C., Andrade, C., Cárdenas, C., Araujo, I., & Morales, E. (2004). *Uso de Chlorella Sp. y Scenedesmus Sp. en la remoción de nitrógeno, fósforo y demanda química de oxígeno de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela*. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas, 38(2), Article 2. <https://www.produccioncientificaluz.org/index.php/boletin/article/view/2>
- Chaudhry, Fn. & Malik, Mf. (2017). *Factors Affecting Water Pollution: A Review*. Journal of Ecosystem & Ecography, 07(01). <https://doi.org/10.4172/2157-7625.1000225>
- Chen, K., Ríos, J. J., Pérez-Gálvez, A., & Roca, M. (2017). *Comprehensive chlorophyll composition in the main edible seaweeds*. Food Chemistry, 228, 625-633. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.036>
- Chen, L., Wang, C., Wang, W., & Wei, J. (2013). *Optimal conditions of different flocculation methods for harvesting Scenedesmus sp. Cultivated in an open-pond system*. Bioresource Technology, 133, 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.071>
- Chen, Z., Qiu, S., Yu, Z., Li, M., & Ge, S. (2021). *Enhanced Secretions of Algal Cell-Adhesion Molecules and Metal Ion-Binding Exoproteins Promote Self-Flocculation of Chlorella sp. Cultivated in Municipal Wastewater*. Environmental Science & Technology, 55(17), 11916-11924. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c01324>
- Chisti, Y. (2007). *Biodiesel from microalgae*. Biotechnology Advances, 25(3), 294-306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
- Chu, F., Chu, P.-N., Cai, P.-J., Li, W.-W., Lam, P. K. S., & Zeng, R. J. (2013). *Phosphorus plays an important role in enhancing biodiesel productivity of Chlorella vulgaris under nitrogen deficiency*. Bioresource Technology, 134, 341-346. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.131>
- Corrales, L. C., Arévalo Galvez, Z. Y., & Moreno Burbano, V. E. (2014). *Solubilización de fosfatos: Una función microbiana importante en el desarrollo vegetal*. Nova, 12(21), 67. <https://doi.org/10.22490/24629448.997>

- Dawson, H. N., Pendleton, L. C., Solomonson, L. P., & Cannons, A. C. (1996). *Cloning and characterization of the nitrate reductase-encoding gene from Chlorella vulgaris: Structure and identification of transcription start points and initiator sequences*. *Gene*, 171(2), 139-145. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(96\)00063-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(96)00063-7)
- Deepa, P., Sowndhararajan, K., & Kim, S. (2023). *A Review of the Harvesting Techniques of Microalgae*. *Water*, 15(17), Article 17. <https://doi.org/10.3390/w15173074>
- Deprá, M. C., Mérida, L. G. R., de Menezes, C. R., Zepka, L. Q., & Jacob-Lopes, E. (2019). *A new hybrid photobioreactor design for microalgae culture*. *Chemical Engineering Research and Design*, 144, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2019.01.023>
- Dolganyuk, V., Belova, D., Babich, O., Prosekov, A., Ivanova, S., Katserov, D., Patyukov, N., & Sukhikh, S. (2020). *Microalgae: A Promising Source of Valuable Bioproducts*. *Biomolecules*, 10(8), 1153. <https://doi.org/10.3390/biom10081153>
- El Acuerdo de París | Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (United Nations Framework Convention on Climate Change). (s. f.). <https://unfccc.int/es/acerca-de-las-ndc/el-acuerdo-de-paris>
- Giordano, M., & Raven, J. A. (2014). *Nitrogen and sulfur assimilation in plants and algae*. *Aquatic Botany*, 118, 45-61. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2014.06.012>
- Gould, S. B., Waller, R. F., & McFadden, G. I. (2008). *Plastid evolution*. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 491-517. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092915>
- Hemaiswarya, S., Raja, R., Ravi Kumar, R., Ganesan, V., & Anbazhagan, C. (2011). *Microalgae: A sustainable feed source for aquaculture*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(8), 1737-1746. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0632-z>

- Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). *Microalgae, culture and benefits*. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 157-173. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
- Jacob-Lopes, E., & Franco, T. T. (2013). *From oil refinery to microalgal biorefinery*. *Journal of CO2 Utilization*, 2, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2013.06.001>
- Jareonsin, S., & Pumas, C. (2021). *Advantages of Heterotrophic Microalgae as a Host for Phytochemicals Production*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 628597. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.628597>
- Kargupta, W., Ganesh, A., & Mukherji, S. (2015). *Estimation of carbon dioxide sequestration potential of microalgae grown in a batch photobioreactor*. *Bioresource Technology*, 180, 370-375. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.017>
- Katrcolu, H., Akn, B. S., & Atc, T. (2004). *Microalgal toxin(s): Characteristics and importance*. *African Journal of Biotechnology*, 3(12), 667-674. <https://doi.org/10.5897/AJB2004.000-2128>
- Knuckey, R. M., Brown, M. R., Robert, R., & Frampton, D. M. F. (2006). *Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds*. *Aquacultural Engineering*, 35(3), 300-313. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2006.04.001>
- Lim, Y. A., Chong, M. N., Foo, S. C., & Ilankoon, I. M. S. K. (2021). *Analysis of direct and indirect quantification methods of CO2 fixation via microalgae cultivation in photobioreactors: A critical review*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 137, 110579. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110579>
- Liu, X., & Hong, Y. (2021). *Microalgae-Based Wastewater Treatment and Recovery with Biomass and Value-Added Products: A Brief Review*. *Current Pollution Reports*, 7. <https://doi.org/10.1007/s40726-021-00184-6>

- Masojídek, J., Torzillo, G., & Koblížek, M. (2013). *Photosynthesis in Microalgae*. En Handbook of Microalgal Culture (pp. 21-36). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch2>
- Mathieu-Rivet, E., Mati-Baouche, N., Walet-Balieu, M.-L., Lerouge, P., & Bardor, M. (2020). *N- and O-Glycosylation Pathways in the Microalgae Polyphyletic Group*. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.609993>
- Méndez, L. A. (2023). *Calidad y estado sanitario del agua distribuida para consumo humano en Guastatoya, El Progreso*. *Revista Científica Internacional*, 6(1), 23-34. <https://doi.org/10.46734/revcientifica.v6i1.60>
- Messa Ruiz, J. D. (s. f.). *Microalgas para reducir emisiones de CO₂*—Edición 162— |Revista Universidad EAFIT. <https://www.eafit.edu.co/investigacion/revistacientifica/edicion-162/Paginas/microalgas-para-reducir-emisiones-de-co2.aspx>
- Mollah, M. Y. A., Morkovsky, P., Gomes, J. A. G., Kesmez, M., Parga, J., & Cocke, D. L. (2004). *Fundamentals, present and future perspectives of electrocoagulation*. *Journal of Hazardous Materials*, 114(1), 199-210. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2004.08.009>
- National Aeronautics and Space Administration. (s. f.). *Dióxido de carbono | Signos vitales*. *Climate Change: Vital Signs of the Planet*. <https://climate.nasa.gov/espanol/signos-vitales/dioxido-de-carbono>
- National Centers for Environmental Information. (2023). *Assessing the Global Climate Change in 2022: The globe had its sixth-warmest year on record*. <https://www.ncei.noaa.gov/news/global-climate-202212>
- Onyeaka, H., Miri, T., Obileke, K., Hart, A., Anumudu, C., & Al-Sharify, Z. T. (2021). *Minimizing carbon footprint via microalgae as a biological capture*. *Carbon Capture Science & Technology*, 1, 100007. <https://doi.org/10.1016/j.ccst.2021.100007>

