



Universidad de Jaén

Escuela de Doctorado

TESIS DOCTORAL



PRODUCCIÓN DE MICROALGAS UTILIZANDO AGUAS RESIDUALES PROCEDENTES DE UN PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ACEITES DE OLIVA CON DECÁNTER DE DOS SALIDAS

***PRODUCTION OF MICROALGAE USING WASTEWATER
FROM THE OLIVE OIL EXTRACTION PROCESS WITH
DECANTER OF TWO OUTLETS***

Murad Irshied Maaitah

DIRECTORES:

**Dr. D. Sebastián Sánchez Villasclaras
Dr. D. Gassan Hodaifa Meri**

JAÉN, 2020

Trabajo presentado por Murad Irshied Maaitah para
optar al Grado de Doctor por la Universidad de Jaén,
en el Programa de Doctorado 'Aceites de Oliva'

Jaén, Enero de 2020



Fdo.: Murad Irshied Maaitah



**PRODUCCIÓN DE MICROALGAS UTILIZANDO AGUAS RESIDUALES
PROCEDENTES DE UN PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ACEITES DE OLIVA
CON DECÁNTER DE DOS SALIDAS**

**PRODUCTION OF MICROALGAE USING WASTEWATER FROM THE OLIVE OIL
EXTRACTION PROCESS WITH DECANTER OF TWO OUTLETS**

Esta Memoria constituye la Tesis Doctoral y se presenta a la Comisión evaluadora en el Programa de Doctorado 'Aceites de Oliva', en Jaén a 30 de Diciembre de 2019.

Fdo. Murad Irshied Maaitah

**Sebastián Sánchez Villasclaras, Catedrático de Ingeniería Química en la Universidad de Jaén y
Gassan Hodaifa Meri, Profesor Titular de Universidad de Ingeniería Química en la Universidad
Pablo de Olavide de Sevilla**

**Como Tutores de Murad Irshied Maaitah, en la Tesis de Doctoral “Producción de microalgas
utilizando aguas residuales procedentes de un proceso de extracción de aceites de oliva con
decánter de dos salidas”, durante el período 2016-2019.**

INFORMAN: Que la presente Tesis Doctoral ha sido realizada por el Ingeniero Agrónomo, Murad Irshied Maaitah, en los laboratorios del 'Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales' y en el 'Centro de Estudio Avanzados en Olivar y Aceites de Oliva' de la Universidad de Jaén, bajo la dirección de los Dres. D. Sebastián Sánchez Villasclaras, y D. Gassan Hodaifa Meri.

Jaén, 30 de Diciembre de 2019

Fdo. Sebastián Sánchez Villasclaras
Catedrático de Universidad,
Área de Ingeniería Química

Fdo. Gassan Hodaifa Meri
Profesor Titular de Universidad
Área de Ingeniería Química

Extiendo mi agradecimiento y reconocimiento al Dr. D. Sebastián Sánchez Villasclaras y a la Dr. D. Gassan Hodaifa Meri, por ayudarme a lograr este trabajo, y la orientación en la realización de esta memoria.

En especial, muchas gracias a D. Sebastián Sánchez Villasclaras, por acompañarme desde mi llegada al mundo de la investigación. Gracias por su confianza y por su inestimable ayuda sin la cual, este trabajo hubiera sido posible.

Gracias y gratitud al Consejo Oleícola Internacional por apoyar esta investigación y su continuo apoyo en el campo de la investigación científica para el desarrollo del 'Olivar y de los Aceites de Oliva'.

Asimismo, muchas gracias a todos mis compañeros de laboratorio, del 'Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales', del 'Centro de Estudios Avanzados en Olivar y Aceites de Oliva', y de los 'Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación', que de alguna manera han contribuido al desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Murad Irshied Maaitah

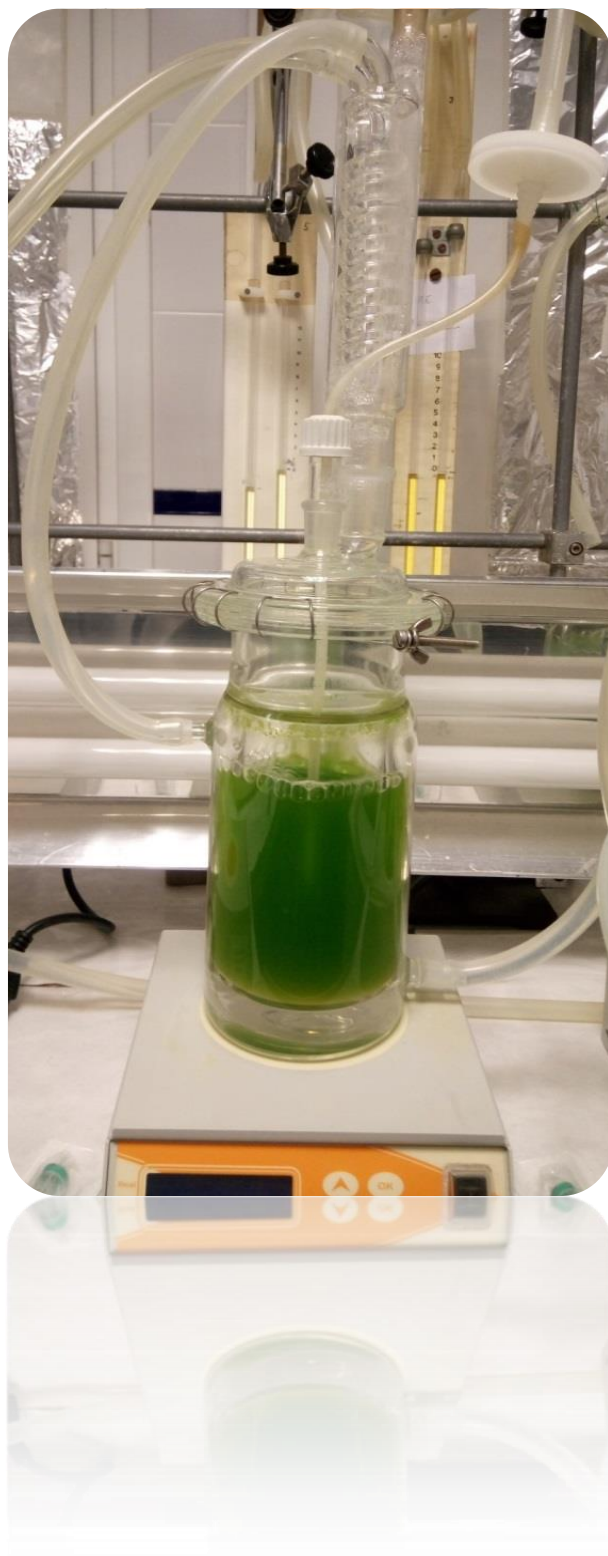
*De forma especial quiero dedicar este trabajo a mi país Jordania
y a mi segundo país, España.*

*También dedico este trabajo a mi esposa Areej, a mi querido hijo Irshied, a
mis hijas, Masah y Zenah.*

A mis padres, mis hermanos Marwan, Safwan y mi hermana Reda'a.

Murad Irshied Maaithah

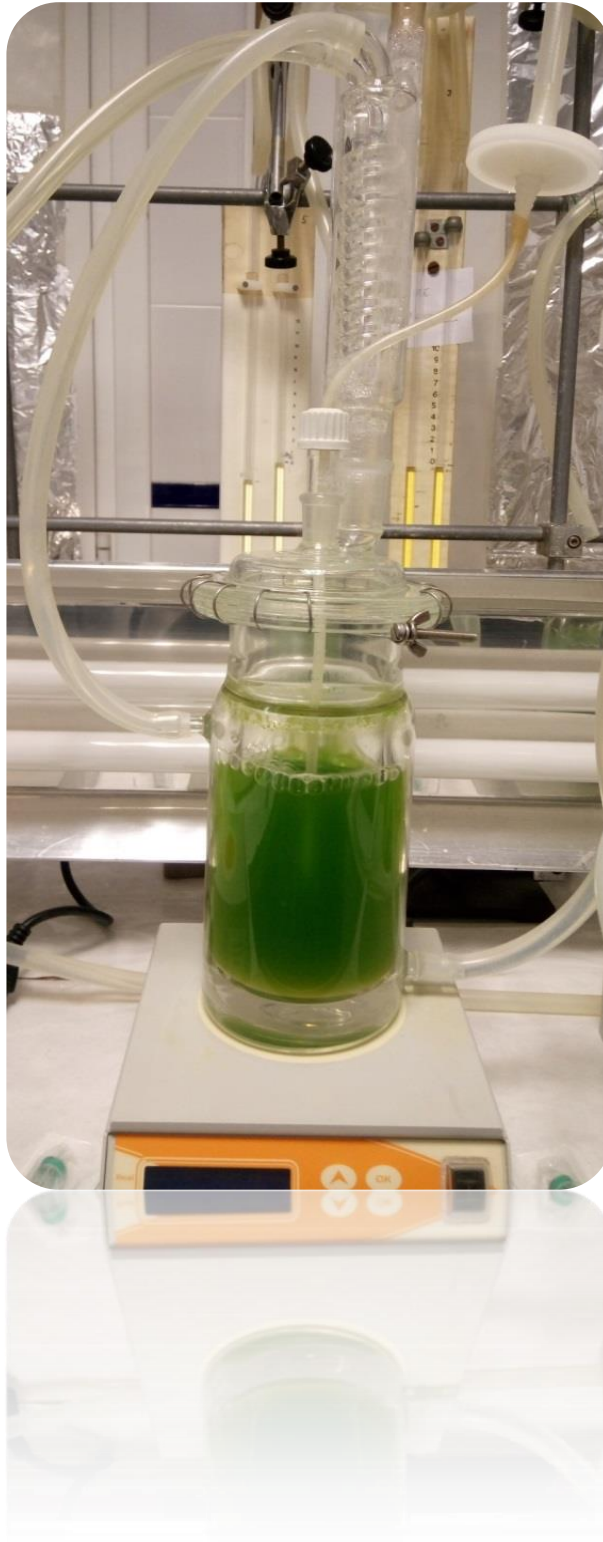
ÍNDICE GENERAL



ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN.....	1
 ABSTRACT.....	7
2. INTRODUCCIÓN.....	11
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	33
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	37
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	71
6. CONCLUSIONES.....	195
7. NOMENCLATURA.....	201
8. ANEXO.....	205

1. RESUMEN



Este trabajo se ha llevado a cabo dentro de la línea de investigación aplicada "Tratamiento de Aguas Residuales de la Industria Oleícola y Biotecnología de Microalgas" del Centro de Estudios Avanzados en Olivar y Aceites de Oliva, y en el Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales, de la Universidad de Jaén. En esta Tesis de Doctoral, se ha estudiado el posible aprovechamiento de los efluentes líquidos procedentes de las almazaras (aguas residuales generadas en el procesos de elaboración de aceites de oliva por centrifugación con decánter de dos salidas) y las depuradoras de aguas residuales urbanas (aguas residuales procedentes de tratamiento secundario) en la producción de biomasa de la microalga *Chlorella pyrenoidosa* y que la biomasa generada en este bioproceso pueda tener una aplicación directa en la generación de compuestos energéticos. Además, la posibilidad de tratar estas aguas residuales y reducir la concentración de dióxido de carbono atmosférico a través de su uso para el crecimiento de microalgas.

Durante el desarrollo de la parte experimental de esta Tesis, se han determinado los parámetros fisicoquímicos de las aguas residuales, tales como pH, conductividad eléctrica, turbidez, oxígeno disuelto, sólidos totales, materia orgánica volátil, cenizas, materia grasa, compuestos fenólicos totales, DBO₅, DQO, nitrógeno total, nitritos, nitratos, amonio, fosfatos, sulfatos, cobre, cloruros y magnesio.

En los cultivos de microalgas, se ha operado con el medio mineral sintético de Rodríguez-López y con aguas residuales reales. En los cultivos con aguas residuales reales, se han elaborado medios de cultivos a base de a) aguas de lavado de aceitunas, b) aguas de lavado de aceites y c) aguas de almazaras (a y b) mezcladas con aguas residuales urbanas procedentes del tratamiento secundario. Se han llevado a cabo cultivos para estudiar el efecto de suministrar CO₂ en la aireación en el rango 1 a 15%. Además, se ha determinado la influencia de la configuración y el régimen de funcionamiento del fotobiorreactor.

En el transcurso de cada cultivo, se han determinado los siguientes parámetros: concentraciones de biomasa, pigmentos y proteínas, además del número de células por unidad de volumen. Al final de cada experimento, se ha separado por centrifugación la biomasa algal del agua final tratada. En la biomasa seca obtenida, se ha determinado el contenido en lípidos totales y la composición en ácidos grasos de la fracción lipídica. En cuanto al agua final obtenida, se ha caracterizado para evaluar su calidad.

Con el medio sintético mineral de Rodríguez-López, se han llevado a cabo dos series experimentales, una modificando el nivel de aeración y otra la temperatura de operación, con objeto de determinar el caudal óptimo de aire y la temperatura óptima para el crecimiento de las microalgas. Con las aguas residuales industriales (aguas de lavado de aceitunas y de lavado de aceites) y urbanas (procedentes de tratamiento secundario), se han llevado a cabo diferentes series experimentales, modificando la concentración de agua residual en el medio de cultivo, la concentración de CO₂ y finalmente la mezcla de aguas residuales de almazaras y aguas residuales urbanas. En todos los experimentos realizados, se ha modificado una sola variable por serie, tomando como cultivo de control, el realizado con un pH inicial del medio de cultivo igual a 8, temperatura de 25°C, concentración inicial de inóculo 10% (respecto al volumen final de fotobiorreactor), velocidad específica de suministro de aire de 1 v/v/min y fotoperiodo luz-oscuridad 12:12 h.

En relación a la cinética del crecimiento, se ha observado que las condiciones de operación del cultivo presentan una clara influencia en la velocidad específica máxima de crecimiento, μ_m (h^{-1}), y en la productividad de biomasa, P_b ($\text{g dm}^{-3}\text{h}^{-1}$), de *C. pyrenoidosa*.

En relación al medio de cultivo mineral sintético de Rodríguez-Lopez (R-L), cabe destacar que la variación de la temperatura sobre μ_m (h^{-1}), se ha ajustado al modelo de Moser (1985), determinando una temperatura óptima de crecimiento de $26,9^\circ\text{C}$. Para la velocidad específica de suministro de aire, los valores obtenidos de μ_m (h^{-1}), se han ajustado a una ecuación tipo polinómica, determinando la velocidad específica de suministro de aire que origina un valor máximo de $Q_{\text{máx}}$ igual a $1,46 \text{ v/v/min}$. En este punto, se puede indicar que experimentalmente 25°C y la velocidad específica de suministro de aire 1 v/v/min son los valores más favorables para el crecimiento de *C. pyrenoidosa* con el medio de cultivo de R-L.

Cabe indicar que la concentración de aguas de lavado de aceitunas del 50% (v/v) en el medio de cultivo es la que proporcionó un valor mayor de la velocidad específica máxima de crecimiento ($\mu_m = 0,036 \text{ h}^{-1}$). Sin embargo, cuando se utilizan aguas de lavado de aceites es una concentración del 30% (v/v) la que proporciona el valor más elevado de μ_m , $0,028 \text{ h}^{-1}$. Por otra parte, en las distintas series experimentales realizadas, las aguas residuales urbanas de tratamiento biológico, se han mezclado con el agua producida en almazaras. Específicamente, el valor más alto de la velocidad específica máxima de crecimiento ($\mu_m = 0,035 \text{ h}^{-1}$), fue con 50% de aguas de lavado de aceitunas mezcladas con 50% de aguas residuales urbanas.

En relación a la concentración de dióxido de carbón, y para ambas tipos de aguas de almazaras, 10% de CO_2 (en la fase gas que se introduce en el fotobiorreactor), fue la proporción más favorable para el crecimiento de *C. pyrenoidosa*. Se han calculado valores mayores de la velocidad específica máxima de crecimiento cuando se utilizan 50% (v/v) de aguas de lavado de aceitunas, $\mu_m = 0,032 \text{ h}^{-1}$, y 30% (v/v) de aguas de lavado de aceites, $\mu_m = 0,033 \text{ h}^{-1}$. También, cuando se utilizan las mejores condiciones experimentales para el crecimiento de *C. pyrenoidosa*, (temperatura 25°C , nivel de aeración 1 v/v/min , concentración 50% (v/v) de aguas de lavado de aceitunas, 30% (v/v) de aguas de lavado de aceites y el resto aguas residuales urbanas de tratamiento secundario, utilizadas como medio de cultivo, y 10% de dióxido de carbono en la fase gaseosa que se introduce en el fotobiorreactor), se han determinado valores de la velocidad específica máxima de crecimiento y productividad volumétrica en biomasa $\mu_m = 0,0322 \text{ h}^{-1}$ y $P_b = 0,00435 \text{ g dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$, muy próximos a los anteriormente indicados.

En relación con la composición bioquímica de la biomasa, se observa en forma general que en el transcurso de cada experimento, los valores de las concentraciones de proteínas y pigmentos son diferentes.

En el medio sintético de Rodríguez-López, se observó la máxima concentración de biomasa, $1,94 \text{ g dm}^{-3}$ determinada a una temperatura de 20°C y con un nivel de aeración 1 v/v/min . Por otra parte, las mayores velocidades específicas máximas y productividades volumétricas en formación de pigmentos y en proteínas, se han obtenido en la serie realizada para estudiar la influencia de la velocidad específica de suministro de aire, concretamente a $Q = 1 \text{ v/v/min}$ y a temperatura 25°C ; así mismo en estas condiciones

el contenido de lípidos totales fue 48,8% de biomasa seca. Sin embargo, el porcentaje en proteínas crudas, a nivel de aeración 1,5 v/v/min fue más alto, 46,1%. En cuanto a la composición en ácidos grasos, se observa en general que los porcentajes de poliinsaturados presentaron los mayores valores, 52,0%, a $Q = 0,5$ v/v/min y a temperatura 25°C. Sin embargo, los porcentajes de los ácidos grasos saturados más elevados se determinaron a $Q = 1$ v/v/min y a temperatura 15°C. La composición elemental de la biomasa recolectada en todos los experimentos presentó el mayor contenido de nitrógeno 7,38%, a temperatura 25°C y un nivel de aeración de 1,5 v/v/min, mientras que la relación C/N más elevada, 13,7%, se obtuvo a temperatura de 15°C y nivel de aeración de 1 v/v/min.

Por otra parte, cuando se modifica la proporción de aguas de lavado de aceitunas, aguas de lavado de aceites y aguas residuales urbanas de tratamiento secundario en el medio de cultivo, y la concentración de CO₂ en la fase gas de entrada al fotobiorreactor, se ha observado una variación significativa en la composición bioquímica de la biomasa formada al final del cultivos.

El valor de la concentración de biomasa más elevada, 1,60 g dm⁻³, fue en el cultivo de 30% de aguas de lavado de aceites y 10% de CO₂. Por otra parte, las mayores velocidades específicas máximas en formación de pigmentos se alcanzaron en el medio con 100% de aguas de lavado de aceitunas, mientras la mayor velocidad específica máxima en formación de proteína se obtuvo en el cultivo de 50% de aguas de lavado de aceitunas mezcladas con aguas residuales urbanas de tratamiento secundario. Sin embargo, cuando se utilizan aguas de lavado de aceites en una concentración del 30% y el resto aguas residuales urbanas de tratamiento secundario, se alcanza el valor más elevado en proteínas crudas, 46,6%.

En relación con el contenido de lípidos totales, cabe resaltar que el contenido en lípidos aumenta con el incremento de la proporción de los dos tipos aguas de almazaras y con el de agua residual urbana procedente del tratamiento secundario en el medio de cultivo. El porcentaje más elevado de lípidos totales en todos los cultivos fue, 50,0%, en la biomasa obtenida en el cultivo realizado usando aguas de lavado de aceites al 100%. En todos los cultivos, el perfil de ácidos grasos de la fracción lipídica de la biomasa mostró mayor porcentaje en ácidos grasos poliinsaturados, especialmente, se alcanza el valor más alto, 47,1%, en el cultivo que contenía aguas de lavado de aceites al 30%. Cabe indicar que los porcentajes más elevados de los ácidos grasos saturados se alcanzan en los cultivos con concentraciones de 5% de ambos tipos de aguas residuales.

Además, cabe señalar que en la composición elemental de la biomasa recolectada en todos los experimentos, el mayor contenido de nitrógeno detectado fue 7,46%, en el cultivo con 30% de aguas de lavado de aceites mezcladas con aguas residuales urbanas de tratamiento secundario. Para la relación C/N, en general, se ha observado que esta aumenta cuando se utiliza dióxido de carbono, determinándose el valor más alto, 12,8, en cultivos que contenían 30% de aguas de lavado de aceites y 15% de CO₂.

Las condiciones de operación más favorables para la producción de biomasa de microalgas, se han fijado considerando los valores más elevados de la velocidad específica máxima de crecimiento y productividad, junto con una composición equilibrada de la biomasa en pigmentos, proteínas y ácidos grasos. Estos objetivos se cumplen en el cultivo realizado con un 50% de aguas de lavado de aceitunas,

30% de aguas de lavado de aceites mezcladas con aguas residuales urbanas de tratamiento secundario y 10% de dióxido de carbono.

Finalmente, y como otro objetivo en esta Tesis de Doctorado, se ha determinado el porcentaje de reducción de los parámetros fisicoquímicos en el agua tratada y obtenida después del bioproceso. En general, se observó que la microalga *C. pyrenoidosa*, tenía capacidad para el tratamiento de las aguas residuales de almazaras y las aguas residuales urbanas. En todos los cultivos, se ha obtenido una reducción en todos los parámetros, y por otra parte se produjo una fuerte generación de oxígeno molecular. En las condiciones más favorables para el crecimiento de *C. pyrenoidosa*, el porcentaje en la reducción de contaminantes después del bioproceso fue: en DQO, 89,0%, en nitrógeno total 97,2% y en compuesto de fenólico 90,1%. Sin embargo, se observó una reducción en el contenido de fosfato de sólo el 64,3%, y este porcentaje de disminución es menor que el obtenido en los cultivos sin mezclar aguas de almazaras con aguas residuales urbanas. Por otra parte, la generación de oxígeno molecular fue próxima al 100%.

En resumen, cabe señalar que el uso de aguas residuales de almazaras y aguas residuales urbanas, como medio de nutriente líquido para el crecimiento de algas unicelulares, y la adición de dióxido de carbono, permite tratar estas aguas residuales y reutilizarlas nuevamente. Paralelamente, se puede obtener energía de la fracción lipídica que se genera con las algas ya que de los resultados experimentales obtenidos, los perfiles de ácidos grasos generados pueden ser utilizados en la producción de biodiesel.

This work has been carried out within the applied research line "Treatment of Olive Oil Mill Wastewaters and Biotechnology of Microalgae" of the Center of Advanced Studies in Olive Grove and Olive Oils, and in the Department of Chemical, Environmental and Materials Engineering, of the University of Jaén. In this Doctoral Thesis, it has studied the possible use of liquid effluents of olive oil mills (olive oil mill wastewaters generated in centrifugation olive oil production processes using decanter with two outlets) and urban wastewater treatment plants (wastewater from secondary treatment) in the biomass production of *Chlorella pyrenoidosa*. The biomass generated in this bioprocess has a direct application in the generation of energy compounds. In addition, the possibility to treated these wastewaters and reduce the atmospheric carbon dioxide concentration through its use for algae growth.

During the development of the experimental part of this Thesis, the physicochemical parameters of wastewater have been determined, such as pH, electrical conductivity, turbidity, dissolved oxygen, total solids, volatile organic matter, ashes, fatty matter, total phenolic compounds, BOD₅, COD, total nitrogen, nitrites, nitrates, ammonium, phosphates, sulfates, copper, chlorides and magnesium.

In microalgae cultivation, the synthetic mineral medium of Rodríguez-López and real wastewaters has been used. In cultures with real wastewaters, culture media have been developed based on a) olive washing wastewater, b) olive oil washing wastewater and c) wastewaters from olive oil mills (a and b) mixed with urban wastewater from secondary treatment. Cultures have been carried out to study the effect of providing CO₂ in aeration in the range of 1 to 15%. In addition, the influence of the configuration and the operating regime of the photobioreactor has been determined.

During the course of each culture, the following parameters have been determined: concentrations of biomass, pigments and proteins, as well as the number of cells per unit volume. At the end of each experiment, the algal biomass has been separated by centrifugation from the final treated water. In the obtained dry biomass, the total lipid content and the fatty acid composition of the lipid fraction have been determined. As for the final treated water obtained, it has been characterized to evaluate its quality.

With the synthetic mineral medium of Rodríguez-López, two experimental series have been carried out, one modifying the level of aeration and the other the operating temperature, in order to determine the optimum air flow and temperature for the growth of microalgae. With industrial wastewater (olive and olive oil washing wastewaters) and urban wastewater (from secondary treatment), different experimental series have been carried out, modifying the concentration of wastewater in the culture medium, the concentration of CO₂ and finally the mixture of olive oil mill wastewaters and urban wastewater. In all the experiments carried out, only one variable per series has been modified, taking as control culture that carried out at an initial pH equal to 8, temperature of 25°C, initial concentration of inoculum 10% (with respect to the final volume of the photobioreactor), specific air supply rate of 1 v/v/min and light-dark photoperiod 12:12 h.

In relation to the growth kinetics, it is observed that the operating conditions have a clear influence on the maximum specific growth rate, μ_m (h⁻¹), and on biomass productivity, P_b (g dm⁻³h⁻¹), of *C. pyrenoidosa*.

Regarding to the mineral synthetic culture medium of Rodriguez-Lopez (R-L), it should be noted that the variation in temperature versus μ_m (h^{-1}) has been adjusted to the Moser model (1985), determining an optimal growth temperature of 26.9°C . For the specific air supply rate, the values obtained of μ_m (h^{-1}) have been adjusted to a polynomial equation, determining the specific air supply rate that originates a maximum value for $Q_{\max}$ equal to 1.46 v/v/min . At this point, it can be indicated that experimentally 25°C and 1 v/v/min for specific air supply rate are the most favorable values for *C. pyrenoidosa* growth in the R-L culture medium.

It should be noted that the concentration of 50% (v/v) of olives washing wastewater in the culture medium was provided the highest value for the maximum specific growth rate ($\mu_m = 0.036 \text{ h}^{-1}$). However, when olive oil washing wastewater is used, the concentration of 30% (v/v) was provided the highest value for μ_m , 0.028 h^{-1} . On the other hand, for the different experimental series carried out, the urban wastewater with biological treatment has been mixed with wastewaters produced in olive oil mills. Specifically, the highest value for the maximum specific growth rate ($\mu_m = 0.035 \text{ h}^{-1}$) was obtained in the culture medium formed by 50% of olives washing wastewater mixed with 50% of urban wastewater.

Regarding carbon dioxide concentration, and for both olive and olive oil washing wastewaters, 10% of CO_2 (in gas phase that introduced into the photobioreactor), was the most favorable proportion for *C. pyrenoidosa* growth. It have been obtained greater values for the maximum specific growth rate when 50% (v/v) of olive washing wastewater, $\mu_m = 0.032 \text{ h}^{-1}$ and 30% (v/v) of olive oil washing wastewater, $\mu_m = 0.033 \text{ h}^{-1}$ were used. Also, with the best operating conditions for *C. pyrenoidosa* growth (temperature 25°C and aeration supply rate 1 v/v/min) in culture medium formed by 50% (v/v) of olives washing wastewater, 30% (v/v) of olive oil washing wastewater and the rest by urban wastewater from secondary treatment. It is not to mention, the gas phase introduced to the photobioreactor was enriched with 10% of carbon dioxide. In these operating conditions the maximum specific growth rate ($\mu_m = 0.0322 \text{ h}^{-1}$) and volumetric biomass productivity ($P_b = 0.00435 \text{ g dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$) were determined. These values are next to that mentioned previously.

With respect to the biochemical composition of biomass, in general, it observed that over the course of each experiment, the values of protein and pigments concentrations are different.

In the mineral synthetic culture medium of Rodríguez-López, the maximum biomass concentration obtained, 1.94 g dm^{-3} , determined at 20°C and 1 v/v/min . On the other hand, the highest maximum specific velocities and volumetric productivities in pigments and proteins formation were obtained in the experimental set, which studied the aeration influence. Specifically, at $Q = 1 \text{ v/v/min}$ and 25°C , as well as, under these conditions, the total lipid content was 48.8% of dry biomass. However, the percentage of crude proteins at 1.5 v/v/min was higher, 46.1%. Regarding fatty acids profiles, in general, it observed that the percentages of polyunsaturated fatty acids had the highest value, 52.0% at $Q = 0.5 \text{ v/v/min}$ and 25°C . However, the highest percentages of saturated fatty acids were determined at $Q = 1 \text{ v/v/min}$ and 15°C . The elemental composition of the harvested biomass, in all the experiments, showed greater nitrogen content 7.38%, at 25°C and 1.5 v/v/min , although the highest C/N ratio, 13.7%, was obtained at 15°C and 1 v/v/min .

On the other hand, when the proportion of olives washing wastewater, olive oil washing wastewater and urban wastewater from secondary treatment in the culture medium, and the CO₂ concentration in the gas phase introduced to the photobioreactor are modified, it has observed a significant variation in the biochemical composition of the final biomass obtained at the end of the experiment.

The highest biomass concentration value, 1.60 g dm⁻³, was obtained in the culture with 30% of olive oil washing wastewater and 10% of CO₂. On the other hand, the highest maximum specific rates in pigment formation were achieved in the culture with 100% olives washing wastewater, whereas the highest maximum specific rate in protein formation was obtained in the culture with 50% of olives washing wastewater mixed with urban wastewater from secondary treatment. However, when the culture medium was formed by 30% (v/v) of olive oil washing wastewater and the rest with urban wastewater from secondary treatment. The highest percentage in crude proteins, 46.6%, was achieved.

Regarding the total lipid content, it should be noted that the lipid content increase with the augment of the proportion of the two olive oil mill wastewaters types, and with the proportion of the urban wastewater from secondary treatment in the culture medium. The highest total lipids percentage, in all cultures, was 50.0% of dry biomass, obtained in culture with olive oil washing wastewater without dilution. In all experiments, fatty acid profile of the biomass lipid fraction showed highest percentage of polyunsaturated fatty acids. The highest value achieved, 47.1%, in the culture formed by 30% (v/v) of olive oil washing wastewater. It should be noted that the highest percentages of saturated fatty acids are reached in cultures formed with 5% (v/v) of both olive oil wastewaters.

In relation to the elemental composition of the biomass harvested in all experiments, the highest content of nitrogen, 7.46%, was detected in the culture with 30% (v/v) of olive oil washing wastewater mixed with urban wastewater from secondary treatment. In general, the C/N ratio increased when carbon dioxide is used. In this sense, the highest value registered, 12.8, in cultures that contained 30% (v/v) of olive oil washing wastewater and 15% of CO₂.

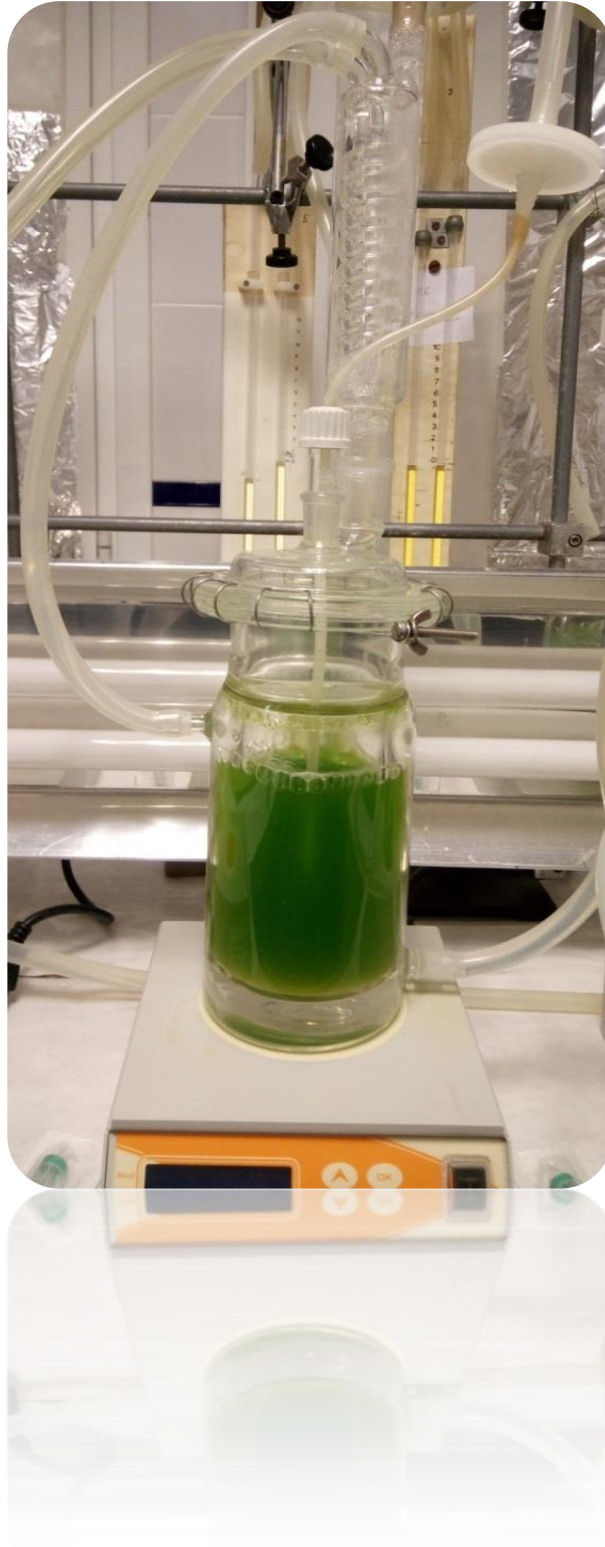
The most favorable operating conditions for the biomass production of microalgae have been established, considering the highest values of the maximum specific growth rate and the volumetric biomass productivity, together with a balanced biomass composition in pigments, proteins and fatty acids. These objectives are met in the culture carried out with 50% of olives washing wastewater, 30% of olive oil washing wastewater mixed with urban wastewater from secondary treatment and 10% of carbon dioxide.

Finally, as another goal in this Doctoral Thesis, the reduction percentages of the physicochemical parameters in the final water treated after the bioprocess have been determined. In general, the capacity of *C. pyrenoidosa* to treated wastewaters from olive oil mills and urban stations plants was observed. In all cultures, a reduction in the values of all physicochemical parameters was obtained, plus a strong O₂ generation. Under the best operating conditions for *C. pyrenoidosa* growth, the reduction percentages in physicochemical parameters after the bioprocess were COD 89.0%, total nitrogen 97.2% and total phenolic compounds 90.1%. However, a reduction in the phosphate content equal to 64.3% was observed.