- Owusu, P. A., Asumadu-Sarkodie, S., & Ameyo, P. (2016). *A review of Ghana's water resource management and the future prospect*. Cogent Engineering, 3(1). <https://doi.org/10.1080/23311916.2016.1164275>
- Park, J. B. K., Craggs, R. J., & Shilton, A. N. (2011). *Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production*. Bioresource Technology, 102(1), 35-42. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.158>
- Parra, O. (2006). *Estado de conocimiento de las algas dulceacuícolas de Chile (Excepto Bacilla-riophyceae)*. Gayana (Concepción), 70(1), 8-15. <https://doi.org/10.4067/S0717-65382006000100003>
- Ramos, R.(2018). *Crecimiento y capacidad de bio- rremediación de Chlorella vulgaris (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) cultivada en aguas residuales generadas en el cultivo del pez dorado Seriola lalandi (Perciformes: Carangidae)*. Revista de biología marina y oceanografía, 53(1), 75-86. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572018000100075>
- Rodríguez-Ezpeleta, N., Brinkmann, H., Burey, S. C., Roure, B., Burger, G., Löffelhardt, W., Bohnert, H. J., Philippe, H., & Lang, B. F. (2005). *Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: Green plants, red algae, and glaucophytes*. Current Biology: CB, 15(14), 1325-1330. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.06.040>
- Ruiz-Martínez, A., Serralta, J., Seco, A., & Ferrer, J. (2016). *Modeling light and temperature influence on ammonium removal by Scenedesmus sp. Under outdoor conditions*. Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research, 74(8), 1964- 1970. <https://doi.org/10.2166/wst.2016.383>
- Salgado, E. M., Gonçalves, A. L., Sánchez-Soberón, F., Ratola, N., & Pires, J. C. M. (2022). *Microalgal Cultures for the Bioremediation of Urban Wastewaters in the Presence of Siloxanes*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 19(5), 2634. <https://doi.org/10.3390/ijerph19052634>

- Sankaran, R., Show, P. L., Nagarajan, D., & Chang, J.-S. (2018). *Chapter 19—Exploitation and Biorefinery of Microalgae*. En T. Bhaskar, A. Pandey, S. V. Mohan, D.-J. Lee, & S. K. Khanal (Eds.), *Waste Biorefinery* (pp. 571-601). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63992-9.00019-7>
- Santos, A. B., Fernandes, A. S., Wagner, R., Jacob-Lopes, E., & Zepka, L. Q. (2016). *Biogenesis of volatile organic compounds produced by Phormidium autumnale in heterotrophic bioreactor*. *Journal of Applied Phycology*, 28(3), 1561-1570. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0740-0>
- Sanz-Luque, E., Chamizo-Ampudia, A., Llamas, A., Galvan, A., & Fernandez, E. (2015). *Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae*. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00899>
- Singh, G., & Patidar, S. K. (2018). *Microalgae harvesting techniques: A review*. *Journal of Environmental Management*, 217, 499-508. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.010>
- Smith, V. H. (2009). *Eutrophication*. *Encyclopedia of Inland Waters* (pp. 61-73). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012370626-3.00234-9>
- Soomro, R. R., Ndikubwimana, T., Zeng, X., Lu, Y., Lin, L., & Danquah, M. K. (2016). *Development of a Two-Stage Microalgae Dewatering Process – A Life Cycle Assessment Approach*. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.00113>
- Su, Y. (2021). *Revisiting carbon, nitrogen, and phosphorus metabolisms in microalgae for wastewater treatment*. *Science of The Total Environment*, 762, 144590. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144590>
- Tan, T., Yu, J., & Shang, F. (2011). 2.58—*Biorefinery Engineering*. En M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)* (pp. 815-828). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00138-0>

- Tebbani, S., Lopes, F., Filali, R., Dumur, D., & Pareau, D. (2020). *Biofijación de CO2 por microalgas*. ISTE Group.
- Ummalyma, S. B., Sahoo, D., & Pandey, A. (2020). *Microalgal Biorefineries for Industrial Products*. En *Microalgae Cultivation for Biofuels Production* (pp. 187-195). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817536-1.00012-6>
- United States Environmental Protection Agency. (2013, noviembre 27). *Indicators: Phosphorus [Overviews and Factsheets]*. <https://www.epa.gov/national-aquatic-resource-surveys/indicators-phosphorus>
- Valdés-Santiago, L., Alberto, A., & Colli, J. (2018). *Hacia el reemplazo de pesticidas químicos: Explorando las microalgas para su uso en control biológico*. Fundación para la Educación Superior Internacional, A.C. (pp. 366-381).
- Xia, A., Hu, Z., Liao, Q., Huang, Y., Zhu, X., Ye, W., & Sun, Y. (2018). *Enhancement of CO2 transfer and microalgae growth by perforated inverted arc trough internals in a flat-plate photobio- reactor*. *Bioresource Technology*, 269, 292-299. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.110>
- Xin, L., Hu, H., Ke, G., & Sun, Y. (2010). *Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga Scenedesmus sp.* *Bioresource Technology*, 101(14), 5494-5500. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.016>
- Xu, N., Zhang, X., Fan, X., Han, L., & Zeng, C. (2001). *Effects of nitrogen source and concentration on growth rate and fatty acid composition of Ellipsoidion sp. (Eustigmatophyta)*. *Journal of Applied Phycology*, 13(6), 463-469. <https://doi.org/10.1023/A:1012537219198>
- Xue, S., Su, Z., & Cong, W. (2011). *Growth of Spirulina platensis enhanced under intermittent illumination*. *Journal of Biotechnology*, 151(3), 271-277. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.12.012>

Yang, L., Chen, J., Qin, S., Zeng, M., Jiang, Y., Hu, L., Xiao, P., Hao, W., Hu, Z., Lei, A., & Wang, J. (2018). *Growth and lipid accumulation by different nutrients in the microalga Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1041-z>

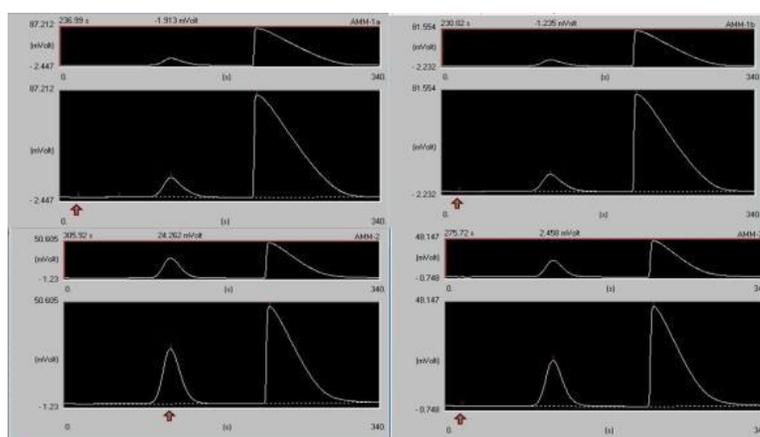
Zamalloa, C., Vulsteke, E., Albrecht, J., & Verstraete, W. (2011). *The techno-economic potential of renewable energy through the anaerobic digestion of microalgae*. *Bioresource Technology*, 102(2), 1149-1158. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.017>

11. Anexos

En esta sección se expone el material extra de la investigación realizada, lo cual incluye, tanto los datos crudos obtenidos en cada experimento previo a su análisis y procesamiento, como fotos e imágenes que proveen contexto sobre las condiciones de cultivo y calidad de las colonias.

Figura 12.

Cromatogramas para el análisis elemental de carbono orgánico en biomasa seca.



Nota. El primer pico corresponde a la detección de nitrógeno mientras que el segundo es para el carbono orgánico. La primera fila corresponde a duplicado de biomasa fresca y la segunda es duplicado de biomasa vieja.

Tabla 10.

Datos originales para las lecturas de absorbancia y biomasa en triplicado.

Absorbancia 670 nm			Biomasa g		
A	B	C	A	B	C
0.428	0.429	0.428	0.0056	0.0055	0.0056
0.768	0.769	0.769	0.0075	0.0076	0.0076
0.971	0.973	0.975	0.0122	0.0124	N/A
0.83	0.83	0.827	0.0071	0.007	0.0071
0.694	0.694	0.695	N/A	N/A	N/A
0.275	0.275	0.277	N/A	N/A	N/A

1.117	1.115	1.112	0.017	0.0124	0.0102
0.842	0.843	0.839	0.0088	0.0083	0.0087
0.676	0.676	0.676	0.0078	0.0076	N/A
0.249	0.25	0.251	N/A	N/A	N/A
0.759	0.753	0.744	0.0068	0.0066	0.0069

Nota. Las casillas con la marca “N/A” representa aquellas biomazas que no pudieron ser recuperadas luego del proceso de extracción.