This reduction percentage is less than that obtained in cultures without olive oil mill wastewaters and urban wastewater mixing. On the other hand, the generation of molecular oxygen was close to 100%.

In brief, it should be noted that the use of olive oil mill wastewaters and urban wastewater, as culture media for unicellular algae growth, and the addition of carbon dioxide allows the treatment of these wastewaters and its reuse again. In parallel, it could be obtained energy from the lipid fraction of the microalgae biomass generated, since from the experimental results achieved the fatty acids profiles generated could be used for biodiesel production.

2. INTRODUCCIÓN



ÍNDICE

2. INTRODUCCIÓN

2.1 BIOPROCESOS CON MICROALGAS.....	15
2.1.1 Forma de nutrición.....	15
2.1.2 Factores que afectan a los bioprocesos.....	16
2.1.2.1 Medio de cultivo.....	16
2.1.2.2 Variables de operación.....	17
2.1.3 Producción de biomoléculas específicas.....	18
2.1.3.1 Proteínas unicelulares.....	18
2.1.3.2 Pigmentos.....	19
2.1.3.3 Ácidos grasos poliinsaturados.....	20
2.1.4 Producción de energía.....	20
2.1.4.1 Producción de hidrógeno.....	20
2.1.4.2 Producción de biodiesel.....	21
2.1.5 Obtención de otros compuestos de alto valor añadido.....	21
2.2 CINÉTICA DEL CRECIMIENTO Y PARÁMETROS DE RENDIMIENTO	23
2.2.1 Velocidad específica máxima de crecimiento.....	23
2.2.2 Productividad volumétrica en biomasa.....	23
2.2.3 Modelos cinéticos.....	23
2.2.4 Rendimientos en biomasa.....	24
2.3 DEPURACIÓN DE AGUAS RESIDUALES Y UTILIZACIÓN DE MICROALGAS	25
2.3.1 Características de las aguas residuales de almazaras.....	25
2.3.2 Características de las aguas residuales urbanas.....	26
2.3.3 Antecedentes del uso de microalgas en el tratamiento de aguas.....	27
2.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

2.1 BIOPROCESOS CON MICROALGAS

Las algas son un grupo versátil y omnipresente de organismos fotosintéticos que van desde formas unicelulares a multicelulares. Se encuentran de forma natural en el océano, cuerpos de agua dulce, rocas, suelos y vegetación (Chen *et al.* 2008). Las algas se dividen en dos grupos, macro y microalgas (Fitzgerald *et al.* 2011). Las microalgas son unicelulares y pueden ser tipo agua dulce o agua salada, además se encuentran en el suelo y en la vegetación (Aresta *et al.* 2005).

El escalado de la biotecnología de microalgas a nivel industrial es muy importante. Actualmente, se reconoce la importancia de las distintas especies por su adaptabilidad a distintas condiciones de crecimiento y sus propiedades nutritivas. En los últimos años, se han logrado avances importantes en la utilización de las microalgas para diversos fines, tales como:

- i) Alimento para el consumo humano y animal.
- ii) En acuicultura, para alimentar a los microorganismos pluricelulares (Rotífero y Artemia) que alimentan a las larvas de los peces que son esenciales para la producción de peces en piscifactoría.
- iii) Como fertilizantes nitrogenados en la agricultura.
- iv) Para la producción de espesantes como carragenina y agar.
- v) Producción de pigmentos de uso alimentario, con propiedades funcionales y antioxidantes.
- vi) Como suplemento alimenticio a la dieta.
- vii) En el tratamiento de las residuales aguas y producción de biocombustibles.

Estas minúsculas fábricas biológicas, aprovechan la energía de la naturaleza mediante la fotosíntesis y duplican su biomasa en poco tiempo mediante su crecimiento exponencial (Chisti, 2007; Louime *et al.* 2012). En definitiva, pueden crecer rápidamente y producir una biomasa con una composición bioquímica de alto valor añadido, permitiendo una cosecha importante con diversas aplicaciones de alto interés para la sociedad.

2.1.1 Forma de nutrición

En función de las fuentes de carbono y energía disponibles, las microalgas tienen diferentes tipos de nutrición, siendo los principales:

- Autotrófico: en este crecimiento las microalgas utilizan el CO₂ como fuente de carbono y la luz solar como fuente de energía. La disponibilidad de un medio de cultivo formado a base de compuestos inorgánicos, la luz solar y una aireación natural o suministrando gas CO₂ puro permiten un crecimiento fotoautotrófico de las microalgas (Zaslavskaja *et al.* 2001).
- Heterotrófico: en este crecimiento se desarrolla en oscuridad y utiliza los compuestos orgánicos como fuentes de carbono y energía.
- Mixotrófico: se trata de crecimiento mixto y la fuente de carbono puede ser gas CO₂ y compuestos orgánicos de forma simultánea, mientras la fuente de energía será la luz solar (Kaplan *et al.* 1986).

2.1.2 Factores que afectan a los bioprocesos

El cultivo de microalgas a gran escala persigue la obtención de grandes cantidades de un producto de valor, por tanto, la productividad del proceso debe ser máxima. Para alcanzar este objetivo, es crítica la comprensión de los factores que determinan el crecimiento celular óptimo: medio de cultivo, intercambio de gases, pH, temperatura y régimen de iluminación. El conocimiento de estos factores posibilita el diseño de un proceso para conseguir una composición celular determinada, en otras palabras, dirigir el metabolismo del microorganismo hacia la producción del compuesto o compuestos deseados (Hu, 2004).

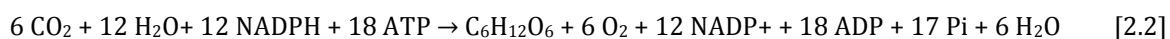
La fotosíntesis es el proceso fotobiológico fundamental, donde se utiliza la energía de una fuente luminosa, como el sol y se transforma en energía química, siendo el adenosin trifosfato (ATP) la primera molécula donde se almacena la energía (Krause y Weis, 1991). La fotosíntesis se desarrolla en dos fases: luminosa y oscura.

La fase luminosa es un proceso que depende de la luz, donde se llevan a cabo las reacciones fotosintéticas de transferencia de electrones y donde la energía derivada de la luz (los fotones) activa los electrones del centro de reacción de la clorofila "a". Esto permite que los electrones del centro de reacción se desplacen a lo largo de una cadena de óxido-reducción de la membrana tilacoidal, provocando la oxidación del centro de reacción. Para recuperar los electrones perdidos, la clorofila "a" obtiene sus electrones de la biofotólisis del agua, lo cual produce la liberación de O₂ al medio. Este proceso de transporte electrónico bombea protones de H⁺ a través de la membrana tilacoidal hacia el interior, la fuerza protón-motriz resultante impulsa el proceso de síntesis de ATP en el estroma. Al mismo tiempo, las reacciones de transporte electrónico generan electrones de alta energía, junto con H⁺, que transforman el NADP⁺ en su forma reducida NADPH.

La segunda fase de la fotosíntesis, se conoce como las reacciones oscuras o reacciones de fijación de carbono. Estas reacciones son independientes de la luz y se realizan cuando los productos de las reacciones luminosas son utilizados para sintetizar carbohidratos a partir de la fijación de CO₂, en un proceso denominado Ciclo de Calvin. Para ello, es necesario que la fuente de energía (ATP) y el poder reductor (NADPH) producidos en las reacciones fotosintéticas de transferencia de electrones (reacciones luminosas) se encuentren presentes, la ecuación [2.1].



Todas las reacciones del Ciclo de Calvin, son catalizadas por enzimas específicas. Para la formación de una molécula de azúcar-fosfato se requiere la fijación de 6 moléculas de CO₂, por lo que la estequiometría final del ciclo de Calvin se puede resumir en la ecuación [2.2].



La glucosa producida en el Ciclo de Calvin, es movilizada dentro del organismo para satisfacer las necesidades metabólicas de la célula y con esto se completa la fotosíntesis (Prince y Kheshgi, 2005).

2.1.2.1 Medio de cultivo

El medio de cultivo debe suministrar todos los nutrientes requeridos para el crecimiento de la biomasa microalgal. De forma general, todos los medios tienen una fuente de carbono, bien en forma de sal inorgánica (bicarbonato sódico), gas CO₂ o compuesto orgánico (a título de ejemplo acetato). El nitrógeno se suministra como sal de nitrato y raras veces como amonio o urea. Otros nutrientes esenciales son P, S, Mg, Ca, K y algunos metales. Los medios a escala de laboratorio pueden ser sintéticos o bien efluentes acuosos urbanos o industriales sin o con enriquecimiento.

Para el crecimiento y el desarrollo de las microalgas se necesita un medio de cultivo y unas adecuadas condiciones de crecimiento, que suelen estar muy similar a las condiciones ambientales donde se encuentran estas microalgas. La importancia de seleccionar el medio de cultivo para producir determinada especie de microalga radica en el uso de un sustrato (orgánico o inorgánico) adecuado que permite la optimización de la composición bioquímica de la biomasa final colectada.

El nitrógeno es uno de los nutrientes esenciales para el crecimiento y el aumento de su concentración en el medio de cultivo permite mejorar la producción de biomasa (Silva *et al.* 2009). La limitación del contenido en nitrógeno en los medios de cultivo suele aumentar el contenido en lípidos en la biomasa (Breuer *et al.* 2013). Las microalgas acumulan grandes cantidades de lípidos en forma de triglicéridos cuando están privados de nitrógeno (Simionato *et al.* 2013).

El fósforo es otro elemento esencial para el crecimiento y su limitación como la limitación en N causa cambios en la composición bioquímica de la biomasa. Chia *et al.* (2013) ha indicado que la limitación en fósforo aumenta el contenido de lípidos totales en la biomasa de *Chlorella vulgaris*.

Las microalgas requieren para su crecimiento de otros macronutrientes como azufre, calcio, magnesio y potasio, así como de micronutrientes como molibdeno, hierro, níquel, cobre, zinc, manganeso, cobalto, boro y cloro. En ciertos grupos de algas se requieren nutrientes especiales o característicos, como sucede con las diatomeas y el silicio.

2.1.2.2 variables de operación

Para el correcto crecimiento de las microalgas, es necesaria la disponibilidad de un medio de cultivo adecuado, además de unas condiciones de operación óptimas. Las condiciones de operación son: Luz, temperatura, pH, caudal de aireación (air o CO₂) y velocidad de agitación.

- ✓ La luz es uno de los factores determinantes para el crecimiento óptimo. La irradiación promedia recibida por cada célula está determinada por la irradiación incidente, la geometría del reactor y el sistema de agitación, que asegura el continuo movimiento de las células desde las zonas oscuras a las iluminadas y viceversa (Masojídek *et al.* 2004; Ergas y Van der Steen, 2013). La aplicación de intensidades de iluminación muy altas provocan daños por estrés fotooxidativo (foto-inhibición) que repercutiría en el crecimiento celular (Ras *et al.* 2013).
- ✓ La temperatura de operación es un parámetro que depende de los otros parámetros como la intensidad de iluminación y el medio de cultivo. El valor óptimo de la temperatura del cultivo depende de la especie utilizada y de las condiciones de operación. Así que la temperatura óptima en condiciones naturales, en general, no coincide con la temperatura óptima en las condiciones de cultivo, ya que los parámetros de cultivo difieren a su vez de los que se dan en el ambiente natural. Las variaciones en la temperatura del cultivo presentan una respuesta directa en el crecimiento de la biomasa. La relación entre la temperatura y el crecimiento se distribuye en tres fases: una primera fase en la que el aumento de la temperatura implica el aumento de la tasa de crecimiento hasta alcanzar la segunda fase, que se corresponde con el óptimo de temperatura (en esas condiciones), a partir del cual si la temperatura continúa aumentando se entraría en la fase tercera en la que la tasa de crecimiento es negativa. La tasa de crecimiento negativa característica de esta fase, se puede deber a que las altas temperaturas interrumpan procesos de regulación metabólica o que directamente se produzca la muerte celular. A pesar de que gran parte de las

microalgas son capaces de crecer en un amplio rango de temperaturas, todas ellas presentan un rango fuera del cual se ven inhibidos o incluso mueren.

- ✓ El pH del medio de cultivo afecta a la velocidad específica de crecimiento y al rendimiento en biomasa de las algas unicelulares. Modifica la disociación y la solubilidad de los diferentes nutrientes del medio de cultivo. Además, puede producir efectos tóxicos, inhibiciones o deficiencias en algunos nutrientes del medio de cultivo (Camacho *et al.* 1989). La reducción del nitrato o la asimilación del CO₂ suponen una elevación del pH del medio de cultivo que debe ser corregida para asegurar el buen funcionamiento de las rutas metabólicas, bien utilizando medios tamponados, adicionando ácido de forma controlada o inyectando en la corriente de aire una proporción adecuada de CO₂.
- ✓ La aireación del medio de cultivo se puede realizar a través de la agitación mecánica o la inyección directa de un gas en el reactor. El incremento de la velocidad de agitación aumenta la superficie de transferencia con la atmósfera, la homogenización de pH del medio de cultivo, la distribución del gas y la frecuencia de exposición de las células a la luz, en los que en cuestión de milisegundos pasan de una zona oscura a una zona iluminada. Incluso, favorece el intercambio de nutrientes entre el medio de cultivo y las microalgas, impide la sedimentación de las células y su adherencia a las paredes del reactor (Kunjapur y Eldridge, 2010). La agitación del biorreactor se puede llevar a cabo mediante el uso de medios mecánicos, tales como aspas o hélices. Finalmente, cabe mencionar que la velocidad de agitación no se puede incrementar de forma incontrolada y debe ser optimizada para cada especie, ya que se puede producir estrés hidrodinámico. En este sentido, no todas las especies toleran la misma agitación mecánica, existiendo especies sensibles a este tipo de estrés.
- ✓ Por otra parte, la aireación del medio de cultivo se puede llevar a cabo mediante la inyección directa del aire, CO₂ u oxígeno en el biorreactor. El uso del CO₂ para la aireación tiene doble función, la aireación del medio de cultivo, como el suministro de fuente de carbono para las microalgas, lo que implica un aumento sustancial de la productividad en biomasa. Sin olvidar la función que tiene en el control de pH del medio de cultivo (Laurinavichene *et al.* 2004; Combres *et al.* 1994; Ortega *et al.* 2004).

✓

2.1.3 Producción de biomoléculas específicas

2.1.3.1 Proteínas unicelulares

El término proteína unicelular (PUC) se emplea para referirse a las proteínas de los microorganismos tales como bacterias, levaduras, microalgas y hongos filamentosos, que son empleados para alimentación humana o animal. Estos microorganismos ofrecen numerosas ventajas como productores de proteínas:

- Su producción puede ser basada en su crecimiento sobre sustratos de carbono natural, los cuales son disponibles en grandes cantidades (rocas sedimentarias orgánicas o hulla, petroquímicos, gas natural) o sobre subproductos celulósicos de la agricultura.
- La mayoría de los microorganismos cultivados poseen altos niveles de proteínas (40–80% de proteína cruda en base seca, dependiendo de la especie y las condiciones del cultivo).
- Tienen un tiempo de generación muy corto; bajo condiciones óptimas de cultivo las bacterias pueden duplicar su masa celular en 0,5–2 h, las levaduras en 1–3 h y las microalgas en 3–6 h.

- Se pueden cultivar en un espacio reducido de forma intensiva y producir continuamente independientemente del clima.
- Hasta cierto punto, su composición bioquímica se puede controlar por manipulación de las condiciones de operación o por modificación genética.

Se observa la gran variabilidad en la composición bioquímica de la biomasa para las diferentes especies de microalgas en función del medio de cultivo utilizado y las condiciones de operación, Tabla 2.1. A título de ejemplo, el contenido en proteínas puede variar entre un 6 % para *Spirogyra* y un 71 % para *Spirulina máxima*.

Tabla 2.1. Contenido en proteínas registrado en la biomasa de diferentes microalgas (% de materia seca)

Microalga	Proteínas (%)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57
<i>Spirogyra</i> sp.	6-20
<i>Dunaliella bioculata</i>	49
<i>Dunaliella salina</i>	57
<i>Euglena gracilis</i>	39-61
<i>Prymnesium parvum</i>	28-45
<i>Tetraselmis maculata</i>	52
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39
<i>Spirulina platensis</i>	46-63
<i>Spirulina maxima</i>	60-71
<i>Synechococcus</i> sp.	63
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56

Becker (1994).

2.1.3.2 Pigmentos

a) Clorofilas

Representan el color verde y se encuentran en las cianobacterias y en los organismos que disponen de cloroplastos o membranas tilocoidales (plantas y algas). Las clorofilas son esenciales en el proceso de fotosíntesis, que permite la producción de energía a partir de la luz solar. En la estructura de las clorofilas se encuentra un anillo de porfirina que contiene magnesio y una cadena hidrófoba de fitol para mantener la clorofila integrada en la membrana fotosintética. Las distintas formas de las clorofilas se distribuyen desigualmente en la diversidad de los fotosintetizadores oxigénicos.

La clorofila 'a' se encuentra en todos los casos, vinculada al centro activo de los complejos moleculares llamados fotosistemas, que absorben la luz durante la fotosíntesis y se difiere de la clorofila 'b' en que el radical de la posición 3 del grupo tetrapirrónico es -CH₃ (metilo) en lugar de -CHO (grupo funcional de los aldehídos).

La clorofila 'b' caracteriza a los plastos de las algas verdes y de sus descendientes las plantas terrestres (Viridiplantae). Esos plastos, y los organismos que los portan, son de color verde. También se encuentran plastos verdes en algunos grupos de protistas que han asimilado algas verdes unicelulares endosimbiontes adquiriendo así plastos secundarios. Se puede nombrar a las euglenas, a los clorarachnófitos y a algunos dinoflagelados, como *Gymnodinium viride*. También, se encuentra en algunas cianobacterias (las cloroxibacterias), que por ello son de color verde planta en vez de azuladas; hace algún

tiempo se les atribuyó por este rasgo el carácter de antepasados de los plastos verdes, pero luego se ha comprobado que es un carácter adquirido independientemente en varias líneas separadas.

b) La carotenoide

Los carotenoides son compuestos orgánicos que cuentan con una estructura química muy diversa. Su función es aumentar la eficacia de absorción de la luz por parte de los organismos fotosintéticos, ya que cuentan con capacidades de captación de luz a longitudes de ondas diferentes a las de clorofilas. Tienen capacidades antioxidativa como las que ofrece las de β -caroteno, astaxantina y cantaxantina (Borowitzka, 1992).

2.1.3.3 Ácidos grasos poliinsaturados

Estos ácidos grasos cuentan en su estructura química con más de un doble enlace de carbono, tales como el ácido graso Linolenic acid (C18:2n3), Linoleic acid (C18:2n6) y Eicosapentaenoic acid (C20:5n3). Entre estos ácidos grasos se encuentran los ácidos grasos esenciales C16:3n4, C20:5n3 (EPA), C20:5n3, C22:6n3 (DHA), C18:2n6 y C18:3n3. También, los ácidos grasos superiores poliinsaturados n3 y son C20:4n3, C20:5n3, C22:5n3, C22:6n3.

2.1.4 Producción de energía

Las microalgas son microorganismos unicelulares que se caracterizan por su alta eficiencia en la realización de la fotosíntesis en comparación con la eficiencia de los cultivos tradicionales (forestal y agrícola), que raramente llega a superar el 1% del total de la energía solar absorbida y convertida a productos recuperables. Las microalgas pueden alcanzar conversiones hasta 10% de la energía absorbida. El CO₂ generado industrialmente, puede ser utilizado por estos microorganismos transformándolo en compuestos de alto interés para la sociedad (compuestos energéticos, proteínas unicelulares y bioactivos de alto valor añadido (Spolaore *et al.*, 2006; Walter *et al.*, 2005). Además, estos microorganismos fotosintéticos cuentan con gran capacidad de biorremediación de las aguas residuales urbanas e industriales (Kalin *et al.*, 2005; Muñoz y Guieysse, 2006). Los cultivos intensivos de las microalgas son una fuente renovables de producción de compuestos energéticos que pueden ser transformados en biofueles (etanol, biodiesel, biogás, etc.). La concentración de la fase lipídica en la biomasa algal puede variar desde 8% hasta 55% en función del medio de cultivo y las condiciones de operación aplicadas.

2.1.4.1 Producción de hidrógeno

Las microalgas ofrecen la posibilidad de producir hidrógeno a parte de los otros tipos de biocombustibles renovables mencionados anteriormente (gas metano producido por digestión anaerobia de la biomasa algal, biodiesel tras la transesterificación de los ácidos grasos de la fracción lipídica a esteres metílicos o etílicos (Spolaore *et al.* 2006; Gavrilescu y Chisti, 2005). El biohidrógeno se produce fotobiológicamente en condiciones de operaciones especiales (Fedorov *et al.*, 2005; Kapdan y Kargi, 2006).

El hidrógeno (H₂) puede ofrecer una solución ideal para la sustitución de los combustibles fósiles, ya que su uso reduciría la contaminación del aire y el efecto invernadero. El uso del Hidrógeno y la producción de electricidad a partir del mismo son soluciones atractivas para el transporte. La producción de hidrógeno por microalgas se basa en la captación de la energía solar y la fotodisociación del agua, transfiriendo los electrones a través de una cadena transportadora en los Tilacoides, lo mismo sucede en

el caso de las cianobacterias. La transferencia de electrones hacia la enzima Hidrogenasa, reduce los protones del hidrogeno, oxidando a la ferredoxina, que pasa de su estado reducido al estado oxidado. Inducida la hidrogenasa, la microalgas con alto contenido en carbohidratos y en condiciones anaerobias y bajo iluminación se inicia la síntesis del H_2 a partir de los carbohidratos. Anastasio *et al.* (2000) ha demostrado bajo ciertas condiciones de limitación de nutrientes, en medio de cultivo libre de azufre (como sulfato) y en anaerobiosis, la *Chlamydomonas reinhardtii* es capaz de producir hidrogeno de manera sostenida en el tiempo.

2.1.4.2 Producción de biodiesel

La producción de biocombustibles, a partir de los cultivos industriales oleaginosos tales como la soja, colza, girasol, palma, etc., cada vez es menos deseada por su implicación en la alimentación humana. El uso de otros cultivos no comestibles tales como *Jatropha curcas* con un contenido hasta 40% en aceite en sus semillas pueden ser alternativos a los cultivos convencionales de uso en alimentación. Por otra parte, ninguno de estos cultivos cuenta con una productividad similar a las de las microalgas (Leite *et al.* 2013). La energía global generada a partir de la biomasa de microalgas, como el biodiesel producido por la conversión de su fracción lipídica está teniendo mucho éxito ya que permite suministrar ácidos grasos de cadena de carbono corta sin afectar negativamente al suministro de alimentos o al medio ambiente.

La exigencia de disponer de recursos energéticos sostenibles es cada más presente debido al aumento de la población mundial y la necesidad de un suministro energético que responde a la industrialización de los países. Las fuentes fósiles de energía (el petróleo, el gas natural y el carbón) están agotando y su uso cada vez afecta al planeta produciendo un cambio climático más claro en la tierra (Abdelaziz *et al.* 2013b).

Las microalgas pueden también actuar como purificadores de las aguas residuales urbanas e industriales generadas, lo que permite su biorremediación y reutilización o reincorporación al sistema productivo, e incluso, su recuperación para el uso como aguas potables (Rawat *et al.* 2011; Flynn *et al.* 2010; Chen *et al.* 2011; Sydney *et al.* 2011).

2.1.5 Obtención de otros compuestos de alto valor añadido

Las microalgas cuentan con grandes aplicaciones comerciales tales como la producción de macromoléculas, tales como clorofilas, carotenoides, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, etc. Se han identificado gran número de antioxidantes, antivirales, antimicrobianas, antitumorales y agentes antiinflamatorios de uso en cosmética, además de otros productos dietéticos, alimentos funcionales y prebióticos. El conocido antioxidante “astaxantina” producido por *Haematococcus pluvialis* es un ejemplo más con importantes funciones antiinflamatorias y antitumorales (Rawat *et al.* 2011; Guedes *et al.*, 2011).

2.2 CINÉTICA DEL CRECIMIENTO Y PARÁMETROS DE RENDIMIENTO

En general, el crecimiento celular de los microorganismos corresponde al aumento del número de células y su tamaño durante el transcurso del cultivo. Los parámetros cinéticos de crecimiento son esenciales a la hora de pensar en realizar el escalado de los bioprocesos desde el nivel de laboratorio a nivel de planta piloto o planta industrial Duarte (1998).

Las representaciones gráficas en coordenadas normales y semilogarítmicas de la concentración de biomasa frente al tiempo de operación, permiten la identificación de las distintas fases del crecimiento:

- 1) Fase de adaptación o fase 'Lag'.
- 2) Fase de crecimiento exponencial.
- 3) Fase de desaceleración del crecimiento.
- 4) Fase estacionaria.
- 5) Fase de declinación o muerte.

2.2.1 Velocidad específica máxima de crecimiento

Se trata de un parámetro característico del crecimiento que relaciona el incremento de la concentración de biomasa en escala semilogarítmica frente al tiempo de operación. Haciendo uso del balance másico a la concentración de la biomasa en el fotobiorreactor, este parámetro se puede determinar mediante la ecuación lineal [2.3].

$$\ln (x/x_0) = \mu_m t + a \quad [2.3]$$

donde ' μ_m ' es la velocidad específica máxima de crecimiento y 'a' es la ordenada en el origen. En la fase exponencial las microalgas presentan un crecimiento balanceado, en el sentido que no exista limitación de crecimiento y corresponde a una reacción autocatalítica de primer orden.

2.2.2 Productividad volumétrica en biomasa

Es otro parámetro característico que determina la concentración de biomasa que se genera en unidad de volumen de cultivo y en unidad de tiempo. Dicho parámetro se suele identificar durante la fase de desaceleración del crecimiento, inmediatamente después de la fase exponencial. En muchos casos, esta fase tiene un comportamiento lineal y la productividad volumétrica en biomasa se puede determinar mediante la ecuación [2.4].

$$x = P_b t + b \quad [2.4]$$

donde ' P_b ' es la productividad volumétrica en biomasa y 'b' es la ordenada en el origen.

2.2.3 Modelos cinéticos

La modelización del crecimiento celular es de gran importancia para el escalado de los resultados experimentales obtenidos en el laboratorio a escala superior. En cualquier bioproceso es conveniente conocer de forma sencilla el comportamiento del cultivo en cualquier situación real posible. Los modelos cinéticos tienen la función de interpretar la respuesta de los microorganismos al cambio de las condiciones de operación y la composición del medio de cultivo utilizado. Ya que el crecimiento celular es el resultado un sistema complejo de interacciones mediante reacciones bioquímicas (en el interior o el exterior de las células) y fenómenos de transporte que controlan múltiples fases con multicomponentes. La presencia de células nuevas (jóvenes) y viejas en el medio de cultivo experimenta durante el cultivo un cambio continuo. Todo ello, hace compleja la tarea de la modelización.

Normalmente, se suele optar por modelos matemáticos o experimentales simples para sus usos en el diseño de los bioprocesos y la predicción del comportamiento celular. Los modelos cuentan con variable para identificar el crecimiento celular tales como el número de células, la concentración de biomasa o la concentración de proteínas como variable.

Los modelos consideran el efecto del sustrato limitante del crecimiento y la influencia de los compuestos tóxicos inhibidores del crecimiento celular. Existen diferentes modelos cinéticos para representar el crecimiento, tales como el modelo de Teissier (1936), Mondo (1942), Moser (1958), Contois (1959), Powell (1967), Droop (1968), Dabes *et al.* (1973) y Chen y Hashimoto (1978).

2.2.4 Rendimientos en biomasa

El hecho de que existe un sustrato limitante del crecimiento celular, este permite definir rendimientos para el bioproceso. A partir de los datos experimentales de la cantidad de sustrato consumido y la biomasa producida, se puede observar que existe una relación entre ambos que es una proporcionalidad directa en la mayoría de los casos.

El rendimiento biomasa-sustrato se puede obtener mediante la ecuación:

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta x}{\Delta S} \quad [2.5]$$

donde ' $Y_{x/s}$ ' representa el rendimiento biomasa-sustrato, ' Δx ' es la biomasa neta generada y ' ΔS ' es el consumo de sustrato correspondiente.

El rendimiento producto formado-biomasa se puede obtener mediante la ecuación:

$$Y_{p/x} = \frac{\Delta P}{\Delta x} \quad [2.6]$$

donde ' $Y_{p/x}$ ' representa el rendimiento producto formado-biomasa, ' ΔP ' es el producto formado y ' Δx ' es la biomasa generada.

La determinación de estos parámetros se puede realizar en cualquier tiempo durante el cultivo (rendimientos instantáneos), se pueden referir a una fase concreta del crecimiento, que normalmente, corresponde a la fase exponencial o se pueden calcular rendimientos globales que corresponden a todo el período de tiempo correspondiente al cultivo.

En función del cultivo realizado, se pueden determinar diferentes tipos de rendimientos, Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Posibles rendimientos a determinar en los cultivos de microorganismos

Rendimiento	Definición
$Y_{x/s}$	g de biomasa seca/g de sustrato consumido.
$Y_{x/o}$	g de biomasa seca/g de oxígeno consumido.
$Y_{p/s}$	g de producto formado/g de sustrato consumido.
$Y_{c/s}$	Mol de CO ₂ producido/g de sustrato consumido.

2.3 DEPURACIÓN DE AGUAS RESIDUALES Y UTILIZACIÓN DE MICROALGAS

El agua es un bien escaso y de gran importancia para la vida. La disposición de recursos hidráulicos es uno de los pilares del desarrollo social y económico. El uso del agua sea para el consumo humano como agua potable o para el consumo agrícola, comercial e industrial la transforma de forma inmediata en agua residual. Alrededor del 80% de todas las aguas residuales que se producen son vertidas al medio ambiente sin ningún tipo de tratamiento (Sivakumar, 2011; Zhang *et al.*, 2018). La descarga directa de las aguas residuales sin tratamiento apropiado provoca incremento nutricional (N y P) en las zonas de vertido produciendo el fenómeno de la eutrofización (Mobin y Alam, 2014). Este fenómeno permite el crecimiento masivo de los microorganismos, en especial las algas, provocando una disminución del oxígeno disuelto necesario para la vida acuática.

La eliminación del nitrógeno y del fósforo de las aguas residuales es esencial para obtener agua tratada de calidad para ser vertida a cauces públicos o para su reutilización. Los tratamientos físicos y químicos son los más utilizados para la eliminación de estos nutrientes. Muchas depuradoras de aguas residuales urbanas no incluyen un tratamiento terciario en su estructura para la eliminación de nitrógeno y de fósforo debido al alto coste de los métodos físicos y químicos. En este sentido, las microalgas pueden jugar un papel importante en tratamiento de las aguas residuales y en la eliminación de estos nutrientes. De hecho, el uso de las microalgas plantea alcanzar tres objetivos de forma instantánea, el primero es el tratar las aguas residuales y el segundo es la generación de biomasa de alto valor añadido (generación de compuestos energéticos) y el tercero es la eliminación de CO₂ con el fin de atribuir a la reducción del efecto invernadero.

2.3.1 Características de las aguas residuales de almazaras

El proceso de elaboración del aceite de oliva está constituido por las siguientes operaciones:

- 1- Recepción de las aceitunas
- 2- Limpieza y lavado de las aceitunas
- 3- Molienda
- 4- Batido
- 5- Centrifugación horizontal (decanter).
- 6- Centrifugación vertical
- 7- Almacenamiento y envasado

Después de la recolección y el transporte de las aceitunas a la almazara, se comienza el proceso de elaboración del aceite de oliva. Actualmente, existen dos sistemas de producción: el sistema tradicional (de prensa) y el sistema continuo de centrifugación. Este último es el más utilizado y se puede distinguir entre el proceso continuo de centrifugación de tres y de dos salidas. El de tres salidas, produce aceite, orujo y alpechín. El de dos salidas, genera aceite y alperujo. La diferencia entre el orujo y el alperujo se debe a la incorporación del agua de vegetación (alpechín) al orujo y por lo tanto, el alperujo dispone de un alto contenido en agua. El proceso continuo de centrifugación de dos salidas se considera más eficiente ya que genera agua residual con menos carga orgánica y consume menos agua potable.

España, en la actualidad usa únicamente el proceso continuo de centrifugación con dos salidas. En este proceso se genera principalmente dos tipos de aguas residuales, el agua residual generada en las máquinas de lavado de aceitunas y el agua residual generada en las centrífugas verticales como resultado del lavado del aceite de oliva. Otros tipos de aguas residuales se generan pero con cantidades pequeñas,

tales como, el agua residual resultante de la limpieza de los tanques de la bodega de almacenamiento, el agua residual generada por las tolvas de recepción de aceitunas y el agua residual de la limpieza general del patio de almazaras.

Estas aguas residuales contienen alta carga orgánica y no se puede verter directamente sin tratamiento. Hasta el momento, las almazaras no han optado por ningún proceso para su tratamiento. De hecho estas aguas residuales se gestionan almacenándolas en grandes balsas de evaporación. En los trabajos de Elkacmi *et al.* (2017) y Flores *et al.* (2017) se recogen los datos sobre la composición fisicoquímica de las aguas residuales de las almazaras en función del sistema de extracción utilizado, Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Caracterización físico-química de las aguas residuales de almazaras*

Parámetro	Sistema de extracción		
	Prensa	Tres salidas	Dos salidas
pH	4,2-6,9	4,8-8,6	3,5-6,0
Conductividad (mS/cm)	2,0 -30,3	2,0-20,6	1,5-2,5
Humedad y materia volátil (%)	86-90	90-95	98-99
Sólidos totales (%)	7,3 -26,7	6,5-23,5	-
DQO (mg O₂ dm⁻³)	9100-246500	31.000-200.000	4000-16000
DBO (mg dm⁻³)	4750-100000	5.000-45.000	800-6000
Compuestos fenólicos (mg dm⁻³)	300-11540	300-8.900	44-1000
TOC (mg dm⁻³)	18000-64000	13.000-44.300	-

*Elkacmi *et al.*, (2017) y Flores *et al.*, (2017).

2.3.2 Características de las aguas residuales urbanas

En la directiva 91/271 CEE (21/05/1991), del Tratamiento de Aguas Residuales Urbanas, se definen los distintos tipos de aguas residuales.

1. Aguas residuales domésticas: Aquellas procedentes de zonas de viviendas y de servicios generadas principalmente por el metabolismo humano y las actividades domésticas.
2. Aguas residuales industriales: Todas las aguas residuales vertidas desde locales utilizados para efectuar cualquier actividad comercial o industrial, que no sean aguas residuales domésticas ni aguas de escorrentía pluvial.
3. Aguas urbanas: son aguas residuales domésticas mezcladas con aguas residuales industriales y aguas de escorrentía pluvial. Estas aguas se juntan en un sistema colector y son enviadas mediante un emisario terrestre a una planta EDAR (Estación Depuradora de Aguas Residuales). Las industrias que generan aguas residuales con carga orgánica superior a la permitida para las depuradoras pueden realizar el vertido en esta red colectora previa adaptación/adecuación o realización de un pre tratamiento.