Tabla 11.

Datos originales para la concentración de contaminantes en agua residual sin tratamiento.

Contaminantes (mg/dL)			
<i>No.</i>	<i>Fosfato</i>	<i>Nitrato</i>	<i>Nitrito</i>
1	21	12	0.09
2	21.4	13	0.11
3	21.4	11	0.08

Nota. Cada contaminante fue medido por triplicado.

Tabla 12.

Datos originales para la concentración de contaminantes en agua residual posterior al cultivo con microalgas.

Contaminantes (mg/dL)			
	<i>Fosfato</i>	<i>Nitrato</i>	<i>Nitrito</i>
<i>Erlenmeyer 1</i>	0.69	0	0.035
	0.35	0	0.034
	0.83	0.9	0.038
<i>Erlenmeyer 2</i>	0.8	1.3	0.045
	0.84	1.3	0.047
	0.74	0.8	0.052
<i>Erlenmeyer 3</i>	0.7	1.2	0.092
	0.88	1	0.088
	0.63	1.1	0.091

Nota. Cada contaminante fue medido por triplicado.

Tabla 13.

Datos originales para la extracción de biomasa en cultivo de BG-11 y agua residual en cada Erlenmeyer individual.

Biomasa (g)			
	Erlenmeyer 1	Erlenmeyer 2	Erlenmeyer 3
<i>Agua residual</i>	0.0488	0.0474	0.0521
<i>Control</i>	0.0255	0.206	0.016

Nota. En este caso el triplicado se ve representado por tres Erlenmeyer para cada tipo de cultivo.

Tabla 14.

Promedio de producción de biomasa seca en controles de BG-11 y agua residual.

Biomasa (g)		
	<i>Promedio</i>	<i>Desviación</i>
<i>Agua residual</i>	0.0494	0.0024
<i>Control</i>	0.0207	0.0048

Nota. Los valores de promedio y desviación se calcularon según los triplicados representados en los tres Erlenmeyer para cada tipo de cultivo.

Figura 13.

Estado inicial de las microalgas antes de llevar a cabo la experimentación.



Figura 14.

Apariencia de las colonias descartadas identificadas como viejas o muertas.



Figura 15.

Obtención de colonias sanas.



Nota. La fila izquierda corresponde a colonias viejas revividas mientras que la fila derecha son cultivos nuevos realizados a partir de las mismas colonias revividas.

Figura 16.

Sistema de aireación proveído por bomba de pecera para cultivos de 500 mL.



Figura 17.

Contaminación observada en las colonias 20 días de iniciar la incubación.



Figura 18.

Controles de microalgas cultivadas en BG-11.



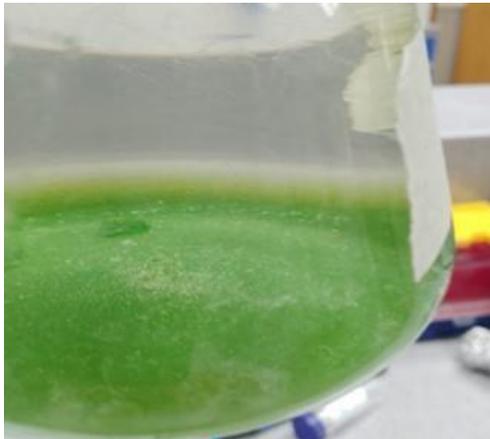
Figura 19.

Incubación de colonias experimentales realizadas con agua residual en diferentes Erlenmeyer.



Figura 20.

Biomasa del cultivo experimental.



Nota. La biomasa se observa adherida al fondo mientras que el medio permanece transparente.