Las aguas residuales urbanas no disponen de una composición fisicoquímica determinada, ya que sus características pueden variar en función de la población, sus hábitos alimenticios y el volumen de población. La existencia o no de un sistema de alcantarillado, el nivel de industrialización de la zona donde se ubica la población. Además, de la zona geográfica y las condiciones ambientales de la misma. En la Tabla 2.4 se recoge la composición de las aguas residuales urbanas en función de su carga (débil, media y fuerte).

Tabla 2.4. Composición fisicoquímica de las aguas residuales urbanas en función de su carga orgánica

Parámetros	Concentración		
	Débil	media	Fuerte
Sólidos totales (ST), mg dm ⁻³	350	720	1,200
Disueltos totales (SDT), mg dm ⁻³	250	500	850
Fijos, mg dm ⁻³	145	300	525
Volátiles, mg dm ⁻³	105	200	325
Sólidos en suspensión (SS), mg dm ⁻³	100	220	350
Fijos, mg dm ⁻³	20	55	75
Volátiles, mg dm ⁻³	80	165	275
Sólidos sedimentables, ml dm ⁻³	5	10	20
DBO ₅ , mg O ₂ dm ⁻³	110	220	400
Carbón orgánico total (COT), mg/L	80	160	290
Nitrógeno (total en forma de N), mg dm ⁻³	20	40	85
Orgánico, mg dm ⁻³	8	15	35
Amoníaco libre, mg dm ⁻³	12	25	50
Nitritos, mg dm ⁻³	0	0	0
Nitratos, mg dm ⁻³	0	0	0
Fósforo (total en forma P), mg dm ⁻³	4	8	15
Orgánico, mg dm ⁻³	1	3	5
Inorgánico, mg dm ⁻³	3	5	10
Cloruros**, mg dm ⁻³	30	50	100
Sulfato**, mg dm ⁻³	20	30	50
Alcalinidad (como CaCO ₃), mg dm ⁻³	50	100	200
Grasa, mg dm ⁻³	50	100	150
Coliformes totales, n.º/100 mL	10 ⁶ - 10 ⁷	10 ⁷ - 10 ⁸	10 ⁷ - 10 ⁹
Compuestos orgánicos volátiles, (COVs), mg dm ⁻³	< 100	100 - 400	> 400

*fuente: METCALF & EDDY, INC., (2013).

** Los valores se deben incrementar en cantidad en que estos compuestos se hallen presentes en las aguas de suministro.

2.3.3 Antecedentes del uso de microalgas en el tratamiento de aguas

Los primeros intentos de trabajar con las microalgas se han comenzado en el año 1890, en el cual se separó la microalga *Chrorella vulgaris*. Sin embargo, los estudios de la fisiología y la composición bioquímica de las microalgas y su posterior cultivo han dado comienzo a partir del año 1940, siendo las diatomeas las primeras algas en cultivarse. *C. vulgaris* ha sido la primera microalga en llevarse a plantas piloto utilizando fotobiorreactores abiertos (García-Romeral *et al.* 2017).

Las aplicaciones comerciales de las microalgas suelen estar condicionadas por diferentes características, tales como, alta velocidad específica de crecimiento en medio líquido, poca exigencia nutricional, plasticidad metabólica, tolerancia a condiciones extremas, la síntesis y capacidad de generar metabolitos y la posibilidad de ser manipuladas genéticamente Borowitzka (2013).

La utilización de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales tiene gran interés, especialmente para la producción de ciertas biomoléculas de alto valor añadido. La combinación entre la producción de biomasa de microalgas y los tratamientos de las aguas residuales a base de cultivos algales, ha sido objeto de varias investigaciones.

Salazar-Gonzalez (2006) ha indicado que en el año 1957 se realizaron estudios sobre la producción de biomasa algal a partir de las aguas residuales. Se han obtenido resultados positivos respecto a la eliminación de nitrógeno, fósforo y otros elementos de estas aguas por las microalgas. En estos estudios la concentración de dichos elementos varía según el origen de las aguas residuales, lo que influye de forma

directa en la biomasa producida y su composición bioquímica (carbohidratos, proteínas y lípidos), Quiroz-Arita *et al.* (2015).

Fazal *et al.* (2017) ha indicado la capacidad de las microalgas, crecidas en aguas residuales como medio de cultivo, en producir biocombustibles. Otros trabajos mencionan la posibilidad de integrar el tratamiento de las aguas residuales con la captura del CO₂ atmosférico o industrial por los cultivos de microalgas, con el fin de generar biocombustibles para sustituir a los combustibles fósiles Abdur Razzak *et al.* (2017). También, se ha planteado la producción de biohidrógeno a partir de microalgas (Aziz y Zaini, 2017; Dzialowski y Smith, 2008; Praveen *et al.* 2016; Boelee *et al.* 2011; Ben-Amotz, 1995).

2.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

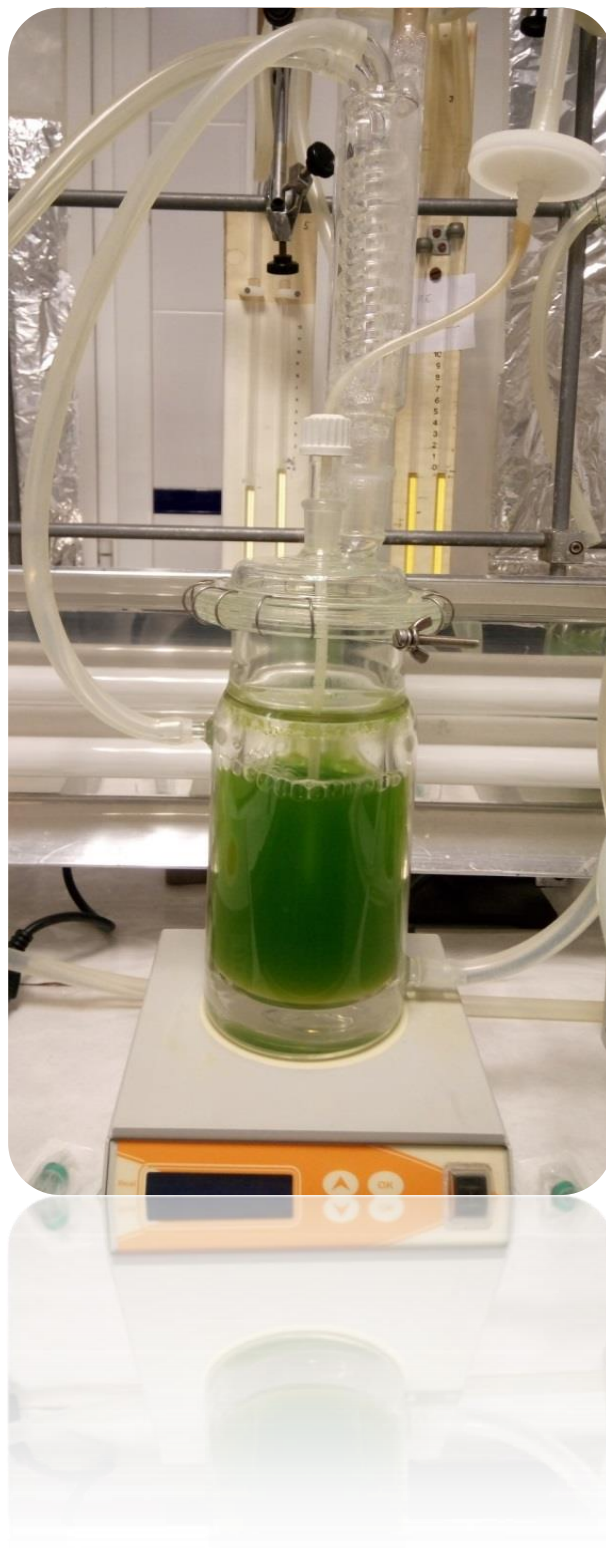
- Abdelaziz A.E., Leite G.B., Hallenbeck P.C. (2013a). "Addressing the challenges for sustainable production of algal biofuels: I. Algal strains and nutrient supply". *Environ Technol.* **34**, 1783-1805.
- Abdur Razzak S., Aldin Ali S. M., Mozahar Hossain M., de Lasa H. (2017). "Biological CO₂ fixation with production of microalgae in wastewater". A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* **76**, 379-390.
- Anastasios M., Liping Z., Marc F., Maria L.G., and Michael S. (2000). "Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*". *Plant Physiol.* **122**, 127-136.
- Aresta M., Dibenedetto A., Carone M., Colonna T., C. Fragale. (2005). "Production of biodiesel from macroalgae by supercritical CO₂ extraction and thermochemical liquefaction". *Environ Chem Lett.* **3**(3), 136-139.
- Aziz M., Zaini I.N. (2017). "Energy-efficient Conversion of Microalgae to Hydrogen and Power". *Energy Procedia.* **105**. 453-458.
- Becker E.W. (1994). Chemical composition. En: "Microalgae. Biotechnology and Microbiology", E.W. Becker (Ed.), Cambridge University Press, Nueva York, pp. 177-195.
- Ben-Amotz A. 1995. "New mode of *Dunaliella* biotechnology: two-phase growth for β -carotene production". *J App Phycolo.* **7**, 65-68.
- Boelee N.C., Temmink H., Janssen M., Buisman C.J.N., Wijffels R.H. (2011). "Nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater effluent using microalgal biofilms". *Water Res.* **45**, 5925-5933.
- Borowitzka M.A. (2013). "High-value products from microalgae—their development and commercialisation". *J. Appl. Phycol.* **25**, (3), 743-756.
- Borowitzka M. A. (1992). "Comparing carotenogenesis in *Dunaliella* and *Haematococcus*: implications for commercial production strategies". Profiles on biotechnology. Villa, T.G. y Abalde, J. (eds). Servicio de publicaciones. Universidad de Santiago, pp. 301-310.
- Breuer G., Lamers PP., Martens DE., Draaisma RB., and Wijffels RH. (2013). "Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in *Scenedesmus obliquus*". *Bioresource Technol.* **143**, 1-9.
- Camacho F., Martínez M. E., Sánchez S., Perez A.D. (1989). "Influence of pH on the kinetic and yield parameters of *Scenedesmus obliquus* heterotrophic growth". *Process Biochem.* **24**, 133-136.
- Chen, C.Y., Yeh K.L., Aisyah R., Lee D.J., and Chang J.S. (2011). "Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review". *Bioresource Technol.* **102**, 71-81.
- Chen C.Y., Yeh K.L., Su H.M., Lo Y.C., Chen W.M., Chang J.S. (2010). "Strategies to enhance cell growth and achieve high-level oil production of a *Chlorella vulgaris* isolate". *Biotechnol Prog.* **26**(3), 679-86.
- Chen G., Jiang Y., Chen F. (2008). "Variation of lipid class composition in *Nitzschia laevis* as a response to growth temperature change". *Food Chem.* **109**, 88-94.
- Chen Y. R., Hashimoto A. G. (1978). "Kinetics of methane fermentation". *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **8**, 269-282.
- Chia M.A., Lombardi A.T., Melão M.D.G.G., Parrish C.C. (2013). "Lipid composition of *Chlorella Vulgaris* (Trebouxiophyceae) as a function of different cadmium and phosphate concentrations". *Aquat Toxicol.* **128**, 171-182.
- Chisti Y. (2007). "Biodiesel from microalgae". *Biotechnol Adv.* **25**, 294-306.

- Combres C., Laliberté G., Reyssac J., De La Noue J. (1994). "Effect of acetate on growth and ammonium uptake in the microalga *Scenedesmus obliquus*". *Physiol Planta*. **9** (4), 729-734.
- Contois D.E. (1959). "Kinetics of bacterial growth: relationship between population density and specific growth rate of continuous cultures". *J. Gen. Microbiol.* **21**, 40-50.
- Dabes J.N., Finn R.K., Wilke C.R. (1973). "Equations of substrate-limited growth: the case for Blackman kinetics". *Biotechnol. Bioeng.* **15**, 1159-1177.
- Del Campo, J. A., M. García-González, M. G. Guerrero (2007). "Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: Current state and perspectives". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**(6), 1163-1174.
- Droop M.R. (1968). "Vitamin B12 and marine ecology. IV. The kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochrysis lutheri*". *J. Mar. Biol. Assn. U.K.*, **48**, 689-733.
- Duarte A. (1998). "Introducción a la Ingeniería Bioquímica". Ed. Universidad Nacional de Colombia: Bogotá. pp. 198.
- Dzialowski A.R., Smith V.H. 2008. "Nutrient dependent effects of consumer identity and diversity on freshwater ecosystem function". *Freshwater Biology*. **53**, 148-158.
- Elkacmi R., Kamil N., y Bennajah M. (2017). "Separation and purification of high purity products from three different olive mill wastewater samples". *J. Enviro Chemi Eng.* **5**(1), 829-837.
- Ergas S.J., Van der Steen N.P. (2013). "Preface". *Rev Environ Sci. Biotechnol* **12**, 115- 117.
- Fazal T., Mushtaq A., Rehman F., Ullah Khan A., Rashid N., Farooq W., Ur Rehman M.S., Xu J. (2017). "Bioremediation of textile wastewater and successive biodiesel production using microalgae". *Renew and Sustain Energy Rev.* **82**, 3107-3126.
- Fedorov A.S., Kosourov S., Ghirardi M.L., Seibert M. (2005). "Continuous H₂ photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii* using a novel two-stage, sulfate-limited chemostat system". *Appl Biochem Biotechnol.* **121-124**, 403-412.
- Fitzgerald C., Gallagher E., Tasdemir D., Hayes M. (2011). "Heart health peptides from macroalgae: Isolation and potential use in functional foods". *J Agric Food Chem.* **59**, 6829-6836.
- Flores N., Cabot P. L., Centellas F., Garrido J. A., Rodríguez R. M., Brillas E., y Sirés, I. (2017). "4-Hydroxyphenylacetic acid oxidation in sulfate and real olive oil mill wastewater by electrochemical advanced processes with a boron-doped diamond anode". *J of Hazardous Materials.* **321**, 566-575.
- Flynn K.J., Raven J.A., Alwyn T., Rees V., Finkel Z., Quigg A., and Beardall J. (2010). "Is the growth rate hypothesis applicable to microalgae?". *J. Phycol.* **46**, 1-12.
- García-Romeral J., Pavía-Gómez M., García Sanz T., Chirivella-Martorell J., Serrano-Aroca Á. (2017). "Principios de Biotecnología y Bioingeniería en el cultivo de microalgas: importancia problemas tecnológicos, tipos y sistemas de cultivos, crecimiento, factores limitantes, selección, aislamiento, escalado y caracterización bioquímica". "NEREIS. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación". **9**, 115-130.
- Gavrilescu M, Chisti Y. (2005). "Biotechnology a sustainable alternative for chemical industry". *Biotechnol Adv.* **23**, 471-99.
- Guedes A.C., Amaro H.M., Malcata F.X. (2011). "Microalgae as sources of high added-value compounds—A brief review of recent work". *Biotechnol. Prog.* **27**(3), 597-613.
- Hu Q. (2004). "Environmental effects on cell composition". En: Handbook of Microalgal Culture. *Biotechnology and Applied Phycology*. Edited by Amos Richmond. Blackwell Publishing. pp. 83-96.

- Kalin M., Wheeler W.N., Meinrath G. (2005). "The removal of uranium from mining waste water using algal/microbial biomass". *J Environ Radioact.* **78**,151-177.
- Kapdan I.K., Kargi F. (2006). "Bio-hydrogen production from waste materials". *Enzyme Microb Technol.* **38**, 569-82.
- Kaplan D., Richmond A., Dubinsky Z., Aaronson S. (1986). "Algal nutrition". En: Handbook of Microalgal Mass Culture, Richmond A. (Ed.), pp. 147-198, CRC press, Boca Raton, FL.
- Krause G.H., Weis E. (1991). "Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics". *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* **42**(1), 313-349.
- Kunjapur, A.M., Eldridge, R.B. (2010). "Photobioreactor design for commercial biofuel production from microalgae. *Ind. Eng. Chem. Res.* **49**, 3516-3526.
- Laurinavichene T.V., Tolstygina I.V., Galiulina R.R., Ghirardi M.L., Seibert M., Tsygankov A.A. (2004). "Dilution methods to deprive *Chlamydomonas reinhardtii* cultures of sulfur for subsequent hydrogen photoproduction". *Int. J. Hydrog. Energy.* **27**(11), 1245-1249.
- Leite G.B., M Abdelaziz A.E., Hallenbeck P.C. (2013). "Algal Biofuels; Challenges and Opportunities". *Bioresour Technol.* **145**, 134-141.
- Louime C., Marshall RW., Vasanthaiah H.K.N., Onokpise O. (2012). "Genomics and Potential Bioenergy". Applications in the Developing World. *Genomics Applications for the Developing World.* **6**, 263-272.
- George Tchobanoglous, H. Stensel, Ryujiro Tsuchihashi, Franklin Burton (2013). "Wastewater Engineering: Treatment and Resource Recovery". 5th edición de N/A Metcalf and Eddy, Inc. US, NY.
- Masojídek J., Koblízek M., Torzillo G. (2004). "Photosynthesis in microalgae". En: Handbook of Microalgal Culture. *Biotechnology and Applied Phycology*. Edited by Amos Richmond. Blackwell Publishing. pp. 20-39.
- Mobin S., Alam F. (2014). "Biofuel Production from Algae Utilizing Wastewater". In: Proc. 19th Australas. Fluid Mech. Conf.
- Monod J. (1942). "Recherches sur la Croissance des Cultures Bacteriennes". Herman y Cie (Ed.), Paris.
- Moser A. (1958). "The dynamic of bacterial populations maintained in the chemostat". Publication 614, The Carnegie Institution, Washington D. C.
- Munoz R., Guieysse B. (2006). "Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review". *Water Res.* **40**, 2799-2815.
- Ortega J., Moronta R., Morales E. (2004). "Influencia del acetato sobre el crecimiento y contenido de pigmentos de la microalga *Chlorella sp*". *Ciencia* **12**(1), 25-31.
- Powell E. O. (1967). "Microbial physiology and continuous culture" Powells E. O., Evans y Strange (Eds) Elliot Bros & Yesmar Ltd., Speke, pp. 24, Liverpool.
- Praveen P., Heng J.Y.P., Loh K.C. (2016). "Tertiary wastewater treatment in membrane photobioreactor using microalgae: Comparison of forward osmosis microfiltration". *Bioresour Tech.* 448-457.
- Prince R.C., Kheshgi H.S. (2005). "The photobiological production of hydrogen: potential efficiency and effectiveness as a renewable fuel". *Crit. Rev. Microbiol.* **31**(1), 19-31.
- Quiroz Arita C.E., Peebles C., Bradley T.H. (2015). "Scalability of combining microalgae-based biofuels with wastewater facilities". *Algal Res.* **9**, 160-169.
- Ras M., Steyer J.P. Bernard O. (2013). "Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production". *Rev Environ Sci Biotechnol.* **12**, 153-164.

- Rawat I., Ranjith K.R., Mutanda T., Bux F. (2011). "Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production". *Appl Energy*. **88**, 3411-3424.
- Salazar Gonzalez M. (2006). "Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales". *Contactos*. **59**, 64-79.
- Silva A.F., Lourenço SO., Chaloub RM. (2009). "Effects of nitrogen starvation on the photosynthetic physiology of a tropical marine microalga *Rhodomonas* sp. (Cryptophyceae)". *Aquat Bot*. **91**(4), 291-297.
- Simionato D., Block MA., La Rocca N., Jouhet J., Maréchal E., Finazzi G., Morosinotto T. (2013). "The response of *Nannochloropsis gaditana* to nitrogen starvation includes De Novo Biosynthesis of Triacylglycerols, a decrease of chloroplast galactolipids, and reorganization of the photosynthetic apparatus". *Eukaryotic cell*. **12**(5), 665-676.
- Sivakumar B. (2011). "Water crisis: From conflict to cooperation an overview, Hydrol". *Sci. J*. **56**, 531-552.
- Speer, Brian R. (1997). "Chlorophyll molecules are specifically arranged in and around photosystems that are embedded in the thylakoid membranes of chloroplasts. Two types of chlorophyll exist in the photosystems: chlorophyll a and b". Photosynthetic Pigments. UCMP Glossary (online). University of California Museum of Paleontology. Consultado el 17 de julio de 2010.
- Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. (2006). "Commercial applications of microalgae". *J Biosci Bioeng*. **101**, 87-96.
- Sydney, E.B., da Silva T.E., Tokarski A., C. Novak A., de Carvalho J.C., Woiciecohwski A.L., Larroche C., Soccol C.R. (2011). "Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage". *Appl. Energy*. **88**, 3291-3294.
- Teissier G. (1936). Recherches morphologiques et physiologiques sur la croissance des insectes. Travaux de la Station Biologique de Roscoff, 9, pp. 29-239, 1931 (Les Presses Universitaires de France, Paris. 1931). *Ann. Physiol. et Phys-Chim. biol*. **12**, 527.
- Walter T.L., Purton S., Becker D.K., Collet C. (2005). "Microalgae as bioreactor". *Plant Cell Rep*. **24**, 629-41.
- Zaslavskaja L.A., Lippmeier J.C., Shin C., Ehrhardt D., Grossman A.R., Apt K.E. (2001). "Trophic conversion of an obligate photoautotrophic organism through metabolic engineering". *Science* **292**, 2073-2075.
- Zhang Y., Song C., Ji L., Liu Y., Xiao J., Cao X., Zhou Y. (2018). "Cause and effect of N/P ratio decline with eutrophication aggravation in shallow lakes". *Sci. Total Environ*. **627**, 1294-1302.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



3.1 HIPÓTESIS

Como hipótesis de partida, en esta Tesis Doctoral se pretende realizar un aprovechamiento de las aguas residuales de almazara utilizándolas como medio nutriente para el crecimiento de microalgas, y que la biomasa generada en este bioproceso pueda tener una aplicación directa en la generación de compuestos energéticos, demostrando que a través de su fracción lipídica se puede producir biodiesel.

3.2 OBJETIVO GENERAL

Este trabajo tiene como objetivo principal el estudio de la posible utilización de las aguas residuales de almazaras (aguas de lavado de aceitunas, y aguas de lavado de aceites), generadas en procesos de elaboración de aceites de oliva por centrifugación con decánter de dos salidas, como medio nutriente para la producción de biomasa de algas unicelulares. Simultáneamente, con el tratamiento propuesto se eliminaría algunos componentes del agua residual, disminuyendo pues su carga contaminante. Por otra parte, se obtendría una biomasa de microalgas utilizable para la producción de productos químicos tales como determinados lípidos, proteínas, pigmentos y ciertas biomoléculas específicas constituyendo el último fin de esta biomasa la producción de biocombustibles.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

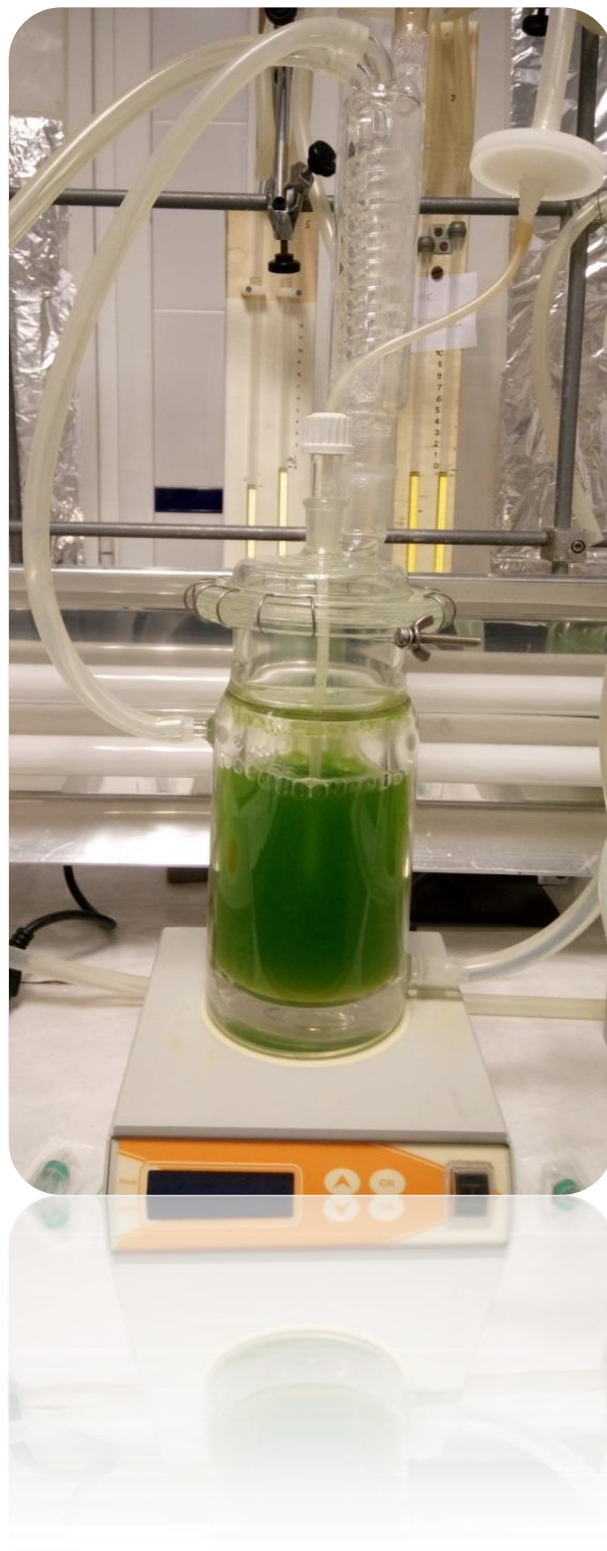
Entre los objetivos específicos que se pretenden alcanzar cabe mencionar los siguientes:

1. Caracterización físico-química de las aguas residuales generadas en las distintas etapas del proceso de elaboración de aceites de oliva a nivel de almazara.
2. Utilización del agua residual como medio nutriente para el crecimiento de microalgas.
3. Determinar los parámetros cinéticos del crecimiento del alga unicelular utilizada en las aguas residuales de almazaras.
4. Establecer la composición bioquímica de la biomasa microalgal en cada una de las condiciones de operación ensayadas en los fotobiorreactores.
5. Enriquecer el alga en la fracción lipídica, mediante la modificación de las condiciones de operación.
6. Extraer y transformar la fracción lipídica en biodiesel.

Al final de cada experimento se realizará un control de la concentración total de lípidos y de la composición en ácidos grasos de la fracción lipídica de la biomasa. Por otro lado, y una vez separada la biomasa se determinará la composición físico-química de las aguas residuales usadas como medio de cultivo.

Finalmente, a partir de los resultados obtenidos, se determinarán los parámetros cinéticos: velocidad específica de crecimiento y productividad volumétrica en biomasa. Las condiciones más favorables de operación para la producción de biomasa de microalgas, se fijarán basándonos en los valores más elevados de la velocidad específica máxima de crecimiento y productividad, junto con una composición bioquímica enriquecida en la fracción lipídica y con un perfil de ácidos grasos favorable para la obtención de biodiesel.

4. PARTE EXPERIMENTAL



ÍNDICE

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 REACTIVOS QUÍMICOS, EQUIPOS Y OTROS MATERIALES.....	41
4.1.1 Reactivos químicos.....	41
4.1.2 Equipos.....	41
4.1.3 Otros materiales.....	42
4.2 TOMA DE MUESTRA Y CARACTERIZACIÓN DE LAS AGUAS RESIDUALES ANTES Y DESPUÉS DEL PROCESO.....	43
4.2.1 Aguas de lavado de aceitunas.....	43
4.2.2 Aguas de lavado de aceite	43
4.2.3 Aguas residuales urbanas. Tratamiento secundario.....	43
4.2.4 Parámetros de caracterización.....	43
4.2.4.1 pH del efluente.....	43
4.2.4.2 Conductividad eléctrica.....	43
4.2.4.3 Turbidez (FTU).....	43
4.2.4.4 Oxígeno disuelto.....	43
4.2.4.5 Sólidos totales.....	44
4.2.4.6 Materia grasa.....	44
4.2.4.7 Compuestos fenólicos totales.....	44
4.2.4.8 Materia orgánica volátil.....	45
4.2.4.9 Demanda bioquímica de oxígeno (DBO5).....	45
4.2.4.10 Demanda química de oxígeno (DQO).....	45
4.2.4.11 Cenizas.....	45
4.2.4.12 Nitrógeno total.....	46
4.2.4.13 Nitritos.....	46
4.2.4.14 Nitratos.....	46
4.2.4.15 Amonio.....	46
4.2.4.16 Fosfatos.....	47
4.2.4.17 Sulfatos.....	47
4.2.4.18 Cobre.....	47
4.2.4.19 Cloruros.....	47
4.2.4.20 Magnesio.....	47
4.3 INSTALACIÓN EXPERIMENTAL.....	49
4.3.1 Agitador orbital.....	49
4.3.2 Instalación de cultivo.....	49
4.3.2.1 Fotobiorreactores.....	49
4.3.2.2 Suministro de aire.....	50
4.3.2.3 Suministro de aire y dióxido de carbono.....	50

4.3.2.4 Circuito de termostatación	50
4.3.2.5 Agitación mecánica	51
4.3.2.6 Medida y control del pH	51
4.3.2.7 Sistemas de iluminación	51
4.4 PROCEDIMIENTO	53
4.4.1 Microalga utilizada	53
4.4.2 Medios de cultivo	53
4.4.3 Comienzo y desarrollo de los experimentos	54
4.4.3.1 Cultivo y desarrollo de los cultivos	55
4.4.3.2 Medida de los caudales de aire y dióxido de carbono	55
4.4.3.2.1 Ecuaciones de calibrado de los medidores de caudal	55
4.4.3.3 Determinación de la intensidad de iluminación	57
4.5 MEDIDA DEL CRECIMIENTO CELULAR	59
4.5.1 Absorbancia de la suspensión de células	59
4.5.2 Peso seco de la biomasa	59
4.5.3 Número de células	63
4.6 COMPOSICIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA BIOMASA	65
4.6.1 Determinación del contenido de proteínas	65
4.6.2 Pigmentos	65
4.6.2.1 Concentración de clorofilas	65
4.6.2.2 Carotenoides totales	66
4.6.3 Concentración de lípidos totales	66
4.6.4 Contenido en ácidos grasos de la fracción lipídica	67
4.6.5 Análisis elemental	67
4.7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

4.1 REACTIVOS QUÍMICOS, EQUIPOS Y OTROS MATERIALES

A continuación se relacionan los materiales utilizados en este trabajo de investigación, clasificados en reactivos químicos, equipos y otros materiales.

4.1.1 Reactivos químicos

Los reactivos químicos, fórmula, origen y pureza, han sido:

- Acetona (C_3H_6O), Panreac, QP.
- Ácido bórico (H_3BO_3), Merck, PRS.
- Ácido clorhídrico 37% (HCl), Panreac, QP.
- Ácido etilendiaminotetraacético, sal disódica dihidrato ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$), Panreac, PA.
- Alcohol n-amílico ($C_5H_{12}O$), Panreac, PRS.
- 1-Butanol ($C_4H_{10}O$), Panreac, PRS.
- Calcio dicloruro dihidrato ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), Merck, PRS.
- Cloranfenicol ($C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$), Fluka. BioChemika, GA 13183.
- Cloroformo ($CHCl_3$), Panreac, PA.
- Cloruro de acetilo (CH_3COCl), Panreac, PRS.
- Cobre (II) sulfato pentahidrato ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), Carlo Erba, RPE-ACS.
- n-Hexano (C_6H_{14}), Panreac, PA.
- Hierro (II) sulfato heptahidrato ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$), Merck, PA.
- Manganeso (II) sulfato monohidrato ($MnSO_4 \cdot H_2O$), Carlo Erba, RPE.
- Magnesio sulfato heptahidrato ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), Carlo Erba, RPE-ACS.
- Metanol (CH_4O), Probus S.A., AI.
- Molibdato amónico ($(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$), Panreac, QP.
- Potasio nitrato (KNO_3), Merck, PRS.
- Potasio yoduro (KI), Panreac, PA.
- Reactivo para determinación de proteínas, Bio-Rad, Cat. 500-0006.
- Sodio dihidrogenofosfato monohidrato ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$), Merck, PA.
- Sodio hidrogenofosfato monohidrato ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$), Merck, PA.
- Sodio hidróxido (NaOH), Panreac, PRS.

4.1.2 Equipos

- Agitador magnético, Selecta, Mod. Asincro S-379.
- Agitador orbital, OVAN, Mod. Orbital maxi HD.
- Autoclave, Raype, Mod. A6.110.DRY.
- Agua ultrapura, Elix Technology Inside, Mod. Inegral 10.
- Analizador elemental automático CHNS, Leco, Mod. TruSpec Micro CHNS.
- Balanza analítica, Mettler Toledo, Mod. AB204-S/FACT.
- Baño del rotavapor, BUCHI, Mod. 480.
- Baño con cabeza de termostatación, Selecta, Mod. Tectron-100.
- Baño con un refrigerador y serpentín de inmersión, Selecta, Mod. 398.
- Bomba compresor, Rena, Mod. 301.
- Cabina de flujo laminar, Telstar, Mod. Mini-V/PCR.

- Calefactor de bloque metálico, Dinko Instruments, Mod. D-65.
- Centrífuga, Hettich, Mod. Universal 32.
- Conductímetro, Crison, Mod. 524.
- Cromatógrafo, Shimadzu, Mod. GC-2010 Plus ATF.
- Estufa de secado, Memmert, Mod. UE 500.
- Espectrofotómetro, Thermo, Mod. Helios γ .
- Fotómetro, Merck KG aA, Mod. Spectroquant NOVA 60.
- Horno, Thermolyne, Mod. 1300.
- Medidor de intensidad de iluminación, Biospherical Instruments Inc., Mod. QSL-200.
- Microscopio, Moticam, Mod. BA210.
- Oxímetro portátil, Crison, Mod. OXI 92.
- PF04-Liofilizador, Thermo, Mod. VLP195F.
- pH metro, Crison, GLP 22, Mod. 2001.
- Rotavapor, BUCHI, Mod. R114.
- Sistema para determinación de DBO, Velp Scientifica, Mod. FTC 90.
- Sistema para determinación de DBO, Velp Scientifica, Mod. S/N 118397.
- Sonicador, Branson, Mod. Sonifier, S-450A.
- Turbidímetro, Hanna, Mod. HI 93703.

4.1.3 Otros materiales

- Algodón graso.
- Cubetas y micro cubetas de paso de luz de 1 cm, Kartell.
- Cubetas de cuarzo de paso de luz de 1 cm, Hellma.
- Disolución tampón (pH = 7,00; 25 °C), Crison, Cat. no 23-111-02.
- Disolución tampón (pH = 4,00; 25 °C), Crison, Cat. no 23-110-02.
- Disolución electrolito para electrodo de pH-metro, Crison (Crisolyt-A, KCl 3M + AgCl), Cat. no 95-01.
- Disolución electrolito para electrodo de oxímetro, Crison, Cat. no 95 00.
- Filtro para esterilización de aire de 0,2 μm tamaño de poro, Millipore, Mod. Millex-FG50.
- Gasas estériles, Disfasan S.L.
- Jeringas esterilizadas de 5 cm^3 , Terumo.
- Lana de vidrio (lavada), Panreac, QP
- Membranas de acetato de celulosa de 0,2 μm de porosidad, Sartorius, Ref. 11107-47-N.
- Membranas de nitrato de celulosa de 0,8 μm de porosidad, Sartorius, Ref. 11304-47-N.
- Membranas de nitrato de celulosa de 0,45 μm de porosidad, Sartorius, Ref. 11306-47-N.
- Prefiltro de lana de vidrio, Sartorius, Ref. 13400-47-Q.
- Papel de filtro, Filter-Lab, 1305.
- Patrón de conductividad (KCl 0,10 M, 1413 $\mu\text{S}/\text{cm}$, 25 °C), Crison, Cat. no 97 10.
- Pipetas Pasteur estériles desechables de 3 cm^3 , Deltalab.
- Termómetro de mercurio, escala opal, rango 0 - 200°C, Nahita.
- Tubos fluorescentes (TF), Philips TLD 36W/54.

4.2 TOMA DE MUESTRA Y CARACTERIZACIÓN DE LAS AGUAS RESIDUALES ANTES Y DESPUÉS DEL PROCESO

En la realización de este trabajo de investigación se han empleado varios tipos de aguas residuales de almazaras y aguas residuales urbanas procedentes de tratamiento secundario.

4.2.1 Aguas de lavado de aceitunas

Estas aguas han sido tomadas directamente del vertido directo que realiza el equipo de lavado de la almazara Aceites San Antonio S.L.U. (Escañuela, Jaén). Durante la investigación se efectuaron dos recogidas de dicha almazara, 7 de febrero de 2017 y 3 de enero de 2018.

4.2.2 Aguas de lavado de aceites

Se realizaron dos recogidas durante el período de investigación; la primera el 13 de enero de 2017, y la segunda el 3 de enero de 2018. También, esta agua residual fue tomada de la almazara Aceites San Antonio S.L.U. (Escañuela, Jaén), directamente a la salida de la centrífuga vertical. Esta almazara usa el proceso continuo de centrifugación utilizando el decánter de dos salidas.

4.2.3 Aguas residuales urbanas. Tratamiento secundario

Las aguas residuales urbanas usadas en este trabajo de investigación han sido tomadas directamente de la salida del decantador secundario en la Estación de Depuración de Aguas Residuales Urbanas de Jaén. La recogida se realizó el 8 de mayo de 2014.

4.2.4 Parámetros de caracterización

4.2.4.1 pH del efluente

Se tomó una muestra de 50 cm³ del efluente y mediante un medidor de pH, Crison, GLP 22. Mod 2001, previamente calibrado, se realizó la medida.

4.2.4.2 Conductividad eléctrica

La conductividad de una disolución es la medida de su capacidad para conducir una corriente eléctrica. Depende de la concentración total de iones y de la naturaleza de éstos. La medida de conductividad del efluente se realizó tomando una muestra de 50 cm³ y utilizando un conductímetro, Crison, mod. 524, previamente calibrado.

4.2.4.3 Turbidez (FTU)

Se tomó una muestra de 50 cm³ del efluente y mediante un turbidímetro, Hanna, Mod. HI 93703, se realizó la medida.

4.2.4.4 Oxígeno disuelto

Para medir el oxígeno disuelto en aguas residuales, se ha usado un dispositivo Crison, Mod. OX192. El procedimiento se llevó a cabo dentro del laboratorio, por lo tanto, la presión de aire debe calibrarse dentro de la habitación de acuerdo con la presión atmosférica fuera de la habitación.

La presión del aire se determina mediante una muestra de agua ultrapura. Se tomó una muestra de 50 cm³ del agua residual y se realizó la medida del oxígeno disuelto.

4.2.4.5 Sólidos totales

Los sólidos totales se calcularon a partir del valor de humedad y materia volátil, ecuación [4.1]:

$$\text{Sólidos totales \%} = (100 - (\% \text{ humedad y materia volátil})) \quad [4.1]$$

En la determinación de la humedad y materias volátiles del efluente se ha seguido la norma TAPPI T 11 m-59, a partir de la pérdida de peso de una muestra de 50 g del efluente cuando se somete a una temperatura de $105 \pm 1^\circ\text{C}$, durante el tiempo necesario para alcanzar pesada constante.

4.2.4.6 Materia grasa

La determinación de la materia grasa en las aguas residuales se ha efectuado mediante extracción sólido-líquido a partir del residuo sólido seco que quedaba después de separar el agua mediante evaporación en estufa de secado a $105 \pm 1^\circ\text{C}$.

- Se tomó una muestra de 50 g de materia sólida seca, se colocó en el cartucho del extractor Soxhlet y se tapa con lana de vidrio.
- Se pesa el matraz vacío del Soxhlet (de 250 cm³).
- Se miden 125 cm³ de hexano técnico (Soxhlet de 125 cm³) y se traspasan al matraz.
- Se empieza a calentar y a partir de la primera gota de hexano que cae encima de la muestra se comienza a medir el tiempo.
- Se continúa el proceso bajo calefacción durante 24 h, en caso de pérdida de disolvente se compensa añadiendo hexano.
- Se separa el disolvente extractor y se pesa el matraz con la materia grasa, después de que se haya alcanzado pesada constante a temperatura de $105 \pm 1^\circ\text{C}$.

El cálculo del rendimiento graso en base seca, se realizó usando la ecuación [4.2]:

$$\% \text{ Materia grasa} = \frac{\text{g de materia grasa}}{\text{g de muestra inicial}} 100 \quad [4.2]$$

4.2.4.7 Compuestos fenólicos totales

El fenol y derivados del fenol reaccionan con un derivado tiazólico dando un azocolorante violeta rojizo que se determina en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 475 nm.

- Se tomó una muestra de 10 cm³ del efluente y se puso en el tubo de reacción, se agregó una microcuchara del reactivo Ph-1K, y otra de reactivo Ph-2K, siguiendo el protocolo indicado por la firma Merck, ref. Spectroquant 1.14551.0001.
- Se mueve el tubo para completar la reacción y se espera un minuto y luego mida en el fotómetro, Merck KG aA, Mod. Spectroquant NOVA 60.

4.2.4.8 Materia orgánica volátil

El porcentaje en materia orgánica del agua residual se obtiene a partir de los sólidos totales y las cenizas, de acuerdo con la expresión:

$$\% \text{ Materia Orgánica} = \% \text{ Sólidos Totales} - \% \text{ Cenizas} \quad [4.3]$$

4.2.4.9 Demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅)

La demanda bioquímica de oxígeno se usa como una medida de la cantidad de oxígeno requerido para la oxidación de la materia orgánica biodegradable, presente en la muestra del efluente, durante cinco días. La demanda de oxígeno de las aguas residuales es resultado de tres tipos de materiales:

- Materia orgánica, utilizable como fuente de carbono por microorganismos aerobios.
- Nitrógeno oxidable, derivado de la presencia de nitritos, amoníaco y en general compuestos orgánicos nitrogenados que sirven como nutrientes para bacterias tales como *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*.
- Compuestos químicos reductores (ion ferroso, sulfitos, sulfuros, que se oxidan por oxígeno disuelto).

Para una correcta evaluación de la DBO₅ se necesita realizar ensayos con diferentes diluciones de la muestra analizada. Éstas dependen de la concentración estimada de los contaminantes, responsables de la demanda de oxígeno.

Las botellas usadas para la incubación son de vidrio, color marrón oscuro de 500 cm³ de capacidad. El análisis se realizó midiendo el O₂ disuelto al comienzo y al final de los cinco días.

4.2.4.10 Demanda química de oxígeno (DQO)

El ensayo de determinación de DQO se utiliza ampliamente para establecer la contaminación en materia orgánica total de las aguas residuales.

Para la obtención de este parámetro se ha utilizado el método espectrofotométrico normalizado de oxidación por dicromato de Merck, Spectroquant 1.14541.0001. La muestra de agua se oxida con una disolución sulfúrica caliente de dicromato potásico y sulfato de plata como catalizador.

- Se agita el tubo de reacción antes de añadir la muestra de 3 cm³.
- Se introduce en un calefactor de bloque metálico con temperatura 148°C durante 2 h.
- Se espera 30 min. para una refrigeración completa y luego se mide en el fotómetro.

4.2.4.11 Cenizas

Las cenizas representan las sales minerales del efluente. Se tomó una muestra de 1 a 2 g de la materia sólida en un crisol de porcelana limpio, seco y tarado previamente. Se colocó la muestra en un horno a 575 ± 5°C de 4 a 8 h para incinerar la materia orgánica hasta lograr pesada constante. El cálculo se realizó usando la ecuación [4.4]:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{g de sales mineral}}{\text{g de muestra ensayada}} \quad [4.4]$$

4.2.4.12 Nitrógeno total

Los compuestos de nitrógeno orgánico e inorgánico se transforman en nitratos de acuerdo con el método de Koroleffs por tratamiento con un agente oxidante en un termo reactor. En ácido sulfúrico concentrado, este nitrato reacciona con un derivado de ácido benzoico para formar un compuesto de nitro rojo que se determina fotométricamente (Merck, Spectroquant 1.14537.0001).

- Se tomó una muestra de 10 cm³ del efluente en el tubo de la reacción y se adicionó dos microcuchara del reactivo N-1K y seis gotas de reactivo N-2K.
- Se introdujo 1 h en un calefactor de bloque metálico a temperatura de 120°C.
- Se esperó 30 min. para una refrigeración completa, y se tomó 1,5 cm³ de muestra. Todo ello se puso en el tubo de reacción y se adicionó una microcuchara del reactivo N-3K, moviendo el tubo para completar la reacción; finalmente, se esperó 10 min. y luego se midió en el fotómetro.

4.2.4.13 Nitritos

En disolución ácida, los iones nitrito forman con el ácido sulfanílico una sal de diazonio que reacciona con el diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina dando un azocolorante violeta rojizo.

- Se tomó una muestra de 5 cm³ y se puso en el tubo de reacción.
- Se esperó 10 min. para completar la reacción, que implica un cambio de color a violeta rojizo. Este colorante se determina fotométricamente a 525 nm (Merck, Spectroquant 1.14547.0001).

4.2.4.14 Nitratos

En disolución sulfúrica y fosfórica los iones nitrato forman con 2,6-dimetilfenol (DMP) el compuesto 4-nitro-2,6-dimetilfenol.

- Se tomó una muestra de 1 cm³ del efluente en el tubo de reacción y se añadió 1 cm³ del reactivo NO₃-1K. Se esperó 10 min. para completar la reacción y luego se midió en fotómetro a 338 nm (Merck, Spectroquant 1.14563.0001).

4.2.4.15 Amonio

El nitrógeno amoniacal se presenta, en parte en forma de iones amonio, y en parte en forma de amoniaco. Entra ambas formas de aparición existe un equilibrio dependiente del pH. En disolución fuertemente alcalina, en la que prácticamente sólo existe amoniaco, tiene lugar con iones hipoclorito una transformación en monocloramina.

- Se tomó una muestra de 0,1 cm³ del efluente en el tubo de reacción y se adicionó una microcuchara del reactivo NH₄-1K.
- Se agitó el tubo para completar la reacción. Se esperó 15 min. y luego se midió en el fotómetro (Merck, Spectroquant 1.14559.0001).

La monocloramina forma con un fenol substituido un derivado azul de indofenol que se mide fotométricamente. Debido a la tinción propia de color amarillo del valor blanco de los reactivos, la disolución de medición aparece en color amarillo-verde a verde.

4.2.4.16 Fosfatos

En disolución sulfúrica, iones orto fosfato forman con los iones molibdato ácido, molibdofosforico. Este último, con ácido ascórbico, se reduce a azul de fosfomolibdeno.

- Se tomó una muestra de 1 cm³ en el tubo de reacción y se añadió una gota del reactivo P-1K.
- Se introdujo en un calefactor de bloque metálico con temperatura 120°C durante 30 min.
- Se esperó 30 min. para una refrigeración completa y se añadía 5 gotas del reactivo P-2K, y una microcuchara del reactivo P-3K. Se esperó para completar la reacción 10 min. y luego se midió en el fotómetro de acuerdo con el procedimiento de Merck, Spectroquant 1.14729.0001.

4.2.4.17 Sulfatos

Los iones sulfatos forman con los iones bario, sulfato bórico difícilmente soluble.

- Se tomó una muestra de 5 cm³ del efluente en el tubo de reacción y se añadió una microcuchara del reactivo SO₄-K. Se agitó el tubo para completar la reacción, esperando dos min., y luego midió en el fotómetro (Merck, Spectroquant 1.14548.0001).

4.2.4.18 Cobre

En un medio amoniacal, los iones cobre (II) forman con cuprizona un complejo azul.

- Se tomó una muestra de 5 cm³ del efluente en el tubo de reacción y se agregó cinco gotas del reactivo CU-1K.
- Se agitó el tubo para completar la reacción, esperando cinco min. y luego se midió en el fotómetro (Merck, Spectroquant 1.14553.0001).

El valor del pH debe encontrarse en el intervalo 7,0-9,5.

4.2.4.19 Cloruros

Los iones cloruro reaccionan con tiocianato de mercurio (II) dando cloruro de mercurio (II) poco disociado. El tiocianato aquí liberado forma con iones hierro (III) tiocianato de hierro (III) que se mide fotométricamente.

- Se tomó una muestra de 5 cm³ de efluente en el tubo de reacción y se añadió 2,5 cm³ del reactivo Cl-1K y 0,5 cm³ de reactivo Cl-2K.
- Se agitó el tubo para completar la reacción. Después se puso la muestra en oscuridad un minuto y luego se midió en el fotómetro (Merck, Spectroquant 1.14897.0001).

4.2.4.20 Magnesio

En disolución neutra, los iones magnesio forman con purpura de ftaleína un colorante violeta.

- Se tomó una muestra de 1 cm³ del efluente en el tubo de reacción y se añadió 1 cm³ del reactivo Mg-1K.
- Se esperó 3 min. y luego se adicionó tres gotas del reactivo Mg-2K.
- Se agitó el tubo para completar la reacción y se midió en el fotómetro siguiendo el procedimiento indicado por Merck, Spectroquant 1.00815.0001.

4.3 INSTALACIÓN EXPERIMENTAL

En la realización de los experimentos se han usado las instalaciones de cultivo del Grupo de Investigación 'Bioprocesos (TEP-138, Junta de Andalucía)', Área de Ingeniería Química, en la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén.

Las instalaciones están situadas en una dependencia separada del laboratorio, lo que facilita el control de los experimentos.

4.3.1 Agitador orbital

En este trabajo, se utilizó un agitador orbital OVAN, mod. Orbital maxi HD, conectado con el equipo de control de temperatura OVAN, mod. IC10-C+ACOP E, para mezclar, homogeneizar y preparar cada experimento. Este equipo consiste en un control de tiempo que puede ajustarse de acuerdo con necesidad, así como tener algún control de velocidad. El equipo está constituido por una plataforma con dos niveles. En el parte superior es donde se ha colocado los Erlenmeyer con la suspensión de microalgas; la base de estos niveles de la plataforma contiene un material antideslizante para evitar la caída de los Erlenmeyer. La iluminación se controla a través de un temporizador.

Antes de comenzar el experimento, todo el sistema es desinfectado con etanol para evitar la contaminación.



Figura 4.1 Elementos básicos del agitador orbital y equipo de control de temperatura.

4.3.2 Instalación de cultivo

La instalación está equipada con cinco agitadores magnéticos, Selecta, mod. Asincro S-379, que se conectan 10 min., antes de la toma la muestra, con el objetivo de homogeneizar el medio después de introducir el inóculo. En las Figuras 4.2 y 4.3 se han representado los elementos básicos de la instalación de cultivo.

4.3.2.1 Fotobiorreactores

Cada fotobiorreactor tiene una capacidad útil de 500 cm³, consta de dos cilindros concéntricos verticales, uno interior donde se mantiene el medio de cultivo durante el experimento y otro exterior, que funciona como camisa de termostatación. La camisa está provista de dos conexiones de entrada y salida en su parte inferior y superior respectivamente (entrada de agua, EA, y salida de agua, SA). El fotobiorreactor está cerrado por su parte superior por una tapa con dos orificios, uno de ellos para el suministro de aire y

para la toma de muestras (1), el otro para el suministro inicial del medio de cultivo (2), control, y medida el pH. Éste último está provisto de un tapón que tiene la forma de cono y que permite solamente la salida de aire, Fig. 4.2.

4.3.2.2 Suministro de aire

El aire introducido a los fotobiorreactores fue suministrado por una bomba-compresor Rena, mod. 301 (3), que dispone de un regulador de caudal. El aire en su camino a los fotobiorreactores pasa por los siguientes elementos:

- Un filtro que contiene algodón hidrófobo para la retención de las partículas en suspensión que lleva el aire consigo (4).
- Una unión en forma de T introducida en una columna estabilizadora que contiene agua ultrapura, que permite posteriormente la regulación de los caudales de aire en cada fotobiorreactor (5).
- Un frasco lavador que contiene agua ultrapura a la temperatura de trabajo, para la humidificación del aire antes de su entrada a los fotobiorreactores, reduciendo así la evaporación del medio de cultivo (6).
- Un distribuidor de aire con una entrada y cinco salidas (7).
- Una válvula de control (tipo Hoffmann) situada en la conducción entre el distribuidor de aire y el medidor de caudal (8).
- Un medidor de caudal calibrado previamente (9).
- Un filtro tipo Millex-FG50 Millipore de 0,2 μm de tamaño de poro para la esterilización del aire que entra a los fotobiorreactores (10).
- Una conducción de goma de silicona para la introducción del aire en el interior del fotobiorreactor, elegida de un diámetro adecuado para favorecer la formación de burbujas de pequeño tamaño. Simultáneamente, se utiliza para la toma de muestras del cultivo (11).

4.3.2.3 Suministro de aire y dióxido de carbono

La medida de los caudales de aire y CO_2 suministrados a los fotobiorreactores se realizó utilizando diafragmas de vidrio conectados a manómetros diferenciales, que contienen 1-pentanol coloreado con yodo. Los diafragmas se han calibrado midiendo las diferencias de altura manométrica (Δh) que originaban el paso de caudales conocidos de aire o de CO_2 (Q), mediante un medidor de burbuja conectado en serie con la instalación, Tal como se indica en el apartado 4.4.3.2 .

4.3.2.4 Circuito de termostatación

El circuito de termostatación está constituido por varios elementos: un baño, cabeza de termostatación Selecta, mod. Tectron-100 con bomba de recirculación de fluido y un termostato, un termómetro (12) y varias conducciones de PVC que conectan el baño con los diferentes fotobiorreactores. Para trabajar a temperaturas más bajas que la ambiental se ha complementado dicho baño con un refrigerador con serpentín de inmersión Selecta, mod. 398 (13). El fluido utilizado en este circuito ha sido agua destilada.

4.3.2.5 Agitación mecánica

La instalación está equipada con cinco agitadores magnéticos, Selecta, mod. Asincro S-379, (14) que se conectan 10 min. antes de la toma de la primera muestra con el objetivo de homogeneizar el medio después de introducir el inóculo.

4.3.2.6 Medida y control del pH

La medida y control del pH han sido realizados manualmente, haciendo uso de un medidor de pH, Crison, GLP 22, mod. 2001.

4.3.2.7 Sistemas de iluminación

Se han utilizado un sistema de iluminación bajo un ciclo luz/oscuridad (12 h de iluminación por día). El sistema está constituido por dos tubos fluorescentes (TF), Philips TLD 36W/54, luz día, rectos de 120 cm, con una pantalla reflectora (15).



Figura 4.2 Elementos básicos de la instalación experimental de cultivo.

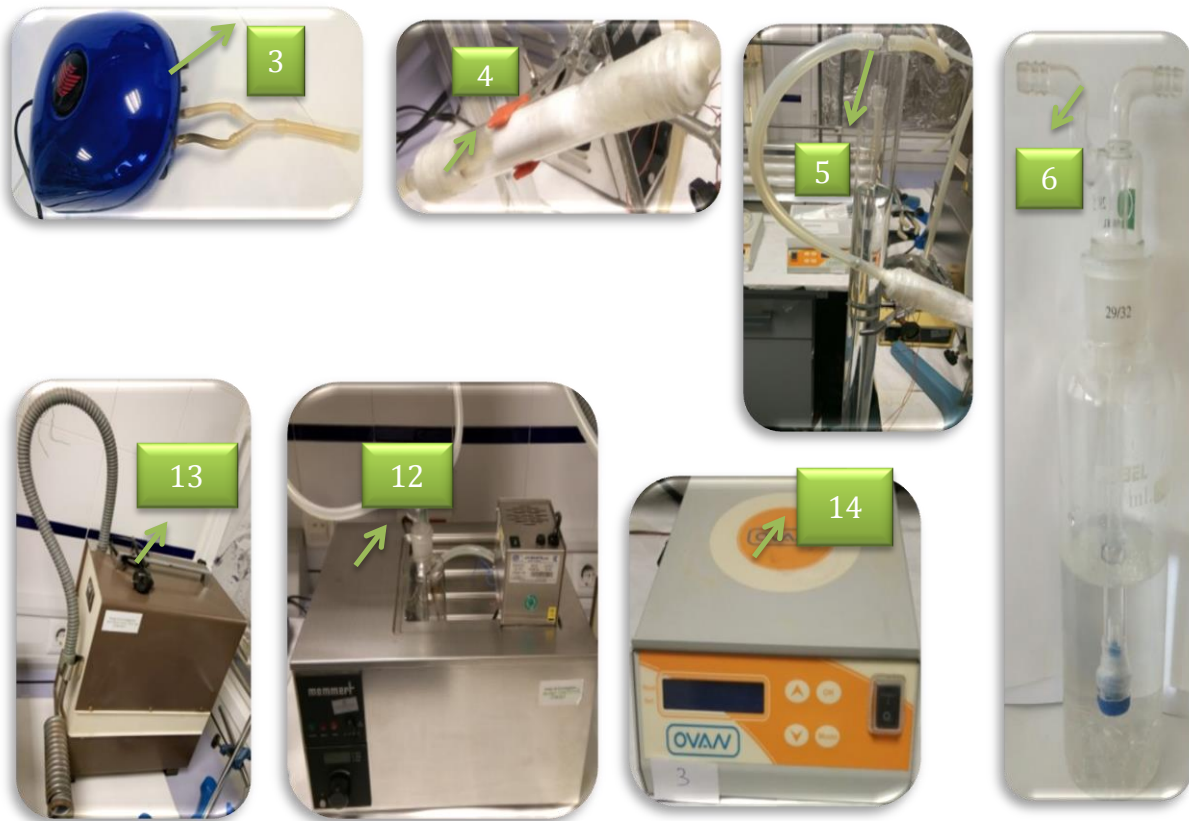


Figura 4.3 Elementos de la instalación de cultivo de microalgas.

4.4 PROCEDIMIENTO

4.4.1 Microalga utilizada

Los cultivos se realizaron con la alga unicelular *Chlorella pyrenoidosa*, Chick 8H Emerson, que se mantuvo en nuestro laboratorio de cultivo.

4.4.2 Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados en este trabajo han sido clasificados de la siguiente forma:

- a) Elaborados con medio Rodríguez-López.
- b) Preparados con aguas de lavado de aceitunas.
- c) Elaborados con aguas de lavado de aceites (procedente del proceso continuo con decánter de dos salidas).
- d) Constituidos con aguas de lavado de aceitunas, y aguas de lavado de aceites (procedente del proceso continuo con decánter de dos salidas).
- e) Elaborados con aguas de lavado de aceitunas, aguas de lavado de aceites (proceso de dos salidas), y aguas residuales urbanas.

➤ Elaborados con medio Rodríguez-López.

La composición de las disoluciones stock del medio de cultivo de Rodríguez - López se encuentra en la Tabla 4.1. La preparación de un litro del medio de cultivo necesita los siguientes volúmenes de cada disolución.

Tabla 4.1. La composición de las disoluciones stock del medio Rodríguez - López

Disolución	Volumen, cm ³
A	100
B	10
C	10
D	1
E	1
F	1

El volumen restante se enrasa con agua ultrapura hasta un litro.

Tabla 4.2. La composición de las disoluciones del medio Rodríguez-lópez

Disolución	Nutriente	Concentración
A	KNO ₃	10,111
	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	16,310
	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,780
B	MgSO ₄ ·7H ₂ O	24,65
C	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,47
D	FeSO ₄ ·7H ₂ O	7,000
	EDTA	9,300
E	MnSO ₄ ·H ₂ O	0,170
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,290
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,250
F	H ₃ BO ₃	0,061
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,013

- Elaborados con aguas del lavado de aceituna, aguas del lavado de aceite y aguas residuales urbanas:

Estos medios de cultivo han consistido en diferentes diluciones de aguas lavado de aceituna y aguas de lavado de aceites. El acondicionamiento del lavado de aceitunas y aceites fresco, proceso continuo con decánter de dos salidas, se describe en el diagrama de la Figura. 4.4.

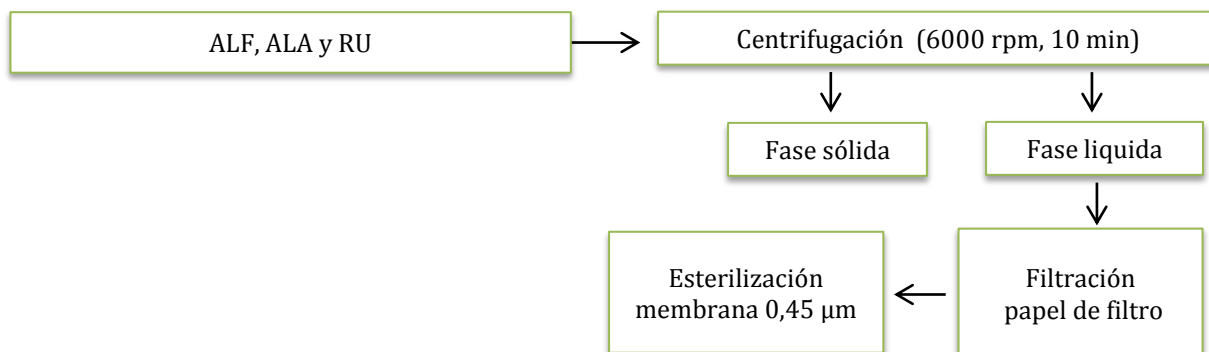


Figura 4.4 Diagrama de flujo de preparación de aguas de lavado de aceitunas, aguas de lavado de aceites y agua residuales urbanas.

4.4.3 Comienzo y desarrollo de los experimentos

Para iniciar los experimentos es necesario introducir el medio de cultivo y el inóculo en el fotobiorreactor (que ha sido previamente esterilizado en la autoclave). El trabajo empieza en una cabina de flujo laminar, Telstar, mod. Mini-V / PCR, se desinfecta con etanol y radiación ultravioleta durante 10 min., para evitar la contaminación.

4.4.3.1 Cultivo y desarrollo de los cultivos

La introducción del medio en el reactor se realiza en una cabina de flujo laminar, provista de una goma de silicona; el medio de cultivo es impulsado por una bomba peristáltica y haciéndolo pasar por un portafiltro de policarbonato que contiene un pre-filtro y una membrana de 0,45 μm de porosidad, previamente esterilizados en autoclave. A continuación se añade el inóculo. El pequeño laboratorio donde está situada la instalación, previamente limpia y preparada, se somete a desinfección durante aproximadamente 15 min mediante un tubo de rayos U.V. Una vez inoculado el cultivo, se trasladan los reactores a la instalación y se ajustan las variables de operación a los valores seleccionados para el experimento. Durante el primer día se toman cuatro muestras y durante los tres siguientes días de cultivo se toman tres muestras diarias de la suspensión de células, que se reducen a una a partir del cuarto día. En cada muestra se determinan los parámetros del crecimiento celular y de composición bioquímica de la biomasa (clorofilas, carotenoides y proteínas de la biomasa). Los experimentos finalizan una vez el crecimiento alcanza la fase estacionaria, para evitar el deterioro de la biomasa obtenida.

4.4.3.2 Medida de los caudales de aire y dióxido de carbono

La medida de los caudales de aire y dióxido de carbono suministrados a los fotobiorreactores se realizó utilizando diafragmas de vidrio conectados a manómetros diferenciales que contienen 1-pentanol con yodo. Los diafragmas se han calibrado midiendo las diferencias de altura manométrica (Δh) que originaban el paso de caudales conocidos de aire (Q), mediante un medidor de burbuja conectado en serie con la instalación. Mediante el método de mínimos cuadrados se han obtenido las ecuaciones que relacionan los parámetros Q y Δh , expresados en ($\text{dm}^3 \text{min}^{-1}$) y (cm), respectivamente. Teniendo en cuenta la pequeña variación en la temperatura de trabajo, la calibración se ha realizado a temperatura ambiente.

4.4.3.2.1 Ecuaciones de calibrado de los medidores de caudal

Por el método de mínimos cuadrado, se han obtenido las ecuaciones que se recogen en la Tabla 4.3, donde Q y Δh van expresados en ($\text{dm}^3 \text{min}^{-1}$) y (cm), respectivamente.

Tabla 4.3. Ecuaciones de calibrado de los medidores de caudal de aire y dióxido de carbono con indicación de la bondad del ajuste (r^2)

Medidor	Ecuación	r^2
1	$\log Q = 0,523 \log \Delta h - 0,330$	0,997
2	$\log Q = 0,577 \log \Delta h - 1,03$	0,999
3	$\log Q = 0,673 \log \Delta h - 0,737$	0,996
4	$\log Q = 0,603 \log \Delta h - 0,333$	0,996
5	$\log Q = 0,529 \log \Delta h - 0,428$	0,999
Dióxido de carbono (CO_2)		
6	$\log Q = 0,673 \log \Delta h - 1,54$	0,998
7	$\log Q = 0,642 \log \Delta h - 1,81$	0,999

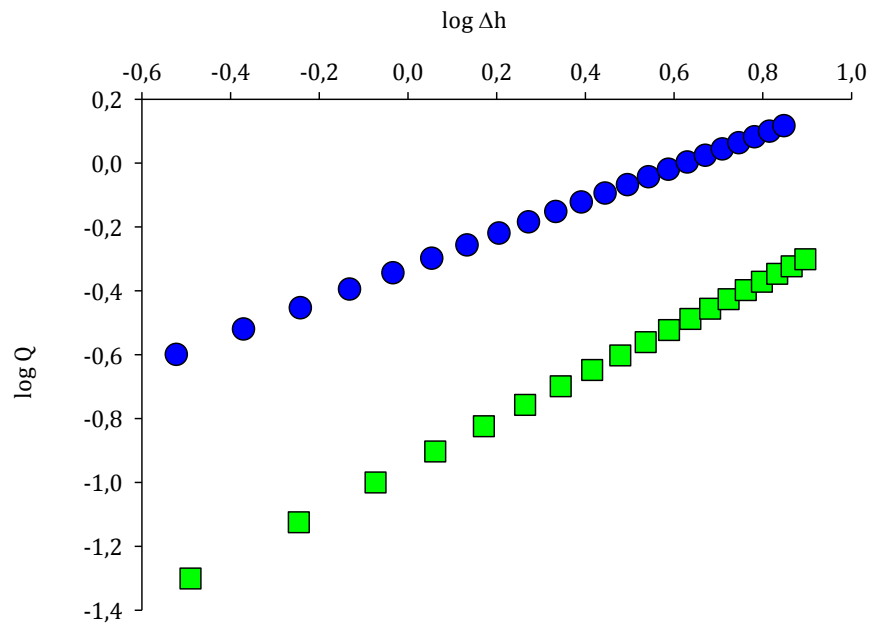


Figura 4.5 Rectas de calibrado de los medidores de caudal 1 (●) y 2 (■).

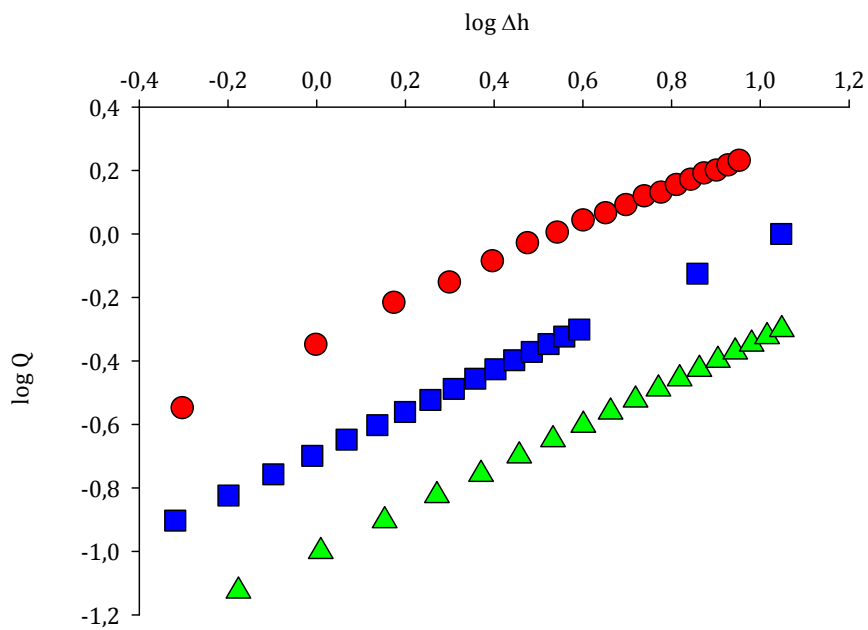


Figura 4.6 Rectas de calibrado de los medidores de caudal 3 (▲), 4 (●) y 5 (■).

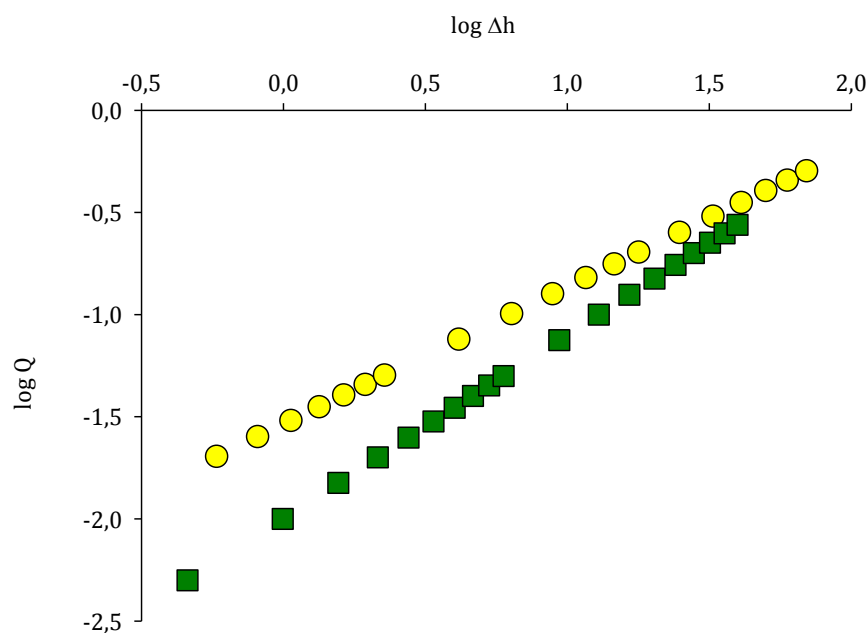


Figura 4.7 Rectas de calibrado de los medidores de caudal 6 (●) y 7 (■) para el CO₂.

4.4.3.3 Determinación de la intensidad de iluminación

La medida de la intensidad inicial de iluminación (I_0) se realizó con los fotobiorreactores vacíos y con el líquido de termostatación circulando. Para la medida de (I_0) se han realizado un total de 15 determinaciones puntuales en cada fotobiorreactor; tres grupos de cinco medidas a tres alturas diferentes (a partir de la base) en los fotobiorreactores de 500 cm³.

Para el cálculo de la intensidad media de iluminación se han promediado en primer lugar a cada altura (i) las medidas en la forma:

$$I_i^D = \frac{I_i^D + I_i^P}{2} \quad [4.5]$$

donde I_i^D es la intensidad promediada para las medidas de la parte delantera del fotobiorreactor, I_i^P para la parte posterior, en el sistema de iluminación con tubos fluorescentes rectos, ya que en el otro es indiferente. La ecuación utilizada para promediar, ha sido del tipo:

$$I_i^D = \frac{\int_0^{L/2} I_i(x) dx}{L/2} \quad [4.6]$$

siendo L la longitud de la circunferencia del cilindro del fotobiorreactor ($L/2 = 11,78$ cm, $L/4 = 5,89$ cm en reactor de 500 cm³). La ecuación para ajustar los valores experimentales de las medidas ha sido:

$$I_i(x) = a + b x + c x^2 \quad [4.7]$$

donde, x corresponde a la longitud del arco a partir de un punto de referencia ($x = 0$; 5,89 y 11,78 cm reactor de 500 cm³). La determinación de los coeficientes a , b y c se efectúa resolviendo un sistema de tres

ecuaciones. Finalmente, se determina la media para los tres niveles, asignándole al segundo nivel doble peso respecto al primero y tercero, por estar situado en la parte central del fotobiorreactor:

$$I_0 = \frac{I_1 + I_2 + I_3}{4} \quad [4.8]$$



Figura 4.8 Medidor de Biospherical Instruments Inc. Mod.QSL-200.

Los valores medios de las medidas de intensidad inicial de iluminación (I_0) y final (I_F) en cada una de las series experimentales llevadas a cabo utilizando diferentes medios de cultivos se han calculado, así como el valor medio de todas las medidas realizadas, Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Valores medios de las intensidades inicial y final de iluminación obtenidos en cada una de los diferentes medios de cultivos

Medios de cultivos	Iluminación inicial ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Iluminación final ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
- Rodríguez-López (R-L)*	136,4	112,6
- Rodríguez-López (R-L)**	132,7	121,9
- Aguas de lavado de aceitunas (ALF)	135,2	117,5
- Aguas de lavado de aceites (ALA)	126,2	123,1
- Aguas de lavado de almazara con aguas residuales urbanas	140,6	116,8
- Aguas de lavado de aceitunas y CO_2 (ALFC)	134,2	117,7
- Aguas de lavado de aceites y CO_2 (ALAC)	137,4	117,7
- Aguas de lavado de almazara con aguas residuales urbanas y CO_2	141,2	113,4
Valor medio de todas las medidas	135,5	117,6

* Serie experimental sobre el efecto de la temperatura de operación.

** Serie experimental sobre la influencia de la velocidad específica de suministro de aire.

4.5 MEDIDA DEL CRECIMIENTO CELULAR

Para la evaluación del crecimiento celular se han utilizado los siguientes parámetros:

- Absorbancia de la suspensión de células.
- Peso seco de la biomasa.
- Número de células.

4.5.1 Absorbancia de la suspensión de células

La absorbancia de la suspensión de microalgas en los medios de cultivo que se han usado en este trabajo de investigación está influenciada por el color que aporta el agua residual (procedente del proceso continuo con decánter de dos salidas) presente en los mismos, más o menos intenso en función de la dilución utilizada.

Para soslayar este inconveniente, hay que eliminar previamente el medio de cultivo. Para ello, se ha utilizado el método siguiente:

- Se toman 5 cm³ de cultivo mediante una jeringa estéril.
- Se centrifugan 10 min a 6000 rpm.
- Se elimina el sobrenadante, realizando dos lavados con agua ultrapura.
- La biomasa obtenida se resuspende en agua ultrapura al volumen primitivo de la muestra y se mide la absorbancia.

La medida de absorbancia se ha llevado a cabo con un espectrofotómetro de un solo haz, Thermo, Mod. Helios γ , a una longitud de onda de 600 nm, utilizando cubetas de paso de luz de 1 cm, de un sólo uso. La elección de la longitud de onda se hizo considerando la revisión bibliográfica realizada (Camacho *et al.* 1989). De acuerdo con la ley de Lambert-Beer, se pueden generar desviaciones de la recta de calibrado al sobrepasar un valor determinado de absorbancia (en nuestro caso a partir de valores próximos a 0,550). Para impedirlo se han realizado, previamente a la medida de la absorbancia, las diluciones adecuadas a las muestras que superan dicho valor.

4.5.2 Peso seco de la biomasa

La concentración celular, g dm⁻³, se ha medido indirectamente mediante la absorbancia de la suspensión celular a una longitud de onda de 600 nm, estableciendo previamente una recta de calibrado peso seco-absorbancia. Para la obtención de esta recta de calibrado se determinó la absorbancia y la concentración de biomasa al principio de la fase estacionaria de crecimiento para todos los experimentos. La concentración de biomasa (en peso seco) se ha obtenido tomando una muestra de 50 cm³ de suspensión celular que se centrifuga, se lava dos veces con agua ultrapura y se seca en estufa a 105 $\pm$ 1°C hasta pesada constante. Los valores de la concentración celular frente a la absorbancia aparecen en las Tablas 4.4 a 4.7 para los medios de cultivos formados a partir del usado por Rodríguez-López (R-L), y aquellos constituidos por aguas del lavado de aceitunas (ALF), aguas del lavado de aceites (ALA), y aguas residuales urbanas (RU) respectivamente.

Tabla 4.5. Relación entre Peso seco y Absorbancia a 600 nm, cuando se usó el medio Rodríguez-López

A_{600}	$\times 10^2$ g, dm ⁻³	A_{600}	$\times 10^2$ g, dm ⁻³	A_{600}	$\times 10^2$ g, dm ⁻³	A_{600}	$\times 10^2$ g, dm ⁻³
0,00	0,00	0,039	0,749	0,070	1,60	0,157	3,95
0,018	0,401	0,04	0,959	0,072	1,77	0,163	4,01
0,021	0,413	0,044	1,09	0,077	1,95	0,188	4,44
0,023	0,461	0,045	1,13	0,078	1,99	0,202	4,98
0,025	0,484	0,047	1,15	0,081	2,02	0,208	5,30
0,026	0,519	0,052	1,20	0,090	2,36	0,228	7,72
0,027	0,565	0,053	1,22	0,095	2,77	0,237	7,74
0,028	0,576	0,057	1,31	0,100	2,89	0,254	8,33
0,031	0,599	0,063	1,37	0,114	2,97	0,284	8,84
0,034	0,656	0,064	1,42	0,115	3,19	0,429	15,4
0,035	0,706	0,065	1,44	0,117	3,21	0,448	15,5
0,036	0,716	0,066	1,45	0,139	3,33	0,510	16,7
0,037	0,724	0,067	1,53	0,142	3,54	0,535	18,6

Tabla 4.6. Relación entre Peso seco y Absorbancia a 600 nm, cuando se usó el medio con aguas de lavado de aceitunas

A_{600}	$\times 10^2$ g, dm ⁻³	A_{600}	$\times 10^2$ g, dm ⁻³	A_{600}	$\times 10^2$ g, dm ⁻³
0,00	0,00	0,083	2,30	0,164	4,68
0,027	0,920	0,084	2,31	0,167	4,74
0,033	0,955	0,087	2,34	0,170	4,81
0,035	1,148	0,088	2,43	0,176	4,90
0,041	1,19	0,090	2,56	0,179	5,23
0,045	1,24	0,091	2,68	0,183	5,77
0,047	1,26	0,093	2,88	0,185	5,87
0,053	1,31	0,094	2,91	0,189	6,04
0,055	1,44	0,099	2,96	0,217	6,23
0,057	1,48	0,100	3,05	0,219	6,30
0,059	1,55	0,105	3,11	0,221	6,48
0,060	1,62	0,109	3,14	0,227	6,59
0,064	1,74	0,115	3,24	0,273	7,09
0,065	1,82	0,117	3,81	0,279	9,00
0,066	1,83	0,130	4,18	0,281	9,15
0,068	1,87	0,145	4,34	0,312	9,27
0,071	1,98	0,147	4,51	0,315	9,39
0,072	2,10	0,151	4,57	0,330	9,49
0,076	2,22	0,154	4,60	0,335	9,63
0,077	2,28	0,157	4,64	0,361	11,4

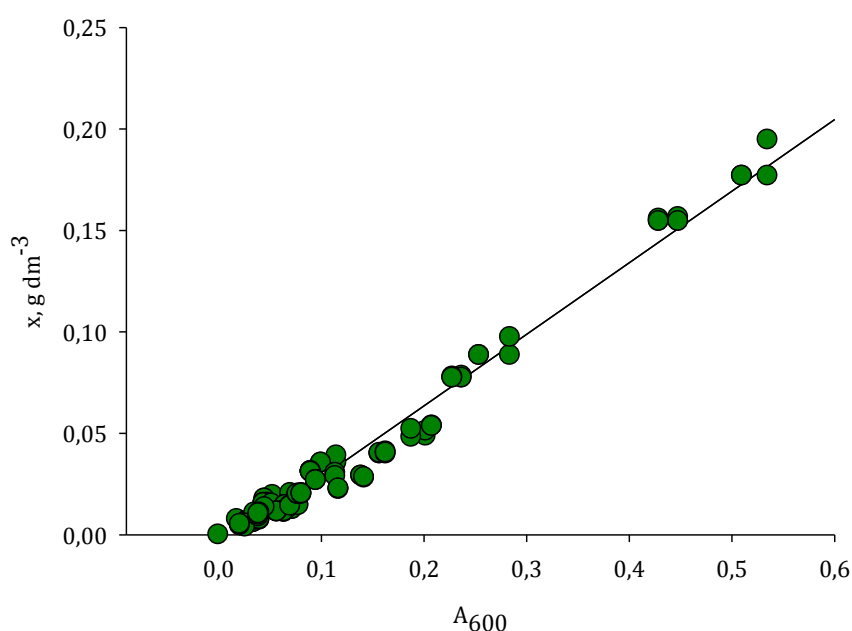
Tabla 4.7. Relación entre Peso seco y Absorbancia a 600 nm, cuando se usó el medio con aguas de lavado de aceites

A_{600}	$\times 10^2$ g, dm ⁻³	A_{600}	$\times 10^2$ g, dm ⁻³
0,00	0,00	0,062	2,06
0,024	0,930	0,064	2,11
0,027	1,11	0,065	2,22
0,029	1,16	0,070	2,36
0,032	1,19	0,072	2,38
0,034	1,21	0,077	2,40
0,038	1,36	0,079	2,44
0,040	1,45	0,080	2,61
0,046	1,52	0,082	2,76
0,048	1,58	0,087	2,90
0,050	1,63	0,091	2,97
0,055	1,66	0,098	3,06
0,058	1,83	0,099	3,21
0,059	1,98		

Tabla 4.8. Relación entre Peso seco y Absorbancia a 600 nm, cuando se usó el medio con aguas residuales urbanas

A_{600}	$\times 10^2$ g, dm ⁻³	A_{600}	$\times 10^2$ g, dm ⁻³
0,00	0,00	0,158	5,62
0,111	3,76	0,158	5,70
0,114	3,89	0,174	5,95
0,116	3,99	0,179	6,36
0,119	4,09	0,231	7,87
0,136	4,42	0,232	8,13
0,147	4,74	0,293	9,31

La representación gráfica de los datos experimentales obtenidos de peso seco frente absorbancia corresponden a rectas (Figuras 4.9 a 4.11), con coeficientes de regresión lineal aceptables, Tabla. 4.8.

Figura 4.9 Concentración de biomasa (x) frente a la absorbancia de la suspensión de células a 600 nm (A_{600}) en el medio de Rodríguez-López.

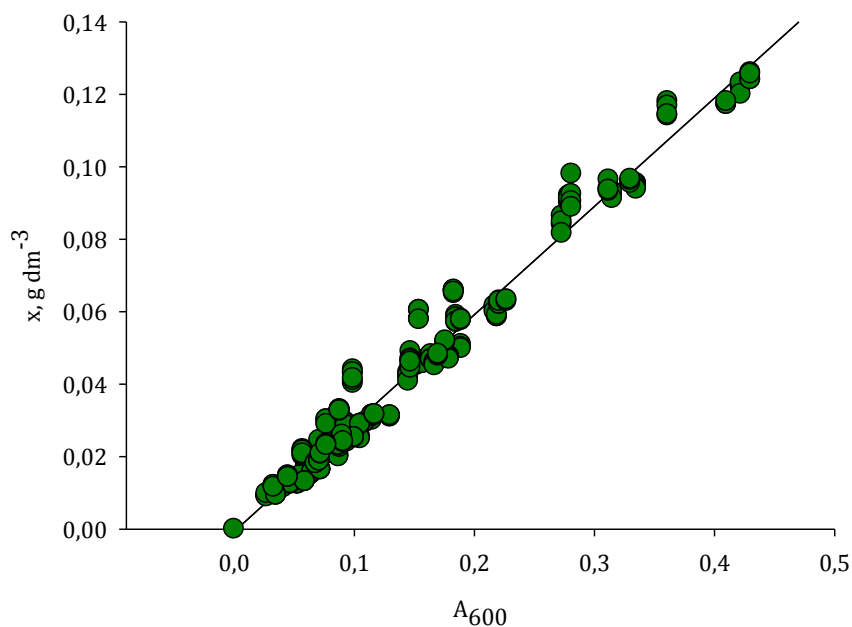


Figura 4.10 Concentración de biomasa (x) frente a la absorbancia de la suspensión de células a 600 nm (A_{600}), en el medio con aguas de lavado de aceitunas, y aguas de lavado de aceitunas con agua residuales urbanas.

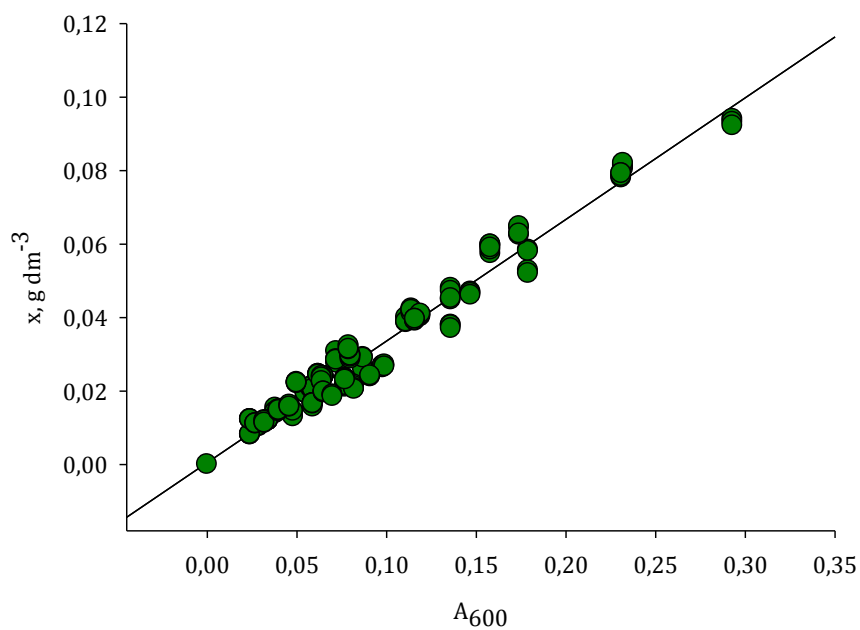


Figura 4.11 Concentración de biomasa (x) frente a la absorbancia de la suspensión de células a 600 nm (A_{600}) en el medio con aguas de lavado de aceites, y aguas de lavado de aceites con aguas residuales urbanas.

Tabla 4.9. Ecuaciones de calibrado peso seco-absorbancia medida 600 nm

Medio de cultivo	Ecuación	r ²
- Rodríguez-López (R-L)	$x \text{ (g dm}^{-3}\text{)} = 0,353 A_{600} - 7 \cdot 10^{-3}$	0,989
- Aguas lavado de aceitunas (ALF)		
- Aguas lavado de aceitunas con aguas residuales urbanas (ALFRU)	$x \text{ (g dm}^{-3}\text{)} = 0,299 A_{600} - 6 \cdot 10^{-4}$	0,987
- Aguas lavado de aceite (ALA)		
- Aguas lavado de aceite con aguas residuales urbanas (ALARU)	$x \text{ (g dm}^{-3}\text{)} = 0,331 A_{600} + 6 \cdot 10^{-4}$	0,982

4.5.3 Número de células

El conteo celular se ha llevado a cabo directamente de las muestras obtenidas en el transcurso de los experimentos, utilizando una cámara de recuento Neubauer y un microscopio Moticam, mod BA210. En esta cámara se diferencian dos zonas, en cada una zona hay 25 cuadrículas y cada cuadrícula está dividida en 16 cuadrados, de manera que el número total de cuadrados por zona es 400, Figura 4.12. El recuento realizado corresponde al número de células que se encuentran en los cuadrados correspondientes a la diagonal de cada cuadrícula (100 cuadrados en cada zona) por lo que en total se cuentan las células que hay en 200 cuadrados.

Las dimensiones de cada cuadrado son de 0,0025 mm² de área por 0,100 mm de profundidad; por tanto, para calcular el número de células por litro de cultivo se utiliza la ecuación [4.9]:

$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de células}}{1 \text{ dm}^3} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ células contadas}}{5} 10^8 \quad [4.9]$$

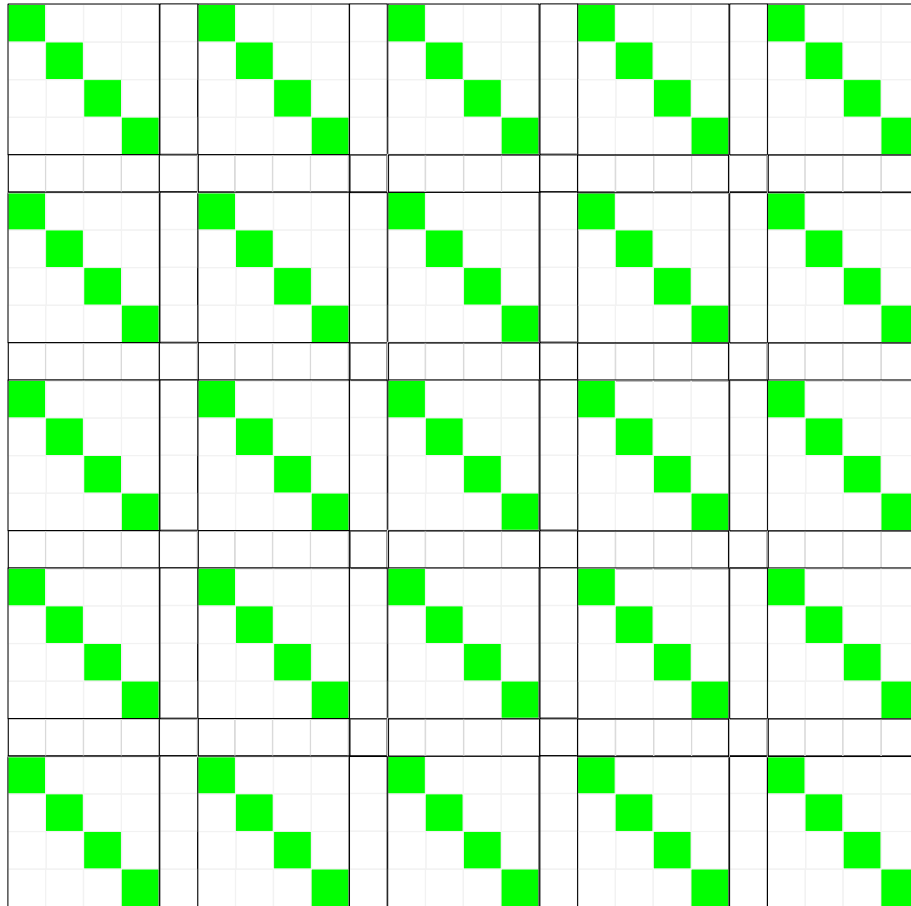


Figura 4.12 Una de las dos zonas de la cámara de Neubauer. En verde se marcan los cuadrados de la diagonal de cada una de las 25 cuadrículas donde se utiliza el conteo celular para determinar el número de células por unidad de volumen.

4.6 COMPOSICIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA BIOMASA

La composición de la biomasa obtenida en los diferentes experimentos se caracterizó realizando las siguientes determinaciones:

- Concentración de proteínas.
- Pigmentos: clorofilas y carotenoides totales.
- Lípidos totales.
- Ácidos grasos en la fracción lipídica.
- Análisis elemental.

4.6.1 Determinación del contenido de proteínas

Para la determinación del contenido en proteínas de la biomasa de microalgas se ha utilizado el método de Bradford (1976).

Procedimiento:

- Se tomó una muestra de 5 cm³ de suspensión de células.
- Se centrifuga, se elimina el sobrenadante y se lava dos veces con agua ultrapura.
- Se resuspende la biomasa obtenida en agua ultrapura al volumen primitivo.
- La muestra se somete a disrupción celular durante 30 min a la máxima potencia y en un baño de hielo, utilizando un sonicador Branson, mod. Sonifier 450.
- Se tomó 1,6 cm³ de la muestra homogeneizada, y se le añade 0,4 cm³ de reactivo Bio-Rad.
- Se agita suavemente evitando la formación de espuma.
- Pasado un tiempo de 10 min, se mide la absorbancia a 595 nm, utilizando cubetas de cristal de paso de luz 1 cm.
- Al mismo tiempo, se prepara un blanco hecho con agua ultrapura y reactivo Bio-Rad.

El cálculo de la concentración de proteínas en (mg dm⁻³), se realizó usando la ecuación [4.10]:

$$\text{Proteínas} = (21 A_{595}) + 0,324 \quad [4.10]$$

4.6.2 Pigmentos

La determinación del contenido de pigmentos, clorofilas y carotenoides totales, se ha realizado según el método de Strickland y Parsons (1968).

4.6.2.1 Concentración de clorofilas

- Se tomó una muestra de 5 cm³ de cultivo.
- Se centrifuga, se elimina el sobrenadante y se lava dos veces con agua ultrapura.
- La biomasa obtenida se sumerge rápidamente en agua hirviendo durante 1 a 2 min, para así mejorar la extracción con el disolvente y reducir posibles acciones enzimáticas (Strain y Svec, 1966; Holden, 1976).
- Debido a la fotosensibilidad de los pigmentos se debe realizar el proceso evitando la iluminación de la muestra. Se envuelve el tubo en papel de aluminio, y se guarda en frigorífico 24 h para la completa extracción de los pigmentos.
- Los extractos con el blanco se clarifican mediante centrifugación durante 10 min a 6000 rpm.

- Se mide la absorbancia del sobrenadante a las longitudes de onda de 647 y 664 nm utilizando micro-cubetas de cristal.

La concentración de clorofilas 'a' y 'b' ($\mu\text{g cm}^{-3}$), se obtuvieron utilizando las ecuaciones [4.11] y [4.12], propuestas por Jeffrey y Humphrey (1975):

$$\text{CHL}_a = (11,93) A_{664} - (1,93) A_{647} \quad [4.11]$$

$$\text{CHL}_b = (20,36) A_{647} - (5,5) A_{664} \quad [4.12]$$

El contenido total en clorofilas en ($\mu\text{g cm}^{-3}$), se obtiene sumando ambas ecuación [4.13]:

$$\text{CHL}_t = (6,43) A_{664} + (18,43) A_{647} \quad [4.13]$$

4.6.2.2 Carotenoides totales

Para la determinación del contenido de carotenoides totales se mide la absorbancia del sobrenadante, separado anteriormente, a la longitud de onda de 480 nm, utilizando cubetas de cristal y para su cálculo se usó la expresión propuesta por Strickland y Parsons (1972):

El cálculo del carotenoides en ($\mu\text{g cm}^{-3}$), se realizó usando la ecuación [4.14]:

$$\text{Carotenoides totales} = (4) A_{480} \quad [4.14]$$

4.6.3 Concentración de lípidos totales

El análisis de la concentración de lípidos totales se realizó a la biomasa seca obtenida al final de cada experimento. La biomasa es liofilizada en un equipo Thermo, Mod. VLP195F. Está diseñado para trabajar con una amplia variedad de accesorios de secado: frascos, viales,...

Entre las características que presentan están:

- Capacidad máxima de la cámara de condensación, 5 dm³.
- Temperatura de trabajo: -50°C.
- Rango de temperatura: T_{ambiente} hasta -60°C.
- Rango de presión: 30 μbar a 50 mbar.



Figura 4.13 Elementos básicos del equipo liofilizador.

Para la determinación de los lípidos totales se lleva a cabo una extracción utilizando una mezcla de cloroformo: metanol 2:1 (v:v) en una relación aproximada de 100 cm³ de mezcla extractora por g de biomasa liofilizada. Esta extracción se lleva a cabo en un matraz Erlenmeyer cerrado para evitar pérdidas de disolvente por evaporación, y con agitación magnética suave durante aproximadamente 24 h. Una vez completada la extracción, se separa el extracto de la biomasa por centrifugación a 6000 rpm durante 10 min., y la biomasa se vuelve a extraer durante otros 10 min., con metanol que tras ser separado igualmente por centrifugación se une al extracto anterior. El extracto total obtenido, que contiene los lípidos totales de la muestra, se lleva a sequedad en rotavapor usando un matraz redondo previamente tarado, y por diferencia de pesada se puede cuantificar el contenido en lípidos totales de la muestra.

4.6.4 Contenido en ácidos grasos de la fracción lipídica

Para la identificación de los ácidos grasos de la biomasa presente en la fracción lipídica, se ha utilizado la cromatografía de gases, siguiendo el método descrito por Lepage y Roy (1984), que no necesita la separación previa de la fracción lipídica. En un tubo de rosca, se introducen de 10 a 15 mg de biomasa seca a la que se adiciona 1 cm³ de una mezcla formada por cloruro de acetilo en metanol en la proporción 1:20 (v/v), y un pequeño imán para lograr la agitación magnética durante la metanolisis realizada a 100°C durante una hora. Una vez la muestra se ha enfriado a temperatura ambiente, se añaden 0,5 cm³ de n-hexano y 1 cm³ de agua ultrapura. Se agita, se centrifuga y se extrae la fase orgánica que contiene los ésteres metílicos formados, la cual se almacena a 4°C, hasta su inyección en el cromatógrafo. Se ha utilizado un cromatógrafo, Shimadzu, GC-2010 Plus ATF, provisto de detector de ionización de llama, con el siguiente programa de temperaturas: temperatura inicial del horno 150 ± 1°C durante 8 min. y a continuación elevación de 3°C min⁻¹ hasta alcanzar 190°C, permaneciendo a esta temperatura durante 23,5 min. Se ha empleado una columna capilar (Supelco) de sílice fundida de alta polaridad SP2330 de 30 m de longitud y 0,25 µm de diámetro de espesor de película. El flujo de gas ha sido de 0,7 cm³ min⁻¹, equivalente a una velocidad lineal de 0,238 m/s, y una relación de venteo 100:1. Tanto la temperatura del inyector como del detector ha sido 220°C. En todas las determinaciones se han inyectado 1,4 µL de disolución de ésteres metílicos. Los patrones utilizados han sido "Rapessed oil mix" y "Pufas-1", nº de catálogo 4-7017 y 4-7033 de Supelco, respectivamente.

4.6.5 Análisis elemental

El análisis de la composición elemental se realizó a la biomasa seca obtenida al final de cada experimento. Para ello, se ha tomado de 1-2 mg de biomasa seca para cada muestra, utilizando un Analizador elemental automático CHNS, Leco, Mod. TruSpec. El equipo disponible en el CICT, está ubicado en la dependencia A2-211. Es un analizador elemental basado en la técnica de combustión total de la micromuestra para la determinación del contenido total de Nitrógeno, Carbono, Hidrógeno y Azufre, en diferentes tipos de muestras sólidas o líquidas (sustancias orgánicas, organometálicas, farmacéuticas, plásticos, polímeros, suelos y residuos agrícolas, aceites, fertilizantes...), el rango analítico para 2 mg de muestra:

- Para C: 0,002 a 100% del contenido total del elemento en la muestra.
- Para H: 0,02 a 50% del contenido total del elemento en la muestra.
- Para N: 0,02 a 50% del contenido total del elemento en la muestra.
- Para S: 0,04 a 65% del contenido total del elemento en la muestra.

El analizador consta de un horno de combustión primario donde caerá la muestra y tendrá lugar la combustión instantánea de la misma. A continuación, se encuentra un horno de postcombustión secundario que retiene el exceso de oxígeno. Ambos hornos tienen un control de temperatura independiente programable hasta 1100°C. Dispone de un sistema de detección mediante detectores independientes para cada elemento:

- Carbono: detector selectivo de absorción IR de CO₂.
- Hidrógeno: detector selectivo de absorción IR de H₂O.
- Nitrógeno: detector de termoconductividad diferencial TOD.
- Azufre: detector selectivo de absorción IR de SO₂.

También está dotado de un cargador automático de muestras con 2 carruseles de 30 posiciones cada uno.

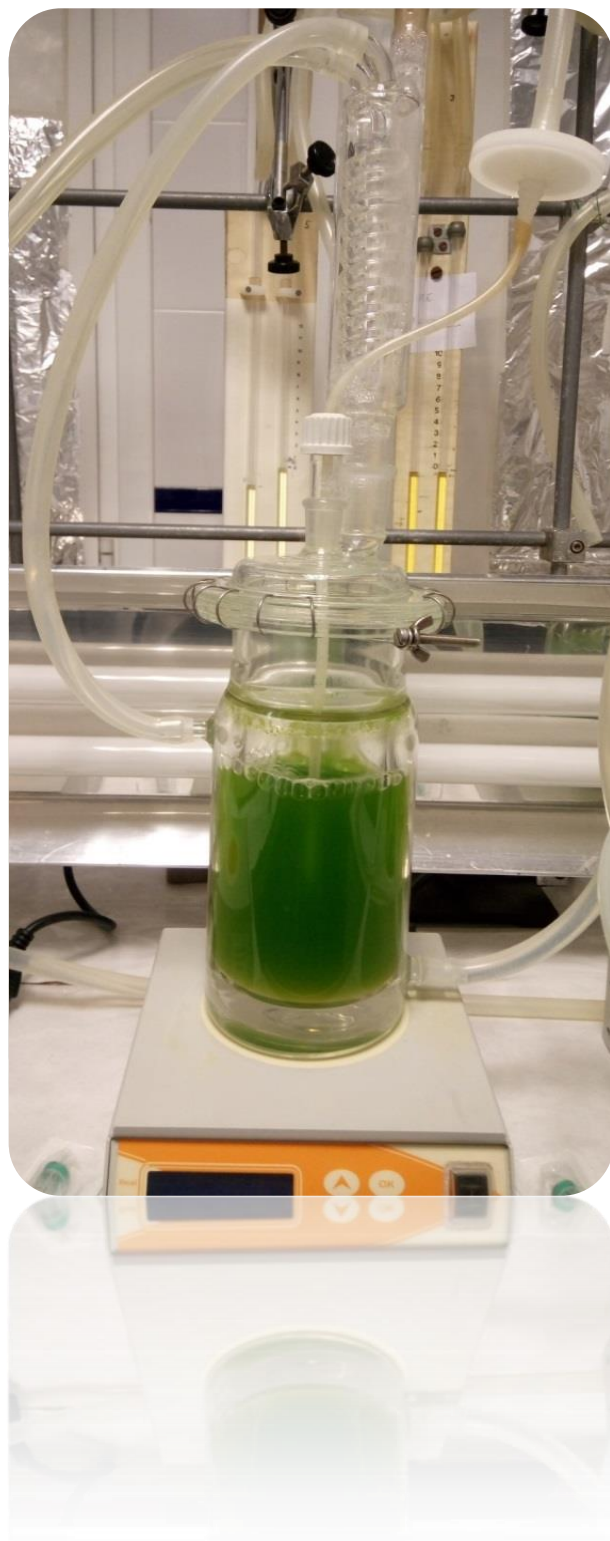


Figura 4.14 Elementos básicos del equipo Analizador elemental automático CHNS.

4.7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bradford M.M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Camacho F., Martínez M.E., Sánchez S., Delgado A. (1989). "Influence of pH on the kinetic and yield parameters of *Scenedesmus obliquus* heterotrophic growth". *Process. Biochem.* **24**, 133-136.
- Holden M. (1976). "Analytical methods-chlorophylls". En: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments* (2^a Ed.), Goodwin T.W. (Ed.), Academy Press. Nueva York, 1-37.
- Jeffrey S.W., Humphrey G.F. (1975). "New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton". *Biochem. Physiol. Pflanzen.* **167**, 191-194.
- Lepage G.C., Roy C. (1984). "Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification". *J. Lipid Res.* **25**, 1391-1396.
- Strain H.H., Svec W.A. (1966). "Extraction, separation, estimation and isolation of chlorophylls". En: *The Chlorophylls*. Veron L.P., Seely G. R. (Eds.), Academic Press, Nueva York, 21-66.
- Strickland J.D.H., Parson T.R. (1968). "A Practical Handbook of Seawater Analysis". Fisheries Research Board of Canada. Bulletin **167**, Ottawa, 311.
- Strickland J.D.H., Parson T.R. (1972). "A Practical Handbook of Seawater Analysis". Fisheries Research Board of Canada. 2^a Ed. Bulletin **167**, Ottawa, 310.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



ÍNDICE

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LAS AGUAS RESIDUALES	75
5.1.1 Aguas residuales de lavado de aceitunas	75
5.1.2 Aguas residuales de lavado de aceites en procesos con decánter de dos salidas	76
5.1.3 Aguas residuales urbanas procedentes de tratamiento biológico	77
5.2 ELECCIÓN DE LA MICROALGA	79
5.2.1 Cultivos con <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	80
5.2.1.1 Producción de biomasa	80
5.2.1.2 Composición bioquímica de la biomasa	82
5.2.2 Ensayos con <i>Scenedesmus quadricauda</i>	89
5.2.2.1 Producción de biomasa	89
5.2.2.2 Composición bioquímica de la biomasa	91
5.3 CRECIMIENTO DE <i>Chlorella pyrenoidosa</i> EN MEDIO RODRÍGUEZ-LÓPEZ	99
5.3.1 Efecto de la temperatura de operación	99
5.3.1.1 Producción de biomasa	99
5.3.1.2 Composición bioquímica de la biomasa	103
5.3.2 Influencia de la velocidad específica de suministro de aire	112
5.3.2.1 Producción de biomasa	112
5.3.2.2 Composición bioquímica de la biomasa	115
5.4 CULTIVOS DE <i>Chlorella pyrenoidosa</i> EN AGUAS RESIDUALES	123
5.4.1 Utilizando aguas residuales de lavado de aceitunas	123
5.4.1.1 Producción de biomasa	123
5.4.1.2 Composición bioquímica de la biomasa	125
5.4.2 Usando aguas residuales de lavado de aceites	133
5.4.2.1 Producción de biomasa	133
5.4.2.2 Composición bioquímica de la biomasa	135
5.4.3 Ensayos con aguas residuales de almazara y aguas residuales urbanas de tratamiento biológico	142
5.4.3.1 Producción de biomasa	142
5.4.3.2 Composición bioquímica de la biomasa	144
5.4.4 Efecto de la concentración de dióxido carbono en diferentes medios de cultivos	152
5.4.4.1 Cultivos realizados con aguas de lavado de aceitunas	152
A. Producción de biomasa	152
B. Composición bioquímica de la biomasa	154
5.4.4.2 Cultivos realizados con aguas de lavado de aceites	161
A. Producción de biomasa	161

<i>B. Composición bioquímica de la biomasa.....</i>	163
5.4.4.3 Cultivos realizados con aguas de almazaras y aguas residuales urbanas de <i>tratamiento biológico.....</i>	170
<i>A. Producción de biomasa.....</i>	170
<i>B. Composición bioquímica de la biomasa.....</i>	171
5.5 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL AGUA RESIDUAL DESPUÉS DEL BIOPROCESO...	179
5.5.1 En cultivos realizados con aguas de lavado de aceitunas.....	179
5.5.2 En ensayos llevados a cabo con aguas de lavado de aceites.....	181
5.5.3 En cultivos realizados con mezclas de aguas residuales.....	184
5.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	189

5.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LAS AGUAS RESIDUALES

El diseño de un sistema idóneo de tratamiento de estas aguas residuales requiere un conocimiento exhaustivo de la composición de las mismas. En este trabajo de investigación se ha analizado el estado actual de las aguas residuales de almazaras y aguas residuales urbanas.

Inicialmente, se trata de establecer la caracterización físico-química de los diferentes efluentes líquidos generados en almazaras que utilizan el proceso continuo de centrifugación con decánter de dos salidas. Además, se caracterizará las aguas residuales urbanas procedentes de tratamiento secundario o biológico que serán usadas conjuntamente con las de almazaras.

5.1.1 Aguas residuales de lavado de aceitunas

A los dos lotes de aguas residuales, recogidas en la almazara San Antonio (Escañuela, Jaén), y utilizadas en el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se le ha realizado una caracterización completa (Tablas 5.1 y 5.2). Estas aguas residuales fueron recogidas directamente de los equipos de lavado de aceitunas. En general, existen diferencias significativas en el agua de lavado de aceitunas, debido a la época de muestreo y a la periodicidad del cambio del agua en los equipos de lavado. Estos cambios deben llevarse a cabo de acuerdo con las cargas de suciedad en las aceitunas tratadas.

En general, como resultado de la época de muestreo, la calidad del fruto, la extensión de su contaminación y la periodicidad del cambio del agua en el equipo de lavado, todos los parámetros se vieron afectados. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por algunos grupos de investigación que indican que la composición de las aguas residuales de almazaras depende de diferentes parámetros que incluyen el tipo de cultivo, la época de recolección, el clima y el método de extracción Chatzisyneon *et al.* (2009). Las características de las aguas residuales muestran una alta variación y fluctuación en la composición (Tablas 5.1 y 5.2).

Tabla 5.1. Caracterización física de las aguas de lavado de aceitunas usadas en el medio de cultivo

Parámetro	Aguas de lavado de aceitunas	
	07/02/2017	03/01/2018
pH	7,42±0,09	7,48±0,02
Conductividad iónica (mS/cm, 25°C)	2,70±0,03	1,69±0,02
Turbidez (FTU)	1585,00±0,07	1722,00±0,04
Sólidos totales (%)	0,320±0,007	0,291±0,002
Cenizas (%)	0,234±0,005	0,259±0,001

Tabla 5.2. Caracterización química de las aguas de lavado de aceitunas utilizadas en el medio de cultivo

Parámetro (mg dm ⁻³)	Aguas de lavado de aceitunas	
	07/02/2017	03/01/2018
Oxígeno disuelto	2,65±0,02	1,50±0,02
Materia grasa (%)	0,452±0,000	0,328±0,000
Compuestos fenólicos totales	3,38±0,02	0,915±0,030
Materia orgánica volátil (%)	0,086±0,003	0,0327±0,01
DBO₅	491,00±0,06	632,00±0,05
DQO	535,00±0,05	1810,00±0,04
Nitrógeno total	3,401±0,014	12,50±0,04
Ión nitrato	0,801±0,040	1,55±0,05
Ión nitrito	1,30±0,03	0,209±0,01
Ión amonio	< 4,0±0,0	< 4,0±0,0
Ión fosfato	0,750±0,070	0,325±0,030
Ión sulfato	414,00±0,02	273,00±0,03
Ión cobre	1,91±0,01	<0,05±0,00
Ión cloruro	649,00±0,02	458,00±0,08
Ión magnesio	47,00±0,01	26,02±0,00

5.1.2 Aguas residuales de lavado de aceites en procesos con decánter de dos salidas

Se observa una gran diferencia en la composición físico-química de las aguas de lavado de aceites (Tablas 5.3 y 5.4). Además, esta composición del agua es variable en términos de la presencia de sus iones, lo que se puede explicar por la diferente composición del suelo agrícola, la variedad, el índice de madurez del fruto, el origen del agua utilizada en el lavado de los aceites, e incluso el uso del talco como coadyuvante para mejorar la extracción de aceite a partir de las pastas de aceitunas.

Por otro lado, se pueden observar los altos valores de DBO₅ (1358 mg O₂ dm⁻³) y DQO (1362 mg O₂ dm⁻³) en las aguas de lavado de aceites en comparación con los de aguas residuales urbanas, aunque las aguas de lavado de aceites tiene menos carga orgánica que la que se encuentran recogida en la literatura (DQO > 3000 mg O₂ dm⁻³). Este hecho se debe al modo de operación del molino en el que se tomaron las muestras. Esta almazara respeta los ciclos de limpieza y cambio de agua en las lavadoras de aceitunas y en la centrífuga vertical donde se obtiene las aguas de lavado de aceites. De hecho, las aguas de lavado de aceites no tienen color, ya que la almazara realiza el control completo de las operaciones durante todo el proceso para evitar la coloración estas aguas.

El posible efecto inhibitor y tóxico de las aguas residuales de almazaras, se debe principalmente a la presencia de altas concentraciones de compuestos fenólicos, materia grasa residual y otras sustancias que no proceden del olivo. Muchos de los compuestos fenólicos son inhibidores para los microorganismos, animales y vegetales. Otros componentes, pueden ser persistentes y bioacumulativos; especialmente, las formas cloradas pueden ser tóxicas para la salud humana (Davì y Gnudi, 1999). El perfil de los compuestos fenólicos en las aguas de lavado de aceites depende de varios factores: variedad, condición climática, maduración del fruto, procedimiento de extracción de la aceituna Obied *et al.* (2008).

Tabla 5.3. Caracterización física de las aguas de lavado de aceites usadas en el medio de cultivo

Parámetro	Aguas de lavado de aceites	
	13/01/2017	03/01/2018
pH	6,29±0,02	7,41±0,01
Conductividad iónica (mS/cm, 25°C)	1,32±0,06	4,33±0,04
Turbidez (FTU)	190,00±0,04	218,00±0,03
Sólidos totales (%)	0,127±0,010	0,0766±0,001
Cenizas (%)	0,0378±0,0	0,0376±0,0

Tabla 5.4. Caracterización química de las aguas de lavado de aceites utilizadas en el medio de cultivo

Parámetro (mg dm ⁻³)	Aguas de lavado de aceites	
	13/01/2017	03/01/2018
Oxígeno disuelto	2,01±0,01	2,05±0,02
Materia grasa (%)	0,337±0,001	0,778±0,002
Compuestos fenólicos totales	11,1±0,1	5,33±0,02
Materia orgánica volátil (%)	0,0892±0,006	0,0390±0,003
DBO ₅	1358,00±0,05	852,00±0,03
DQO	1362,00±0,01	1006,00±0,04
Nitrógeno total	5,40±0,02	1,36±0,06
Ión nitrato	1,95±0,02	0,625±0,03
Ión nitrito	0,387±0,001	0,166±0,006
Ión amonio	< 4,0±0,0	< 4,0±0,0
Ión fosfato	1,63±0,01	0,655±0,06
Ión sulfato	217,00±0,01	165,00±0,02
Ión cobre	1,60±0,04	1,19±0,02
Ión cloruro	172,00±0,01	62,50±0,08
Ión magnesio	62,40±0,07	46,50±0,07

5.1.3 Aguas residuales urbanas procedentes de tratamiento biológico

Las actividades humanas han contribuido a una degradación sustancial de la calidad del agua en los ecosistemas acuáticos de todo el mundo. En la actualidad, se producen grandes cantidades de aguas residuales cada año, y la emisión de aguas residuales sigue aumentando Chen *et al.* (2019). Las aguas residuales contienen una gran cantidad de materia orgánica que puede ser muy valiosa en la utilización de medios de cultivos Sun *et al.* (2016), y el problema es que su composición se modifica continuamente.

Las Tablas 5.5 y 5.6 recogen la caracterización físico-química de las aguas residuales urbanas procedentes de tratamiento biológica. En general, se ha observado una conductividad eléctrica, y unos contenidos en sólidos totales, nitrógeno total, nitritos, amonio, nitratos, fosfatos y cloruro, superior al determinado en aguas residuales de lavado de aceitunas y aguas residuales de lavado de aceites. Es Este hecho favoreció la idea de enriquecer las aguas residuales urbanas con las aguas de lavado de aceitunas y aceites, ya que es rico en nutrientes esenciales para el crecimiento de microalgas como nitrógeno y fósforo.

Tabla 5.5. Caracterización física de aguas residuales urbanas usadas en el medio de cultivo

Parámetro	Aguas residuales urbanas	
	08/05/2014	
pH	7,08±0,00	
Conductividad iónica (mS/cm, 25°C)	5,47±0,00	
Turbidez (FTU)	72,00±0,02	
Sólidos totales (%)	0,131±0,000	
Cenizas (%)	0,113±0,001	

Tabla 5.6. Caracterización química aguas residuales urbanas utilizadas en el medio de cultivo

Parámetro (mg dm ⁻³)	Aguas residuales urbanas
Oxígeno disuelto	3,70±0,04
Materia grasa (%)	0,0780±0,000
Compuestos fenólicos totales	0,07 < 0,1±0,00
Materia orgánica volátil (%)	0,018±0,00
DBO₅	132,00±0,03
DQO	252,00±0,004
Nitrógeno total	265,00±0,03
Ión nitrato	34,50±0,02
Ión nitrito	31,70±0,05
Ión amonio	205,00±0,02
Ión fosfato	17,10±0,03
Ión sulfato	162,00±0,04
Ión cobre	< 0,05±0,00
Ión cloruro	1200,00±0,04
Ión magnesio	14,80±0,01

Generalmente, en la producción de biomasa con características deseables, la composición del medio de cultivo es un factor fundamental. La relación entre la concentración de nutrientes y la composición de la biomasa es bien conocida, Becker (1994). Por otro lado, el medio de cultivo tiene un efecto sobre la tasa de crecimiento específica y el nivel máximo de producción de biomasa. La deficiencia de un nutriente esencial en el medio de cultivo conlleva la adaptación del metabolismo de las microalgas en respuesta a nuevas condiciones externas. En general, los cambios en el medio de cultivo dan como resultado la variación de la composición bioquímica de la biomasa, fundamentalmente proteínas, lípidos, carbohidratos y pigmentos. Además, diversos parámetros físicos y químicos pueden afectar el crecimiento de algas, incluida la radiación de luz, la temperatura, el CO₂, el pH, la agitación, la aireación y la salinidad.

5.2 ELECCIÓN DE LA MICROALGA

Para llevar a cabo el proceso, lo primero que hay que elegir es el tipo de microalga que se va a utilizar para la obtención de biomasa, en este caso se selecciona la microalga que debe tener las características adecuadas para unas condiciones de cultivo específicas y que permitan obtener los productos particulares requeridos.

En general, las principales características deseables son un crecimiento rápido, un alto contenido de productos de alto valor añadido, células de tamaño grande, un desarrollo en ambientes extremos con gran tolerancia a condiciones ambientales y tolerancia a niveles altos de CO₂ (14% o superior), además no deben excretar compuestos con carácter inhibitorio.

Esta selección se ha realizada entre dos microalgas, *Chlorella pyrenoidosa* y *Scenedesmus quadricauda*, bien conocidas por el Grupo de Investigación Bioprocesos donde se ubica el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Para ambas algas unicelulares se utilizó el mismo medio nutriente (utilizando las aguas residuales anteriormente descritas), concentración de inóculo, iluminación, pH de cultivo y temperatura de trabajo. La cuantificación del crecimiento celular se ha llevado a cabo mediante dos parámetros cinéticos:

1- Velocidad específica máxima de crecimiento, μ_m (h⁻¹).

2- Productividad en biomasa, P_b (g dm⁻³h⁻¹).

A partir de los resultados experimentales se ha calculado la concentración de biomasa y los valores del logaritmo neperiano, $\ln(x/x_0)$, datos que se han utilizado para su representación gráfica frente al tiempo en todos los cultivos.

Esta de representación de las curvas de crecimiento permite identificar la fase exponencial. La velocidad específica máxima de crecimiento en la fase exponencial se ha calculado mediante ajuste por mínimos cuadrados la ecuación [5.1]:

$$\ln(x/x_0) = \mu_m t + a \quad [5.1]$$

La identificación de la fase lineal se ha realizado a partir de la representación en coordenadas lineales de los valores de concentración en biomasa x (g dm⁻³) frente al tiempo, t (h). Esta fase de desaceleración del crecimiento se encuentra inmediatamente después de la exponencial en la curva de crecimiento. El ajuste de x frente a t se ha realizado a través de la ecuación [5.2].

$$x = P_b t + b \quad [5.2]$$

Tal como se ha descrito en la parte experimental, para llevar a cabo esta selección de microalgas, se organizaron experimentos usando un Agitador orbital, y unas condiciones experimentales de 25°C, un fotoperiodo luz-oscuridad de 12:12 h, una intensidad de iluminación de 298 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pH = 8,0, concentración inicial de inóculo 10 % y una velocidad de agitación de 150 rpm.

Para la determinación de la composición de la biomasa y sus variaciones durante de los cultivos, se han calculado los valores de las concentraciones en biomasa, x (g dm⁻³), número de células, N (cel dm⁻³), clorofilas totales, CHL (g dm⁻³), carotenoides totales, Ca (g dm⁻³), proteínas, P (g dm⁻³), y contenido total en lípidos, L (%). Además, se ha determinado el perfil en ácidos grasos de la fracción lipídica de la biomasa y la composición elemental de la biomasa (%), según los procedimientos indicados en el apartado 4 de este trabajo.

A partir de los valores obtenidos, se han calculado durante el transcurso del cultivo los porcentajes de clorofilas totales y carotenoides totales referidos a la biomasa seca, % CHL y % Ca, respectivamente. Asimismo, se han evaluado la cantidad de clorofilas y carotenoides por célula, CHL/ N y Ca/ N ,

respectivamente y la relación entre las concentraciones de clorofila 'a' y 'b', CHL_a/CHL_b . Los contenidos de clorofila total (CHL) y carotenoides (Ca) de las células, expresándose en porcentaje sobre biomasa seca. Estos parámetros se han calculado de acuerdo con las ecuaciones [5.3] y [5.4].

$$\%CHL = ([CHL]/[x]) 100 \quad [5.3]$$

$$\%Ca = ([Ca]/[x]) 100 \quad [5.4]$$

A partir de los valores experimentales de la concentración de proteínas, número de células y concentración en biomasa, se han calculado el porcentaje en proteínas referido a la biomasa seca, % P, de acuerdo con la ecuación [5.5], y el contenido de proteínas por célula, P/N.

$$\%P = ([P]/[x]) 100 \quad [5.5]$$

5.2.1 Cultivos con *Chlorella pyrenoidosa*

Es un alga unicelular de la división 'Chlorophyta'. Tiene forma esférica, midiendo de 2 a 10 μm de diámetro, y no posee flagelo, Figura 5.1. A través de la fotosíntesis se multiplica rápidamente, requiriendo dióxido de carbono, agua, luz solar y sales minerales.

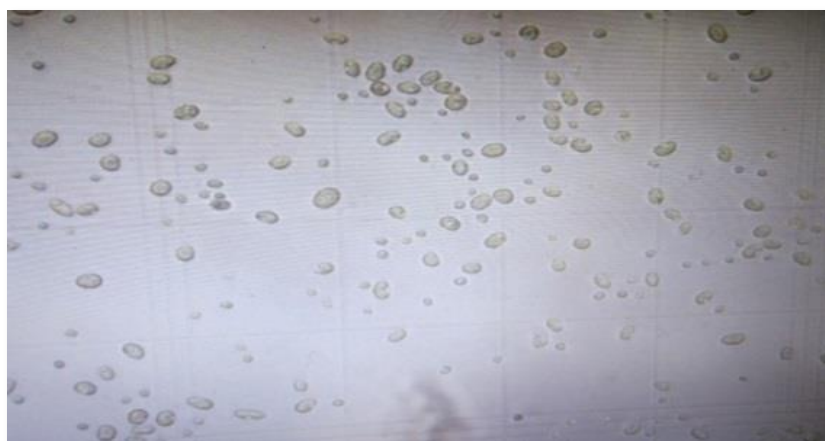


Figura 5.1 Microfotografía realizada de microscopio óptico de *C. pyrenoidosa*.

5.2.1.1 Producción de biomasa

El primer experimento fue realizado con 50% del agua de lavado de aceitunas (1 ChSF) y 30% de agua de lavado de aceites (2 ChSA). Generalmente, en todos los experimentos, las curvas de crecimiento no mostraron fase de adaptación. Por ello, la primera fase observada fue de crecimiento exponencial seguido de una fase de desaceleración del crecimiento, donde la concentración de biomasa aumentó con el tiempo en forma lineal. En todos los experimentos, se detectó la fase estacionaria, e incluso el inicio de la muerte celular. Curvas de crecimiento similares fueron reportadas en trabajos anteriores Hodaifa *et al.* (2009). Al final del experimento, en el medio de cultivo formado con agua de lavado de aceites, la concentración de biomasa alcanzada fue $1,16 \text{ g dm}^{-3}$, mientras que en el medio de cultivo con agua de lavado de frutos fue de $0,559 \text{ g dm}^{-3}$ (Tablas B.1 y B.4), bastante inferior. Este hecho se justifica considerando que el agua de lavado de aceites tiene mayor concentración de nutrientes esenciales que las algas necesitan, que las aguas de lavado de frutos. Tal como se ha descrito anteriormente, las curvas de crecimiento permiten

calcular la velocidad específica máxima de crecimiento en la fase exponencial y la productividad volumétrica en biomasa en la fase de desaceleración (Figuras 5.2 y 5.3).

El conocimiento de la cinética de crecimiento y la producción de metabolitos es fundamental para saber el crecimiento celular y ha evaluado con el cálculo de la velocidad específica máxima de crecimiento, y la productividad en biomasa (Tabla 5.7).

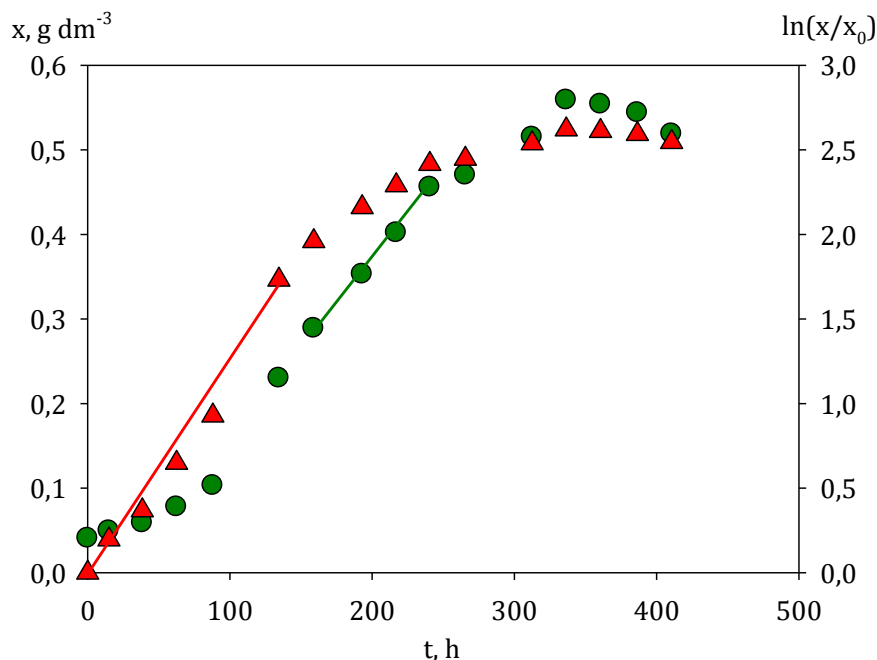


Figura 5.2 Variación de la concentración de biomasa (●) con el tiempo de proceso, y curva de crecimiento de *C. pyrenoidosa* (▲), en el Exp. 1 ChSF.

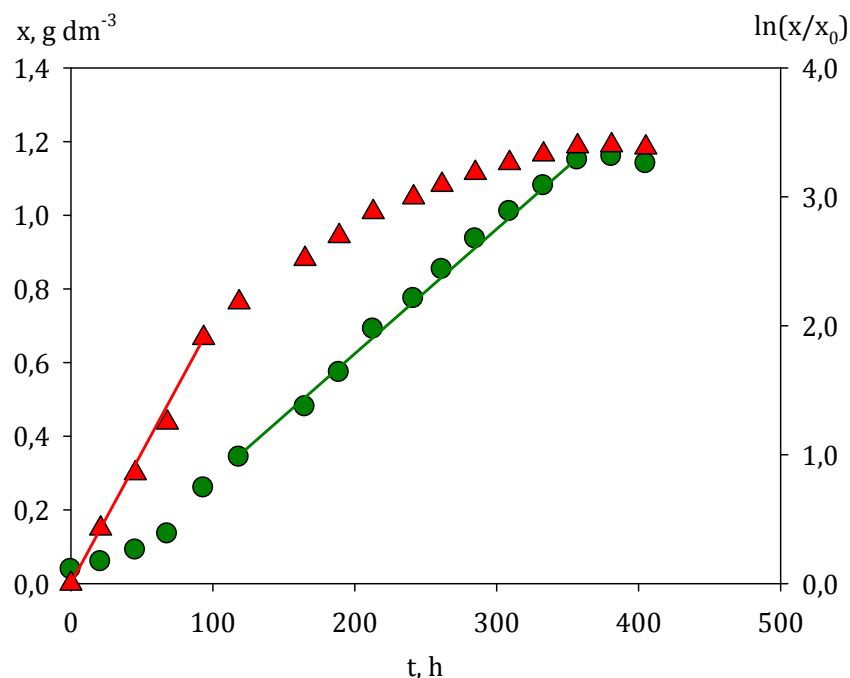


Figura 5.3 Variación de la concentración de biomasa (●) con el tiempo de proceso, y curva de crecimiento de *C. pyrenoidosa* (▲), en el Exp. 2 ChSA.

Los resultados obtenidos de μ_m y P_b son inferiores a los determinados por Lívanský y Doucha (2012) en cultivo mixotrófico con *Chlorella vulgaris* en un medio mineral sintético y con D-glucosa como sustrato orgánico (78 g dm⁻³); estos autores no determinan una velocidad específica de máxima crecimiento; sin embargo, indican una velocidad media de crecimiento de 0,07 h⁻¹, utilizando fotobiorreactores de 50 a 600

dm³. En relación a la productividad media en biomasa determinan un valor de 1,22 g dm⁻³ h⁻¹ a las 66,5 h de cultivo; además indican un rendimiento celular de 0,539 kg de alga seca por kg de D-glucosa.

Por otra parte, Guldhe *et al.* (2017) muestran el tratamiento de aguas residuales urbanas con *Chlorella sorokiniana*, en el cual realizan tanto cultivos autotróficos como heterotróficos tratando de realizar una comparación. Estos autores concluyen que con el cultivo heterotrófico se alcanza una concentración de biomasa tres veces superior en relación al autotrófico para unas mismas condiciones de pH y temperatura. Destaca también el potencial uso del agua residual como nutriente para el crecimiento heterotrófico con microalgas, pero recomienda el uso de suplementación durante el cultivo, para lograr mejorar la densidad de alga seca final, mejorando también así los contenidos en lípidos, hidratos de carbono y proteínas. Las concentraciones finales de biomasa son muy bajas en comparación con los resultados obtenidos por otros grupos de investigación (Lívanský y Doucha, 2012; Jeon *et al.*, 2014).

Tabla 5.7. Velocidades específicas máximas de crecimiento y productividades de biomasa, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas (1 ChSF) y aguas de lavado de aceites (2 ChSA)

Expt	μ_m (h ⁻¹)	r ²	$P_b 10^3$ (g dm ⁻³ h ⁻¹)	r ²
1 ChSF	0,0126	0,988	2,20	0,998
2 ChSA	0,0198	0,994	3,50	0,997

En general, las algas difieren en su respuesta al crecimiento en función del medio de cultivo. El medio utilizado en este trabajo era pobre en nitrógeno y este hecho ha podido limitar el crecimiento de *C. pyrenoidosa*. Este hecho ha sido confirmado por Abhishek *et al.* (2017) que determinaron en el cultivo heterotrófico de *C. sorokiniana* rendimientos en biomasa de 2,47 g dm⁻³ usando como medio nutriente aguas residuales de una instalación de acuicultura en Durban (Sudáfrica), y 4,02 g dm⁻³ utilizando un medio sintético (concretamente el medio BG11). El mayor rendimiento en biomasa empleando el medio sintético (BG11) se debe a la mayor concentración de nutrientes en comparación con el de las aguas residuales de la industria de acuicultura.

5.2.1.2 Composición bioquímica de la biomasa

a) Pigmentos

En general, el porcentaje de clorofilas totales, CHL %, y el contenido de clorofilas totales por célula, CHL/N, aumentan de forma rápida en el comienzo del cultivo y posteriormente disminuyen de forma lenta en el transcurso de cada experimento, Figuras 5.4 y 5.5. Esta tendencia ha sido más acusada durante la fase exponencial y en los cultivos con aguas de lavado de aceitunas; este hecho es similar al observado por Hodaifa *et al.* (2010a) usando el mismo tipo de agua residual pero con *S. obliquus*. Por otra parte, el máximo porcentaje de clorofilas totales, 1,1%, y el mínimo, 0,01%, están dentro del intervalo de 0,01–6%, proporcionado por Milner (1953) para *C. pyrenoidosa*.

En este punto cabe indicar que las aguas de lavado de aceitunas usadas como medio nutriente son pobres en nitrógeno, y es conocido que la respuesta típica de las células a la limitación de nitrógeno pudo inducir un menor contenido de clorofilas, lo que determina una desaceleración global de las células (Becker, 1994) que es consistente con la observada experimentalmente en este trabajo.

Generalmente, la producción de clorofilas se inició durante la fase exponencial y disminuyó en la fase de desaceleración del crecimiento. Este hecho fue observado cuando se usan ambos tipos de aguas residuales como medio nutriente.

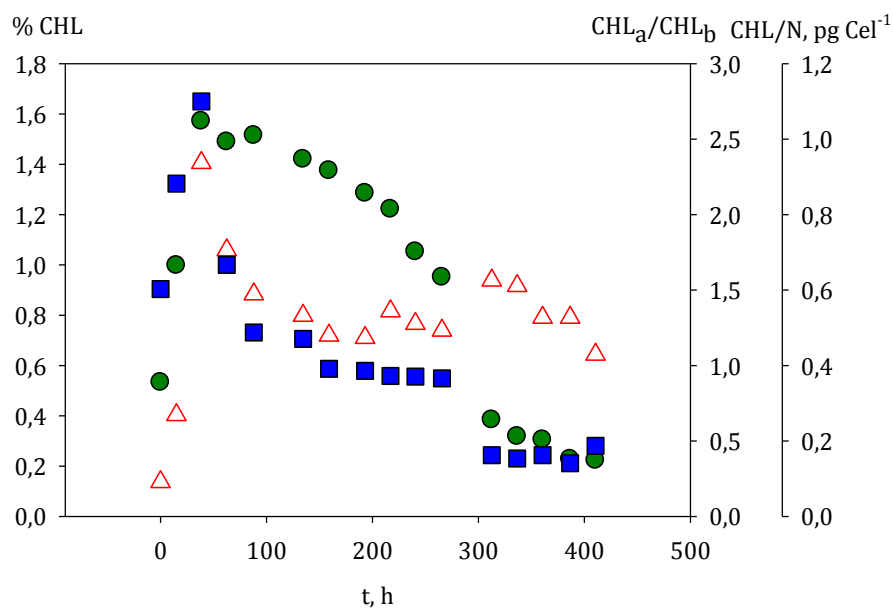


Figura 5.4 Porcentaje de clorofilas totales (●), relación entre los contenidos de clorofilas 'a' y 'b' (Δ), y contenido de clorofilas totales por célula (■) con el tiempo de proceso, en el Exp. 1 ChSF.

Por otro lado, se determinó que los contenidos de clorofila 'a' son más elevados que los de clorofila 'b' cuando se usan ambos tipos de aguas residuales como medio nutriente. Sin embargo, la relación CHL_a/CHL_b , fue más alta y rápida en los cultivos con agua de lavado de aceitunas que con aguas de lavado de aceites.

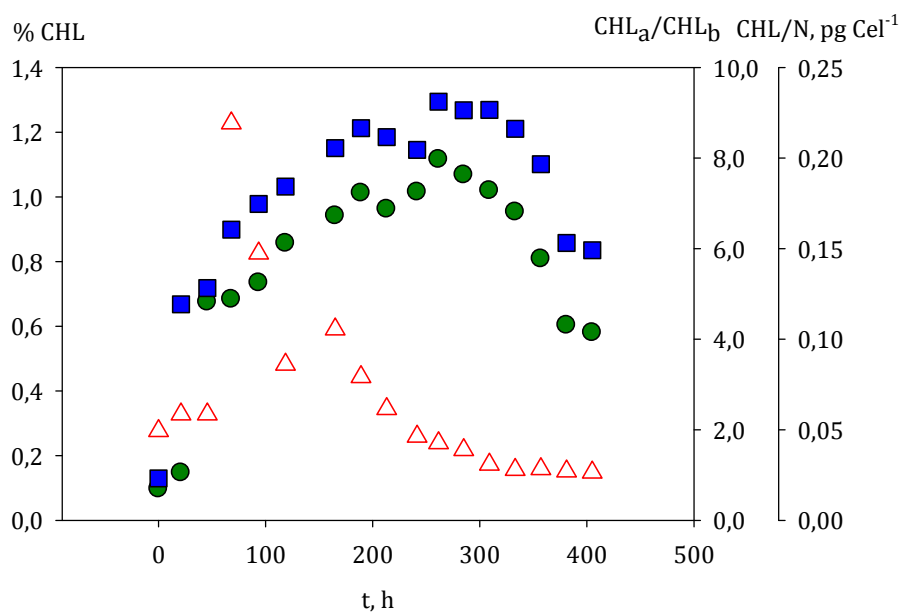


Figura 5.5 Porcentaje de clorofilas totales (●), relación entre los contenidos de clorofilas 'a' y 'b' (Δ), y contenido de clorofilas totales por célula (■) con el tiempo de proceso, en el Exp. 2 ChSA.

En relación a los carotenoides totales, se observó que los parámetros %Ca, CHL/Ca y Ca/N , al comienzo del cultivo, aumentaron rápidamente y luego disminuían lentamente durante el transcurso de cada experimento, Figuras 5.6 y 5.7.

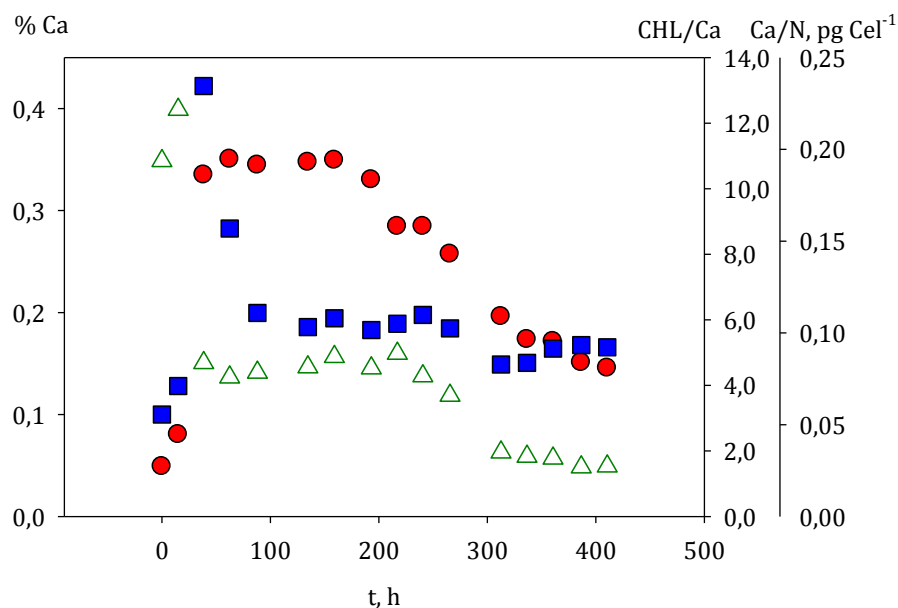


Figura 5.6 Porcentaje de carotenoides totales (●), relación entre los contenidos de clorofilas y carotenoides totales (△), y contenido de carotenoides totales por célula (■) con el tiempo de proceso, en el Exp. 1 ChSF.

Por otra parte se ha detectado que la relación, CHL/Ca, en los cultivos fue diferente en función del agua usada como medio nutriente. En los cultivos con agua de lavado de aceitunas la relación fue más alta en la fase exponencial y disminuyó en la misma fase, permaneciendo prácticamente constante en la fase de desaceleración del crecimiento.

Los resultados observados para *C. pyrenoidosa* en aguas de lavado de aceitunas y en la fase de desaceleración, $\text{CHL/Ca} \approx 4,0$ (Figura 5.7), son muy próximos a los obtenidos con el alga *Botryococcus braunii* creciendo en un medio constituido por agua residual urbana procedente de tratamiento secundario, Órpez (2015). Sin embargo, esta relación CHL/Ca es menor (próxima a 3 en la misma fase de crecimiento) cuando se usa aguas de lavado de aceites como medio nutriente de *C. pyrenoidosa*.

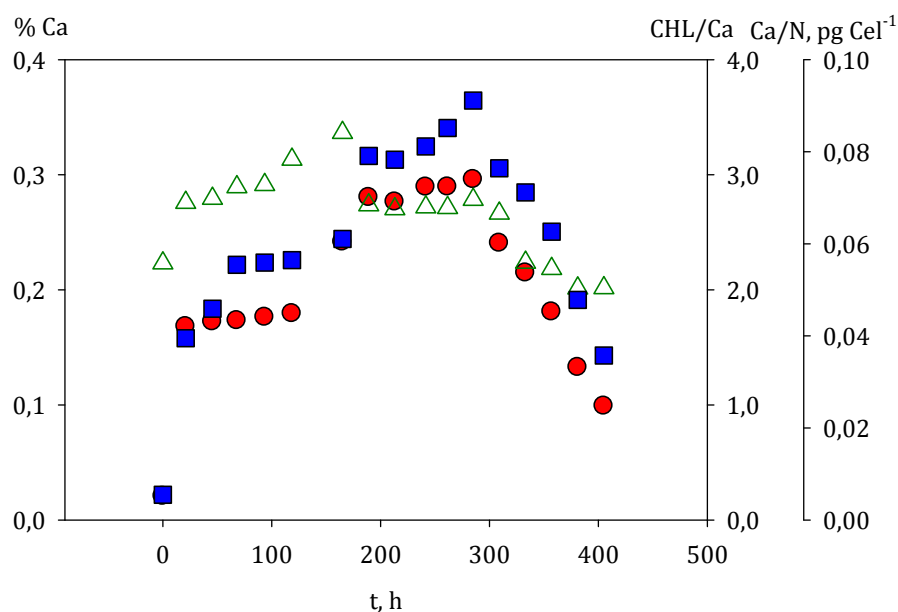


Figura 5.7 Porcentaje de carotenoides totales (●), relación entre los contenidos de clorofilas y carotenoides totales (△), y contenido de carotenoides totales por célula (■) con el tiempo de proceso, en el Exp. 2 ChSA.

b) Proteínas

Generalmente, se ha observado que el porcentaje de proteínas, %P, disminuye durante el transcurso del cultivo en cada experimento. En relación con el contenido de proteínas por célula, se detecta también una disminución de este parámetro en el transcurso del cultivo hasta el final de la fase desaceleración y luego permanece prácticamente constante, Figuras 5.8 y 5.9. Este hecho es similar al obtenido por Hodaifa *et al.* (2010a) operando con *S. obliquus*.

Al final de los cultivos, los porcentajes en proteínas obtenidos son inferiores al 10 %, Figuras 5.8 y 5.9. En este punto cabe indicar que la síntesis de proteínas está relacionada con el contenido de N del medio de cultivo. Por lo tanto, los bajos valores de proteínas al final del experimento se pueden justificar considerando la pequeña concentración de N de los medios de cultivo. En este sentido, la bibliografía indica que en medios con concentraciones elevadas de compuestos de nitrógeno los porcentajes de *C. pyrenoidosa* y *S. obliquus* pueden alcanzar valores de 57 y 56%, respectivamente, Becker (1994). También cabe destacar que los valores obtenidos en esta experimentación al inicio del cultivo, donde la concentración de nitrógeno es significativa, está en el rango de 55-60%, valores que son concordantes con los aportados por Becker (1994).

Con respecto a otras algas, y al final del cultivo, los porcentajes en proteínas obtenidos son muy bajos. En este sentido en algas del género *Spirulina* el %P puede oscilar en el rango 46-63%, Becker (1994); incluso son más bajo que los reportados para microalgas marinas, como *Tetraselmis maculata* (52%), *Dunaliella salina* (57%) o *Dunaliella tertiolecta* (30-70%), Fábregas *et al.* (1995).

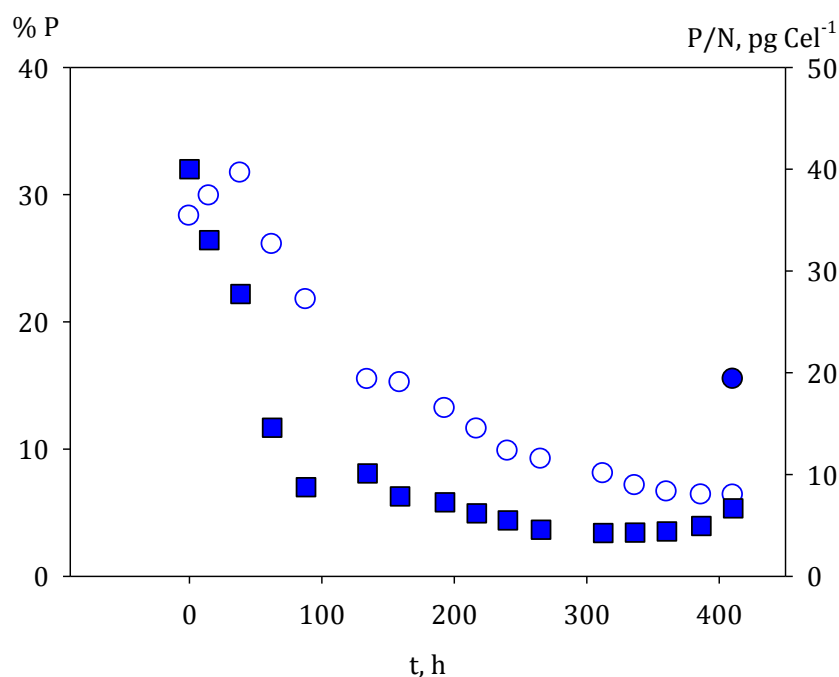


Figura 5.8 Variación del porcentaje de proteínas (○), contenido de proteínas por célula (■), y proteína cruda (●) con el tiempo de proceso, en el Exp. 1 ChSF.

Se observa que hubo un aumento significativo en el número de células y una disminución en el contenido en proteínas que conduce a una disminución en la relación (P/N) y esto coincide con observado por Martin *et al.* (2010). Esto indica que las algas comenzaron a consumir nitrógeno del medio para convertirlo en compuestos energéticos, y por lo tanto su concentración se reduciría en el medio.

Wu y Miao (2014) han destacado que el nitrógeno es un nutriente esencial en muchas macromoléculas como las proteínas, clorofilas, ARN y ADN. Los compuestos de nitrógeno actúan como nutrientes

esenciales para el crecimiento de las microalgas. La limitación por nitrógeno, o la ausencia de fuente N, normalmente conduce a una disminución de la fotosíntesis, la síntesis de proteínas y a un aumento de la síntesis de lípidos y carbohidratos Simionato *et al.* (2013).

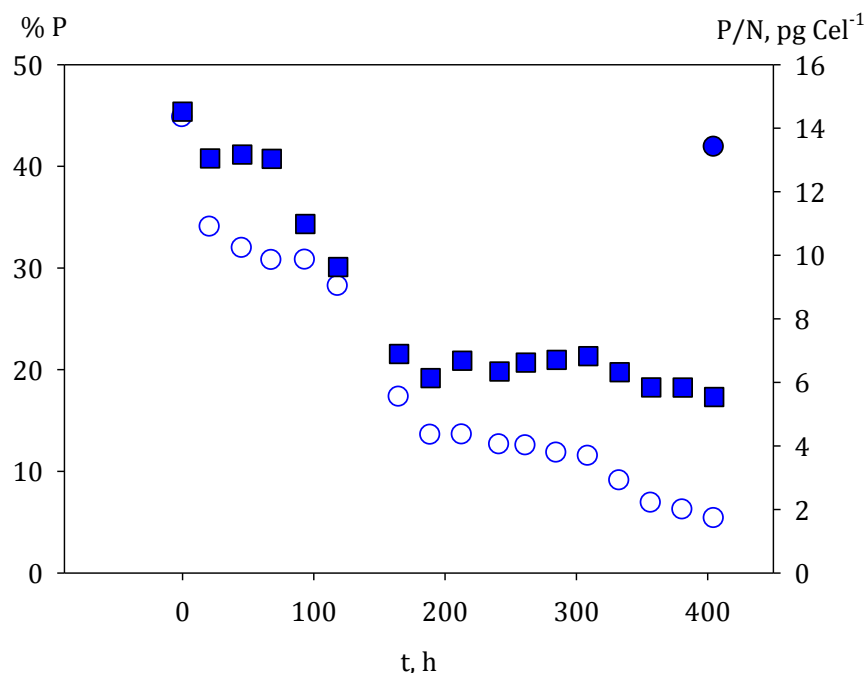


Figura 5.9 Variación del porcentaje de proteínas (○), contenido de proteínas por célula (■), y proteína cruda (●) con el tiempo de proceso, en el Exp. 2 ChSA.

c) Lípidos totales y ácidos grasos

Tal como se ha indicado anteriormente, el medio de cultivo utilizado contenía poca concentración de fuente de nitrógeno, lo que provoca estrés en las microalgas y, por lo tanto, el porcentaje de lípidos totales fue alto.

Al final de los experimentos, la biomasa fue recolectada y se determinó el contenido de lípidos. En términos de contenido total de lípidos, la biomasa de *C. pyrenoidosa* alcanzó un 47,2% en cultivo con aguas de lavado de aceitunas y 50,6% con aguas de lavado de aceites, Figura 5.10. Estos resultados son similares a los obtenidos con *S. obliquus* cuando se cultivó en un medio bajo en nitrógeno, Hodaifa *et al.* (2012). Estos altos porcentajes de lípidos obtenidos en esta experimentación están dentro del rango indicado por Gouveia y Oliveira (2009) para esta microalga cuando se cultiva en un medio con bajo contenido de nitrógeno.

La forma en la que está presente el nitrógeno en el medio del cultivo puede afectar al crecimiento del alga, y a la composición bioquímica de la biomasa. Los efectos del ion nitrato frente al ion amonio como fuente de nitrógeno se evaluaron para tratar de cuantificar su influencia en el crecimiento y en la producción de lípidos. La bibliografía indica que la formación de biomasa se ve favorecida cuando se utiliza como fuente de nitrógeno ion amonio en comparación con el ion nitrato Thomas *et al.* (2019).

La acumulación de compuestos energéticos, tales como los lípidos, puede tener lugar en muchas especies de microalgas en condiciones de limitación de nitrógeno, Li *et al.* (2008a), y limitación de fosfato, Reitan *et al.* (1994).

Se han propuesto muchas estrategias basadas en el estrés para aumentar el contenido de lípidos, como la limitación nutricional por nitrato y fosfato Fan *et al.* (2014). Curiosamente, se encuentra que un aumento en el contenido de lípidos intracelulares suele ir acompañado de un aumento en la acumulación

de especies reactivas de oxígeno en las células de microalgas que sufren este estrés (Arakaki *et al.* 2017; Yu *et al.* 2018). También la intensidad de iluminación puede modificar el contenido en lípidos en la biomasa microalgal, Rodolfi *et al.* (2009).

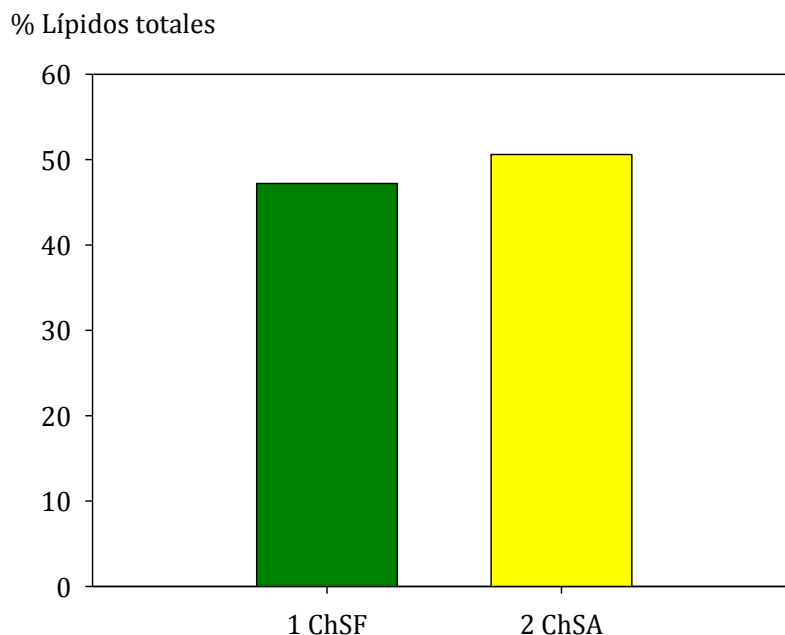


Figura 5.10 Contenido de lípidos totales al final de cada experimento, con *S. quadricauda* en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas (1 ChSF ■), y aguas de lavado de aceites (2 ChSA ■).

El perfil de ácidos grasos de la fracción lipídica de la biomasa se determinó al final del experimento en todos los cultivos, expresándose como porcentaje respecto al total de ácidos grasos. Los ácidos grasos se agruparon en ácidos grasos saturados (SAT), ácidos grasos monoinsaturados (MON), ácidos grasos poliinsaturados (POL), ácidos grasos esenciales (ESE) y ácidos grasos superiores poliinsaturados (AGSP).

En general, en ambos experimentos el ácido graso más abundante fue el ácido oleico (18:1), con 28,3% en el medio con aguas de lavado de aceitunas y 26,9% con las aguas de lavado de aceites. El mayor porcentaje se registró en la fracción de POL (%), siendo el valor medio más alto detectado de ácidos grasos poliinsaturados 35,8%, obtenido en el cultivo con aguas de lavado de aceites, Tabla 5.8. No obstante, los valores de la fracción de MON que se obtienen en los cultivos son muy próximos a los observados para la fracción de POL. Los principales POL identificados fueron: 18:2n3, 18:2n6, 18:3n3, 18:4n3, 20:2n6, 20:5n3 y 22:5n3, Tablas B3 y B6 (Anexo B).

Los componentes del medio del cultivo y condiciones experimentales tienen un impacto importante y esencial en la formación de los ácidos grasos. Tal como se ha indicado anteriormente, el medio de cultivo utilizado contenía poca concentración de compuestos de fósforos, y nitrógeno lo que afecta al contenido de ácidos grasos. Se ha observado porcentajes altos de ácidos linoleico 18:2n6 y linolénico 18:3n3 en los cultivos. Este hecho coincide con lo indicado por Boersma (2000); este autor señala porcentajes altos de ácido linoleico, 18:2n6, y linolénico, 18:3n3, cuando se cultivó en un medio bajo en P y usando *S. obliquus*, pero no se encontraron los ácidos graso eicosapentaenoico (20:5n3, EPA) o docosahexanoico (22:6n3, DHA). Por lo tanto, la concentración de N en el medio afectó a la proporción entre ácidos grasos saturados e insaturados; este hecho es similar al observado por Ben-Amotz *et al.* (1985), cuando utilizó medios deficientes en N para *Dunaliella bardawil* y *Dunaliella salina*.

Tabla 5.8. Composición en ácidos grasos de la fracción lipídica de *C. pyrenoidosa*. Influencia de la composición del medio de cultivo, en experimentos con aguas de lavado de aceitunas (1ChSF) y aguas de lavado de aceites (2ChSA)

Fracciones de ácidos grasos, %	SAT	MON	POL	ESE	AGSP	n3/n6
1 ChSF	28,2	32,8	33,0	28,9	0,862	1,29
2 ChSA	25,9	31,6	35,8	30,6	0,897	0,83

En relación a la fracción ESE, cabe destacar que en los cultivos con aguas de lavado de aceitunas se ha determinado un valor de 28,9% y con aguas de lavado de aceites 30,6%. Por otra parte, el porcentaje de ácidos grasos AGSP fue próxima en ambos cultivos y con valores bajos, 0,862 y 0,897%, respectivamente. Los porcentajes de ácidos grasos esenciales y poliinsaturados obtenidos con *C. pyrenoidosa* son menores que los identificados con *S. obliquus*. Estos resultados son similares a los obtenidos por Sánchez *et al.* (2001), donde se observa que las fracciones de ácidos grasos poliinsaturados y esenciales obtenidos al utilizar la microalga *C. pyrenoidosa* son inferiores a los determinados al emplear *S. obliquus* en los mismos medios de cultivos (disoluciones de alpechín).

El valor de la relación n3/n6 fue 1,3 en el cultivo con agua de lavado de aceitunas, y 0,8 en el cultivo con agua de lavado de aceites. En estos casos este valor no está en el rango donde se considera que la biomasa tiene cierto valor nutricional. En este sentido, la bibliografía indica que la biomasa producida en el cultivo puede tener una aceptable calidad nutricional si la relación n3/n6 está en el rango 2-5, Webb y Chu (1982).

d) Composición elemental de la biomasa

Inicialmente, cabe indicar que no se registraron diferencias significativas en la composición elemental de la biomasa recolectada en ambos tipos de cultivos. Tablas B.2 y B.5 (Anexo B). El porcentaje más alto en la biomasa de *C. pyrenoidosa* correspondió al 'C' en ambos tipos de aguas, usadas como medios nutrientes, mientras que el 'S' fue el menor contenido, Figura 5.11. Por otro lado, hubo una diferencia en el contenido de nitrógeno, esto puede ser debido a la diferencia en la composición del medio del cultivo. Este hecho ha conducido a que la relación entre carbono y nitrógeno C/N, fuese 18,4 usando aguas de lavado de aceitunas, y 7,2 con aguas de lavado de aceites. Beuckels *et al.* (2015) observaron que *Chlorella* y *Scenedesmus* pueden ajustar la concentración interna de N y P en la biomasa de acuerdo con la concentración de N y P en el medio de aguas residuales. En este sentido, Khalid *et al.* (2019) demostraron la capacidad de *Chlorella. sorokiniana* para cambiar su composición elemental interna en función de la concentración de nutrientes en el medio de cultivo.

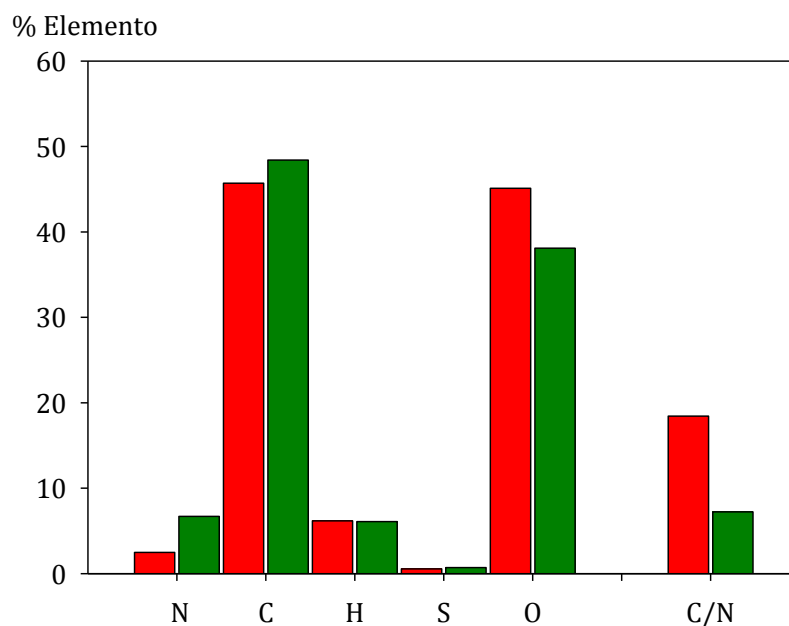


Figura 5.11 Composición elemental de la biomasa de *C. pyrenoidosa* determinada al final de los cultivos, con aguas de lavado de aceitunas (■ 1 ChSF) y aguas de lavado de aceites (■ 2 ChSA).

5.2.2 Ensayos con *Scenedesmus quadricauda*

Scenedesmus es uno de los géneros de algas de agua dulce más comunes; sin embargo, las morfologías extremadamente diversas encontradas dentro de las especies dificultan la identificación. *Scenedesmus* puede existir como unicelular; también se encuentran con frecuencia en el cenobio de cuatro u ocho células, Figura 5.12. *S. quadricauda* tiene una velocidad de crecimiento rápida y es rica en productos de alto valor que son esenciales.

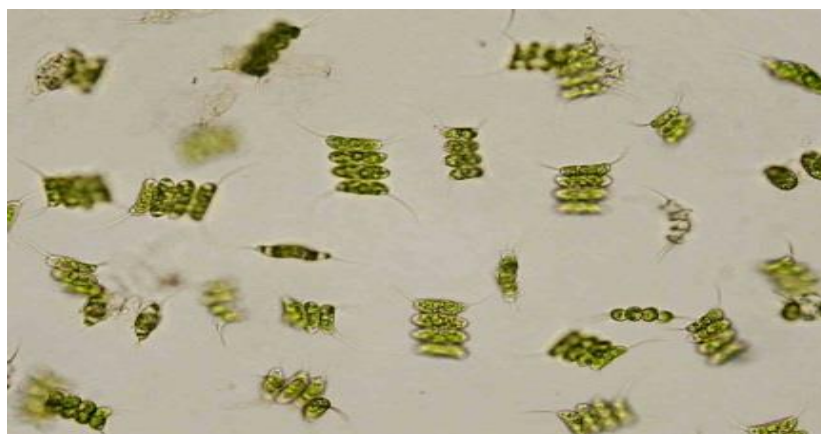


Figura 5.12 Microfotografía realizada de microscopio óptico de *S. quadricauda*.

5.2.2.1 Producción de biomasa

Se llevaron a cabo cultivos para estudiar *Scenedesmus quadricauda* en las mismas condiciones experimentales que fueron utilizadas con *C. pyrenoidosa*. El primer experimento fue usado con 50% del agua de lavado de aceitunas (1 ScSF) y el segundo con 30% agua de lavado de aceites (2 ScSA).

La concentración más alta de biomasa se alcanzó en el medio de cultivo formado con agua de lavado de aceitunas, 0,598 g dm⁻³, mientras que la concentración de biomasa alcanzada con agua de lavado de aceites fue 0,578 g dm⁻³, Tablas B.7 y B.10, (Anexo B). Se observa que la diferencia no es significativa. A este respecto, debe tenerse en cuenta que el contenido de nutrientes en ambos medios no ha sido

suficiente para alcanzar una alta concentración de biomasa. Esto indica que el contenido de nutrientes en la concentración del 50% del agua de lavado de aceitunas puede ser equivalente a aproximadamente el 30% del agua de lavado de aceites.

En todos los experimentos, las curvas de crecimiento no mostraron fase de adaptación. Por lo tanto, la primera fase observada fue un crecimiento exponencial seguido de una desaceleración en el crecimiento, con el aumento de la concentración de biomasa con el tiempo en forma lineal. En la siguiente etapa se detectó la fase estacionaria y luego el comienzo de la muerte celular. Las curvas de crecimiento permiten calcular la velocidad específica máxima en la fase exponencial y la productividad volumétrica en biomasa en la fase de desaceleración (Figuras 5.13 y 5.14). Curvas de crecimiento similares fueron reportadas en trabajos anteriores Hodaifa *et al.* (2013); en este caso los experimentos se realizaron con *S. obliquus*, usando un fotobiorreactor discontinuo tanque agitado y el medio de cultivo estaba constituido por aguas de lavado de aceitunas, aguas de lavado de aceites, aguas de vegetación, además de aguas de otras actividades de limpieza en la almazara y aguas residuales urbanas de tratamiento secundario. El conocimiento de la cinética de crecimiento y la producción de metabolitos es fundamental para saber el crecimiento celular y evaluar el cálculo de la velocidad específica máxima, y la productividad en biomasa (Tabla 5.9).

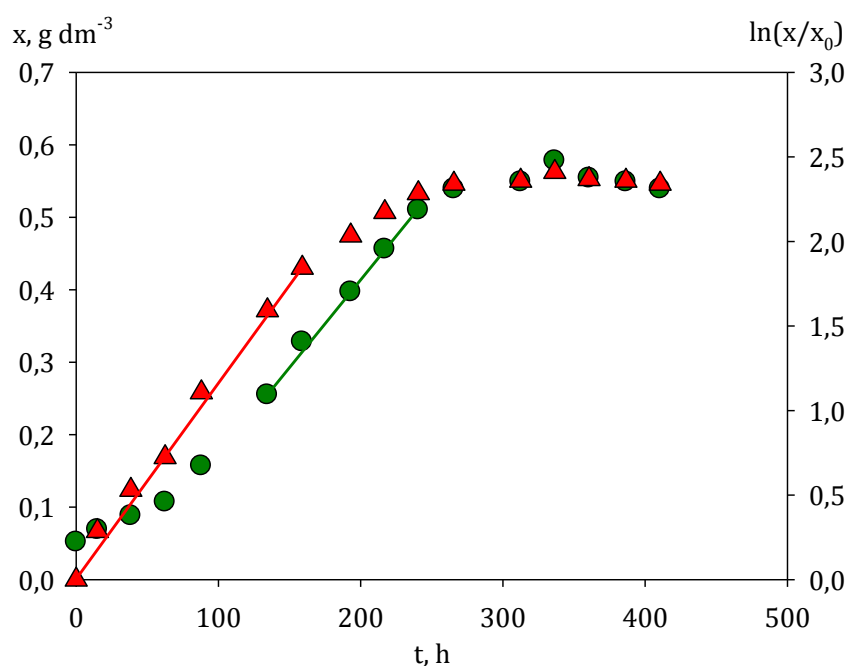


Figura 5.13 Variación de la concentración de biomasa (●) con el tiempo de proceso, y curva de crecimiento de *S. quadricauda* (▲), en el Exp. 1 ScSF.

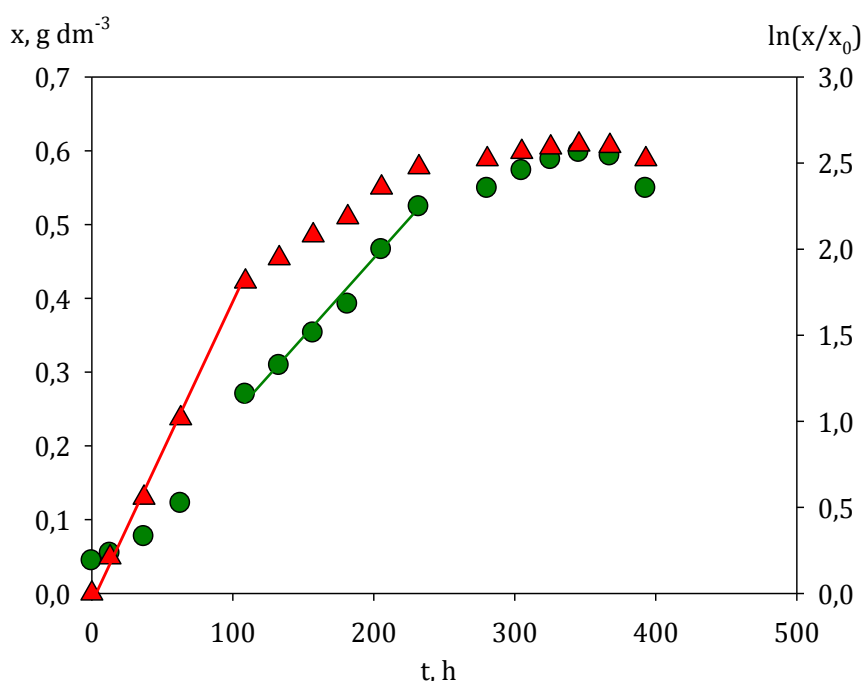


Figura 5.14 Variación de la concentración de biomasa (●) con el tiempo de proceso, y curva de crecimiento de *S. quadricauda* (▲), en el Exp. 2 ScSA.

Como ya se ha indicado, el medio utilizado con *S. quadricauda* fue pobre en nitrógeno y este hecho ha podido limitar su crecimiento. El nitrógeno es uno de los factores limitantes más comúnmente reportado en el crecimiento de microalgas, Li *et al.* (2008). También, este hecho ha sido indicado por Qiang y Junda (2011) que observaron los efectos de la fuente de nitrógeno y su concentración en la formación de biomasa usando *Scenedesmus rubescens* en fotobiorreactores interiores (a nivel de laboratorio) y externos (tipo 'raceway'). Las fuentes de nitrógeno empleadas en los medios de cultivos fueron: $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, urea, NaNO_3 , mezcla de urea y NaNO_3 ; cuando el cultivo se realizó en un medio con mezcla de urea-N y NaNO_3 -N se determinaron mayor concentración de biomasa y además esta presentaba un nivel mínimo de cenizas.

Tabla 5.9. Velocidades específicas máximas de crecimiento y productividades de biomasa, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas (1 ScSF) y aguas de lavado de aceites (2 ScSA)

Expt	μ_m (h ⁻¹)	r^2	$P_b \cdot 10^3$ (g dm ⁻³ h ⁻¹)	r^2
1 ScSF	0,0115	0,993	2,2	0,990
2 ScSA	0,0166	0,999	2,1	0,988

Cabe indicar que al comparar los parámetros cinéticos, velocidad específica máxima de crecimiento y productividad en biomasa, obtenidos en el crecimiento de *C. pyrenoidosa* y *S. quadricauda* en las mismas condiciones experimentales, tanto μ_m como P_b presentaron valores más elevados en los cultivos con *C. pyrenoidosa*.

5.2.2.2 Composición bioquímica de la biomasa

a) Pigmentos

El porcentaje de clorofilas totales, y el contenido de clorofilas por células, aumentó desde el comienzo del experimento hasta el final de la fase exponencial en los cultivos con aguas de lavado de aceitunas. Al inicio de la fase de desaceleración el %CHL comenzó a disminuir, pero lentamente; por otra parte, la

relación CHL/N aumentó lentamente y persistió hasta el final de esta fase y luego disminuyó rápidamente. Al final de la fase de desaceleración el %CHL comenzó a disminuir rápidamente hasta el final del experimento, Figura 5.15; este hecho es similar al observado por Hodaifa *et al.* (2008) usando el mismo tipo de agua residual pero con *S. obliquus*.

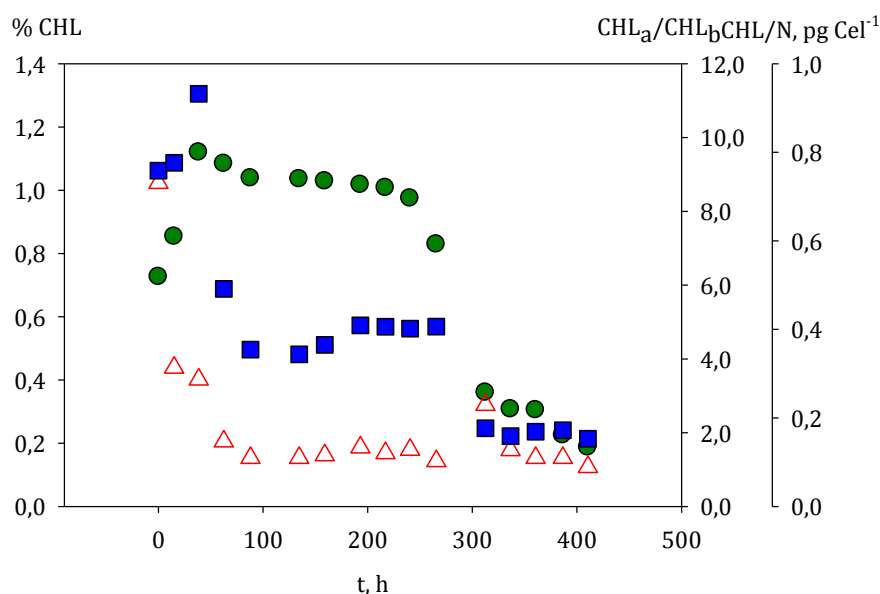


Figura 5.15 Porcentaje de clorofilas totales (●), relación entre los contenidos de clorofilas 'a' y 'b' (▲), y contenido de clorofilas totales por célula (■) con el tiempo de proceso, en el Exp. 1 ScSF.

En los cultivos con aguas de lavado de aceites como medio nutriente, el porcentaje de clorofilas totales aumentó en la fase exponencial y comenzó a disminuir en la fase de desaceleración hasta el final del experimento. Por otro lado, la relación CHL/N disminuyó significativamente desde el comienzo del experimento, Figura 5.16.

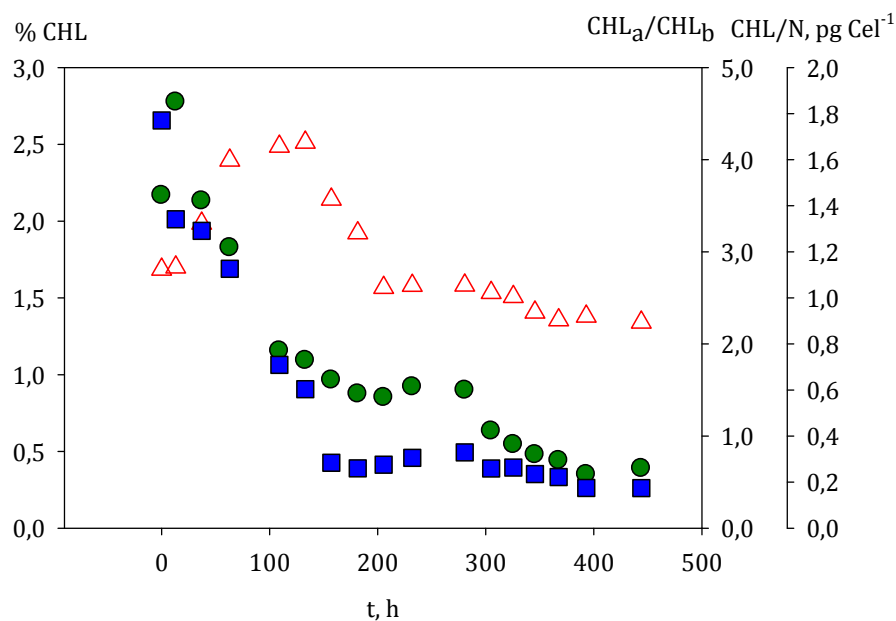


Figura 5.16 Porcentaje de clorofilas totales (●), relación entre los contenidos de clorofilas 'a' y 'b' (▲), y contenido de clorofilas totales por célula (■) con el tiempo de proceso, en el Exp. 2 ScSA.

Por otra parte, se determinó la relación CHL_a/CHL_b, observándose que la relación disminuye hasta el final de la fase exponencial y posteriormente prácticamente constante en los cultivos con aguas de lavado

de aceitunas. Sin embargo, en los cultivos con aguas de lavado de aceites la relación fue diferente; a partir del inicio del experimento hasta la fase de desaceleración, CHL_a/CHL_b aumentó y luego bajo rápidamente, Figuras 5.15 y 5.16.

Se observó que CHL_a/CHL_b , fue más alta en los cultivos con agua de lavado de aceitunas que con aguas de lavado de aceites.

Se ha detectado que la relación CHL/Ca en los cultivos fue diferente en función del agua usada como medio nutriente. En relación a los carotenoides totales, se observó que los parámetros %Ca, CHL/Ca y Ca/N , al comienzo del cultivo, aumentaron y luego disminuían lentamente durante el transcurso de experimento cuando se utilizó aguas de lavado de aceitunas, Figura 5.17.

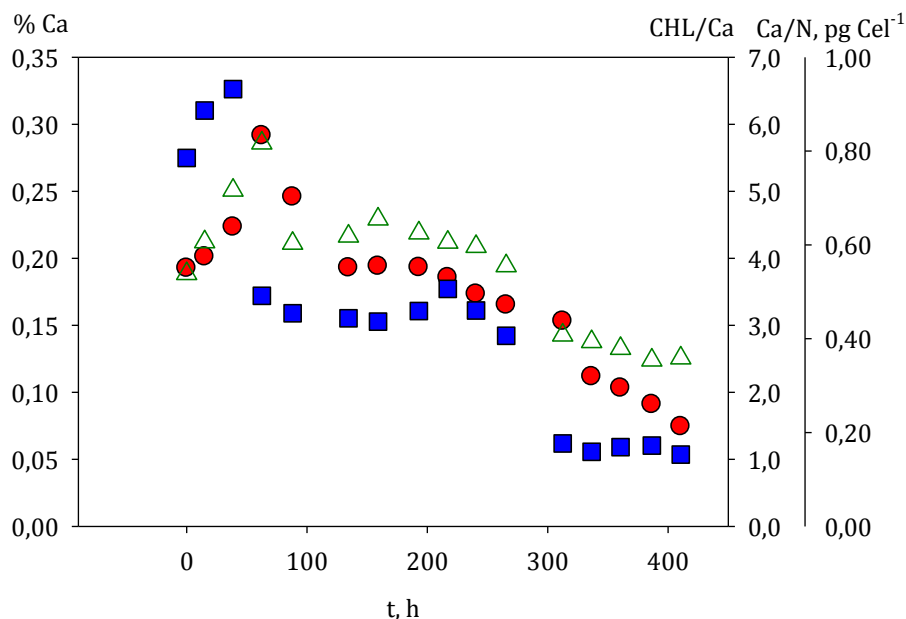


Figura 5.17 Porcentaje de carotenoides totales (●), relación entre los contenidos de clorofilas y carotenoides totales (△), y contenido de carotenoides totales por célula (■) con el tiempo de proceso, en el Exp. 1 ScSF.

Por otra parte, se observa que los parámetros %Ca y Ca/N disminuían cuando se utilizó aguas de lavado de aceites; sin embargo, la relación CHL/Ca al inicio del cultivo aumentó y luego disminuyó lentamente en el transcurso del experimento, Figura 5.18.

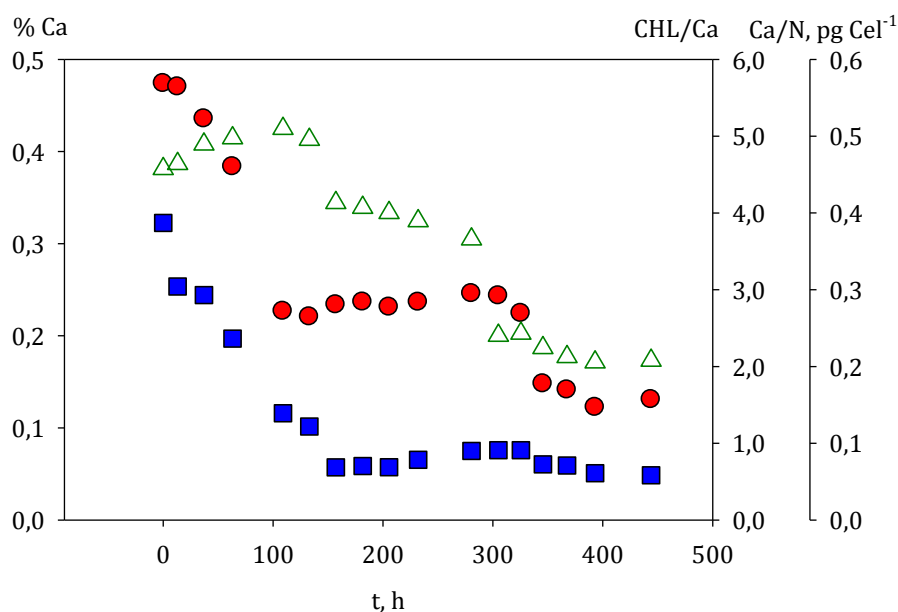


Figura 5.18 Porcentaje de carotenoides totales (●), relación entre los contenidos de clorofilas y carotenoides totales (△), y contenido de carotenoides totales por célula (■) con el tiempo de proceso, en el Exp. 2 ScSA.

Los resultados observados para *S. quadricauda* en aguas de lavado de aceitunas y en la fase de desaceleración para la relación CHL/Ca fue próxima a 6; sin embargo, esta relación CHL/Ca es un poco menor cuando se usa aguas de lavado de aceites como medio nutriente (Figuras 5.17 y 5.18). La diferencia de composición de los medios genera una diferencia en la composición bioquímica de la biomasa, tal como se observa en los contenidos de clorofilas y carotenoides totales, y con ello en la relación CHL/Ca.

Las condiciones de cultivo (temperatura, salinidad, irradiación y concentración de nutrientes) pueden afectar a la producción de carotenoides en las microalgas, ya que la síntesis de carotenoides en algas ocurre en respuesta a factores de estrés ambiental, Moore *et al.* (1989).

b) Proteínas

Se observó que, usando aguas de lavado de aceitunas como medio de cultivo, el porcentaje de proteínas y el contenido de la proteína por célula aumentaba durante la fase exponencial, a partir de la fase de desaceleración comenzó a disminuir hasta el final del experimento. Figura 5.19. En relación con las aguas de lavado de aceites se ha observado que %P y P/N disminuye durante el transcurso del cultivo, Figura 5.20. En este punto cabe indicar que la síntesis de proteínas está relacionada con el contenido de N del medio de cultivo; también la fuente del nitrógeno es un indicador para determinar el parámetro %P.

Las células de microalgas deben reducir el nitrato para poder utilizarlo, pero este no es el caso del amonio Chen *et al.* (2011). Esto puede conllevar un mayor requerimiento de energía para la utilización de nitrógeno del nitrato en relación con el amonio.

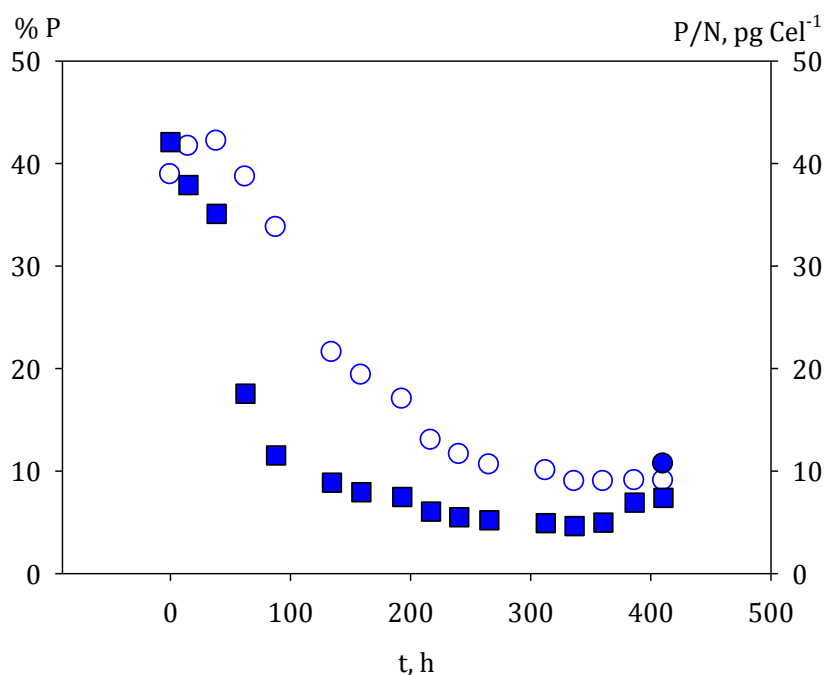


Figura 5.19 Variación del porcentaje de proteínas (○), contenido de proteínas por célula (■), y proteína cruda (●) con el tiempo de proceso, en el Exp. 1 ScSF.

Al final de los experimentos, se analizó la biomasa de *S. quadricauda*, y se determinó el contenido de proteínas crudas, resultando un porcentaje de 10,7% en las aguas de lavado de aceitunas y 51,6% en las aguas de lavado de aceites. Estos valores tan diferentes indican que el medio nutriente puede influir de forma importante en el contenido de proteínas de la biomasa. En este caso se determina un porcentaje de proteínas crudas 5 veces superior en aguas de lavado de aceites, aunque esta diferencia es bastante menor en el caso proteínas reales.

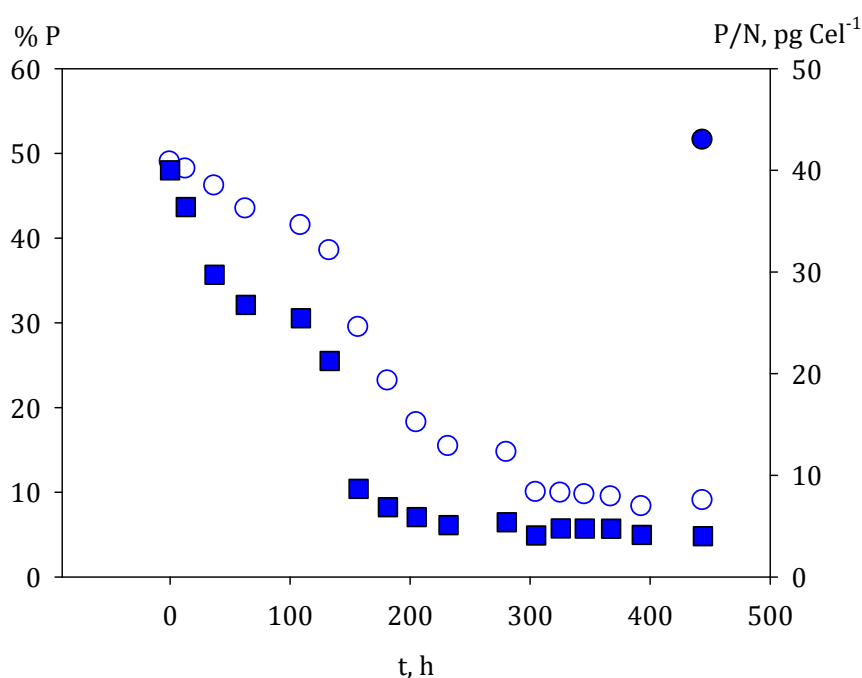


Figura 5.20 Variación del porcentaje de proteínas (○), contenido de proteínas por célula (■), y proteína cruda (●) con el tiempo de proceso, en el Exp. 2 ScSA.

c) Lípidos totales y ácidos grasos

Al final de los experimentos, se analizó la biomasa de *S. quadricauda* para determinar el porcentaje de lípidos totales. En ambos medios cultivos, el porcentaje de lípidos totales estuvieron próximos, 35,8% con aguas de lavado de aceitunas y 37,7% con aguas de lavado de aceites, Figura 5.21. Estos valores son superiores a los descritos por Becker (1994), entre 12 y 14%. Por otra parte, Choi *et al.* (1987) determinan un 11,2% usando *S. obliquus*.

Los medios de cultivos fueron pobres en nutrientes, y pesar de ello *S. quadricauda* ha tenido la capacidad de producir lípidos. Estos resultados son similares a los obtenidos por Vishal *et al.* (2019), que observaron que cuando las microalgas están bajo condiciones de estrés, desvían sus rutas metabólicas hacia la síntesis de lípidos.

Por otra parte, Song-Fang *et al.* (2019) determinan que *S. obliquus* cultivada en fotobiorreactores de columna de burbujeo, con un medio de cultivo conteniendo aguas residuales, muestra que la productividad lipídica se incrementó significativamente en un 30,5 y un 23,6% después del tratamiento con ácido indol-3-acético (IAA) y 1-triacontanol (TRIA), respectivamente.

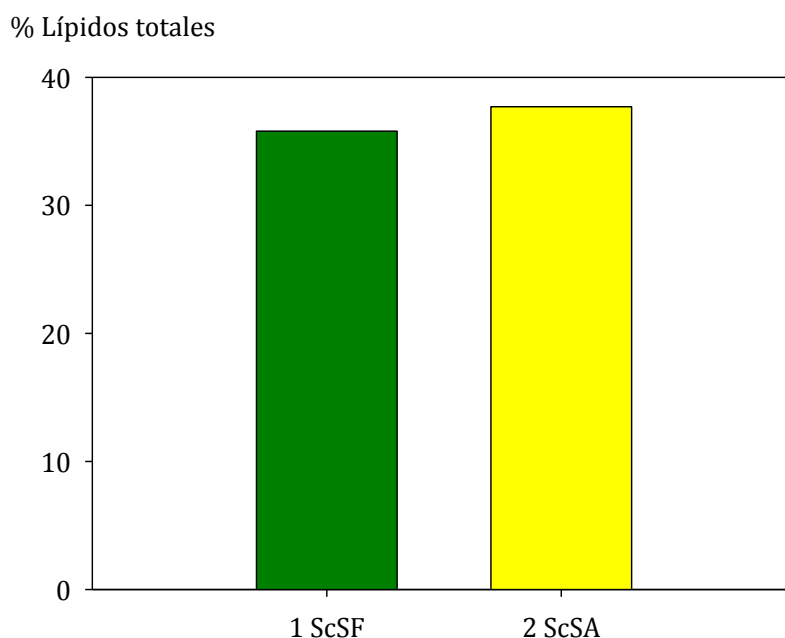


Figura 5.21 Contenido de lípidos totales al final de cada experimento, con *S. quadricauda* en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas (1 ScSF ■), y aguas de lavado de aceites (2 ScSA ■).

En todos los cultivos y al final del experimento, el perfil de ácidos grasos de la fracción lipídica de la biomasa se determinó.

En la Tabla 5.9 se recogen los resultados del agrupamiento de estos porcentajes en ácidos grasos saturados (SAT), ácidos grasos monoinsaturados (MON), ácidos grasos poliinsaturados (POL), ácidos grasos esenciales (ESE) y ácidos grasos superiores poliinsaturados (AGSP). En la misma tabla se recoge la relación n3/n6, obtenida considerando los sumatorios de las fracciones n3 y n6.

Tabla 5.9. Composición en ácidos grasos de la fracción lipídica de *S. quadricauda*. Influencia de la composición del medio de cultivo, en experimentos con aguas de lavado de aceitunas (1 ScSF) y aguas de lavado de aceites (2 ScSA)

Fracciones de ácidos grasos, %	SAT	MON	POL	ESE	AGSP	n3/n6
1 ScSF	1,32	22,3	65,5	3,13	0,229	13,6
2 ScSA	1,36	26,1	66,2	2,42	0,798	19,8

En ambos experimentos el ácido graso más abundante fue el (18:2n3), 41,0%, en el medio con aguas de lavado de aceitunas Tabla B9, y 37,1% con las aguas de lavado de aceites Tablas B12.

Cabe indicar que, los valores medios más altos detectados en la fracción lipídica de la biomasa fue la de ácidos grasos poliinsaturados 65,5%, obtenido en los cultivos con aguas de lavado de aceitunas y 66,2% con aguas de lavado de aceites.

Como se explicó anteriormente con respecto a la composición química del medio del cultivo utilizado en este trabajo, debe tenerse en cuenta que el medio afectó directamente a la formación de ácidos grasos durante el período de cultivo.

Qiang y Junda (2011) observaron que *S. rubescens* pudo cambiar su composición de ácidos grasos a través de la falta de nitrógeno en el cultivo abierto; el contenido de C18:1n (7, 9 y 11) aumentó dramáticamente pero C18:3n3 disminuyó durante la limitación de nitrógeno. La composición en ácidos grasos en ciertas microalgas podría modificarse fácilmente alterando las condiciones de cultivo, Damiani *et al.* (2010).

Johnson y Wen (2009) encontraron que el contenido de las series C16 y C18 de *Chlorella sp.* fue cambiando significativamente durante el período de cultivo de 5 días.

El valor de la relación n3/n6 fue 13,6 en el cultivo con agua de lavado de aceitunas, y 19,7 en el cultivo con agua de lavado de aceites. En este caso, estos altos valores están muy alejados del rango 2-5, donde se considera que la biomasa tiene cierto valor nutricional, Webb y Chu (1982).

d) Composición elemental de la biomasa

Cabe indicar que en ambos cultivos se registraron diferencias significativas en la composición elemental de la biomasa recolectada. Tablas B.8 y B.11 (Anexo B). El porcentaje más alto en la biomasa de *S. quadricauda* correspondió al 'C' en ambos tipos de aguas, mientras que el 'S' fue el de menor contenido, Figura 5.22. Se observó una diferencia en el contenido de nitrógeno entre los dos medios de cultivos, y este hecho ha conducido a que la relación entre carbono y nitrógeno fuese 29,9 usando aguas de lavado de aceitunas, y 5,7 con aguas de lavado de aceites. Esta diferencia se puede justificar considerando que los medios con aguas de lavado de aceites tienen mayor concentración de fuente de nitrógeno (Tablas 5.2 y 5.4) y por lo tanto las células han podido asimilar más N en el interior de la célula, lo cual puede producir una menor relación C/N.

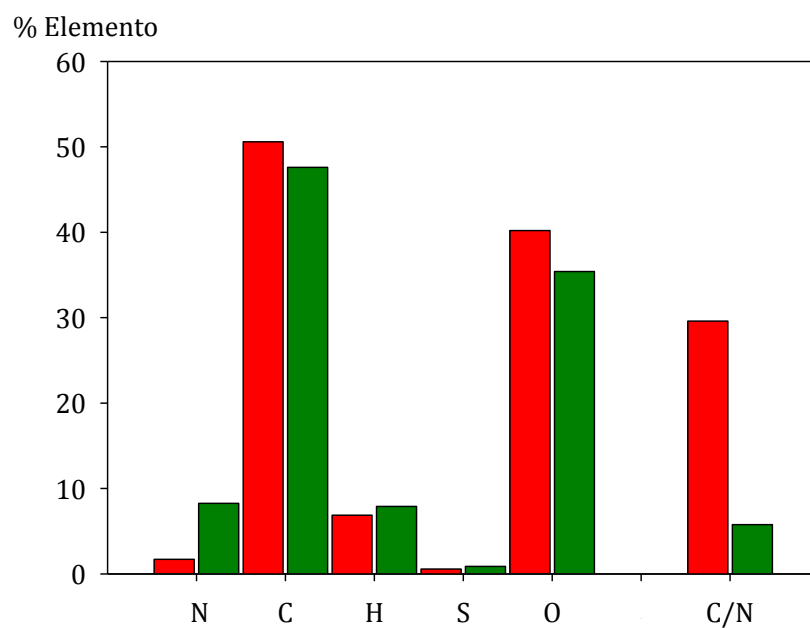


Figura 5.22 Composición elemental de la biomasa de *S. quadricauda* determinada al final de los cultivos, con aguas de lavado de aceitunas (■ 1 ScSF) y aguas de lavado de aceites (■ 2 ScSA).

5.3 CRECIMIENTO DE *Chlorella pyrenoidosa* EN MEDIO RODRÍGUEZ-LÓPEZ

En este trabajo las variables experimentales estudiadas, usando el medio de cultivo Rodríguez-López (R-L), han sido: temperatura en el rango 15 a 30°C y velocidad específica de suministro de aire en el intervalo 0,0 a 1,5 v/v/min.

Para la determinación de la composición de la biomasa y sus variaciones durante los cultivos, se han calculado los valores de las concentraciones en biomasa, x (g dm⁻³), número de células, N (cel dm⁻³), clorofilas totales, CHL (g dm⁻³), carotenoides totales, Ca (g dm⁻³), proteínas, P (g dm⁻³), y contenido total en lípidos, L (%). Además, al final de los cultivos, se ha determinado el perfil en ácidos grasos de la fracción lipídica de la biomasa y la composición elemental de la biomasa (%), según los procedimientos indicados en el apartado 4 de este trabajo.

5.3.1 Efecto de la temperatura de operación

Si se proporcionan todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de algas, la temperatura será un efecto directamente significativa principalmente en la cinética de formación de biomasa de microalgas, pudiendo incidir en su composición bioquímica. Puede que no sea fácil cultivar microalgas sin control de temperatura. En esta parte se estudiará el efecto de la temperatura sobre la producción de biomasa y la composición bioquímica de la biomasa, a través de los resultados obtenidos en experimentos realizados a 15, 20, 25 y 30°C.

Los resultados experimentales obtenidos con el objetivo de estudiar la influencia de las temperaturas del medio de cultivo constituido se indican en las Tablas C1 a C24. (Anexo C).

5.3.1.1 Producción de biomasa

A través de los resultados experimentales, se calcularon los valores de concentración de biomasa y número de células, datos que se han utilizado para su representación gráfica frente al tiempo en todos los cultivos, y que han permitido obtener las curvas de crecimiento, Figura 5.23, para los experimentos 1 RL, 3 RL, 6 RL y 8 RL, para el rango de temperaturas de 15 a 30°C. Se ha indicado con línea continua el intervalo considerado para la fase exponencial.

Al igual que en el apartado anterior, la cuantificación del crecimiento celular se ha llevado a cabo mediante dos parámetros cinéticos:

- 1- Velocidad específica máxima de crecimiento, μ_m , a través de la ecuación [5.1].
- 2- Productividad volumétrica en biomasa, P_b , mediante la expresión [5.2].

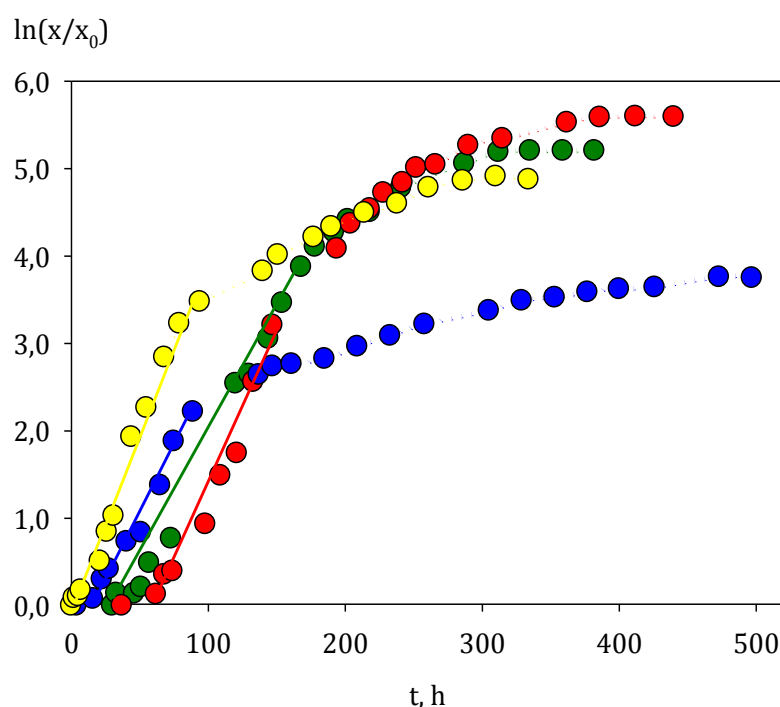


Figura 5.23 Curvas de crecimiento de *C. pyrenoidosa* en los experimentos en medio R-L, a las temperaturas 15°C (●), 20°C (●), 25°C (●) y 30°C (●).

En los cultivos de esta serie se detecta fase de adaptación excepto a temperatura de 30°C; la fase de adaptación de mayor duración tiene lugar a 15°C. Inicialmente, estos resultados ya indican que la temperatura tiene un efecto directo en el crecimiento de las algas; a temperaturas más altas la fase de adaptación es de menor duración.

Por otra parte, los valores medios de la concentración de biomasa más elevada, velocidad específica máxima de crecimiento y productividad volumétrica en biomasa, junto con los valores de la desviación estándar correspondiente, se muestran para cada cultivo en la Tabla 5.10.

Tabla 5.10. Concentraciones de biomasa más elevadas, velocidades específicas máximas de crecimiento y productividades de biomasa, en cultivos realizados con medio Rodríguez-López

EXP	T (°C)	$x_{\max}$ (g dm ⁻³)	μ_m (h ⁻¹)	$P_b 10^3$ (g dm ⁻³ h ⁻¹)
$\frac{1 \text{ RL}}{2 \text{ RL}}$	15	$1,67 \pm 0,11$	$0,028 \pm 0,001$	$1,61 \pm 0,001$
$\frac{3 \text{ RL}}{4 \text{ RL}}$	20	$1,94 \pm 0,03$	$0,038 \pm 0,001$	$4,70 \pm 0,003$
$\frac{5 \text{ RL}}{6 \text{ RL}}$	25	$1,79 \pm 0,03$	$0,047 \pm 0,004$	$6,65 \pm 0,001$
$\frac{7 \text{ RL}}{8 \text{ RL}}$	30	$1,45 \pm 0,20$	$0,041 \pm 0,001$	$5,10 \pm 0,001$

Se observa que la concentración más alta de biomasa formada en el medio de extracción Rodríguez-López fue 1,94 g dm⁻³ a 20°C, y la concentración más baja de biomasa se determinó a 30°C. Por otra parte, se observó el número de célula y el crecimiento de las células durante el período de crecimiento en el medio de cultivo, Por lo tanto, el aumento en la temperatura tuvo un efecto significativo en la biomasa de *C. pyrenoidosa* en el medio de cultivo sintético.

Se observó que al final del experimento el número de células disminuye y su tamaño aumenta, lo que imposibilita durante el cultivo determinar la formación de biomasa a través del parámetro 'células dm^{-3} '. El mayor tamaño celular se detecta a 20°C en esta serie experimental, y el más pequeño a 30°C.

Se puede observar que los valores máximos experimentales de μ_m y P_b se han alcanzado a 25°C. A esta temperatura μ_m es 0,047 h^{-1} y P_b 6,65 $\text{mg dm}^{-3} \text{h}^{-1}$.

A partir de los resultados obtenidos, los valores medios de la velocidad específica máxima de crecimiento y productividad volumétrica en biomasa aumentaron de 15 a 25°C, y luego ambos parámetros empezaron a disminuir. En este punto, se puede indicar que experimentalmente 25°C es la temperatura más favorable para el crecimiento de *C. pyrenoidosa* con el medio de cultivo R-L, Figura 5.24.

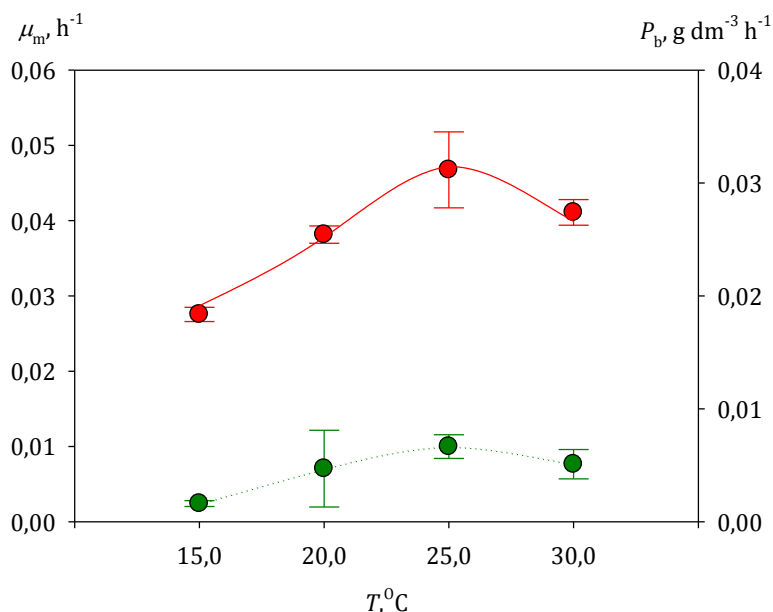


Figura 5.24 Velocidades específicas máximas de crecimiento, μ_m , h^{-1} (●), y productividades volumétricas en biomasa, P_b , $\text{g dm}^{-3} \text{h}^{-1}$ (●). Influencia de la temperatura usando el medio Rodríguez-López.

Estos resultados coinciden con los publicados por Lee *et al.* (2015), al estudiar el efecto de la temperatura en tres cepas de *B. braunii* aisladas en aguas naturales en tres zonas de Corea del Sur cultivadas en medios sintéticos. Las temperaturas estudiadas por estos autores, coinciden con las utilizadas en la investigación que se ha realizado (15, 20, 25 y 30°C) obteniendo para las tres cepas que la máxima velocidad de crecimiento y la máxima concentración de biomasa se alcanzaba a 25°C y la mínima en los cultivos a 15°C lo que concuerda con lo determinado en este trabajo.

Un modelo ampliamente utilizado que representa los efectos combinados de la temperatura sobre el crecimiento y muerte celular es el propuesto por Moser (1985), [5.6]:

$$\mu = \mu_0 e^{\left(\frac{-E_d}{RT}\right)} - \mu_d e^{\left(\frac{-E_a}{RT}\right)} \quad [5.6]$$

Siendo E_a y E_d energías de activación aparente para las zonas ascendente y descendente de la curva de crecimiento, en kJ mol^{-1} , y μ_0 , μ_d dos factores pre-exponenciales característicos del modelo.

Los valores de μ_m frente a temperatura se han ajustado según la ecuación de [5.6], mediante regresión no lineal utilizando el software estadístico OriginPro 8, obteniendo los siguientes resultados para los distintos parámetros:

$$E_a = 40 \text{ kJ mol}^{-1} \quad E_d = 323,3 \text{ kJ mol}^{-1} \quad \mu_0 = 5,11 \cdot 10^5 \text{ h}^{-1} \quad \mu_d = 1,30 \cdot 10^{54} \text{ h}^{-1}$$

Siendo el sumatorio de los cuadrados de los residuos:

$$SSQ = 3,93 \cdot 10^{-7}$$

En relación con estos resultados cabe resaltar, los valores de las energías de activación aparentes, E_a , y E_d , son próximos a los obtenidos con *C. pyrenoidosa*, en crecimiento heterotrófico y en medio Rodríguez-López, Camacho *et al.* (1988); en este trabajo, los valores de E_a y E_d están en los rangos 75,60-113,04 kJ mol⁻¹, y 296,41-329,93 kJ mol⁻¹, respectivamente. Por otra parte, si se compara el valor E_a con el obtenido en *C. vulgaris* (218/8k), cultivada en condiciones autotrófica, el valor es muy próximos, $E_a = 56,68 \text{ kJ mol}^{-1}$, Lee *et al.* (1985).

Aplicando condición de extremo, en este caso la condición de máximo, se llega a la expresión [5.7]:

$$T_{\text{óptima}} = \frac{E_d - E_a}{R \ln ((\mu_d E_d) / (\mu_0 E_a))} \quad [5.7]$$

$$T_{\text{óptima}} = 26,9^\circ\text{C}$$

Este valor es muy próximo al obtenido con *S. obliquus* donde $T_{\text{óptima}}$ fue 23,9°C, usando también efluentes líquidos de almazaras como medio nutriente, Hodaifa *et al.* (2010b).

Sustituyendo este valor de $T_{\text{óptima}}$, junto con el resto de los parámetros obtenidos, en la ecuación [5.6], se puede calcular el valor máximo de la velocidad específica máxima de crecimiento:

$$(\mu_m)_{\text{máx}} = 0,0488 \text{ h}^{-1}$$

A partir del modelo se pueden reproducir los valores de μ_m en el intervalo de 15 a 30°C, detectándose un ajuste aceptable en el intervalo de temperaturas considerado.

En relación con el efecto de la temperatura sobre el crecimiento, se ha introducido el coeficiente Q_{10} , definido como el cociente entre la velocidad específica máxima de crecimiento a una temperatura y la velocidad específica máxima de crecimiento a una temperatura 10°C más baja:

$$Q_{10} = \frac{\mu_T}{\mu_{T-10}} \quad [5.8]$$

Aplicando esta ecuación entre la temperatura 25°C y otra 10°C más baja, 15°C, se obtiene que:

$$Q_{10} = 1,65$$

Calculando Q_{10} para las temperaturas 30 y 20°C el coeficiente de temperatura es:

$$Q_{10} = 1,01$$

Los valores de Q_{10} están dentro del rango encontrado en la bibliografía para el crecimiento de distintos microorganismos, que oscila entre 1,05 y 4,0, Rose (1977).

La temperatura afecta al medio de cultivo en relación a la solubilidad de los gases y sales minerales. En relación a los gases, la disponibilidad de O_2 y CO_2 en el medio depende de la temperatura. En definitiva, la temperatura afecta al crecimiento, a la conversión del sustrato y a la síntesis productos.

5.3.1.2 Composición bioquímica de la biomasa

Durante el transcurso de los cultivo en medio Rodríguez-López y para cada una de las temperaturas ensayadas con *C. pyrenoidosa*, se calcularon los porcentajes de clorofilas, %CHL, y carotenoides totales, %Ca, referidos a biomasa seca. Estos parámetros se calcularon de acuerdo con las ecuaciones [5.3] y [5.4], mencionadas anteriormente. Asimismo, se han evaluado la cantidad de clorofilas y carotenoides por célula, CHL/N y Ca/N, respectivamente, y la relación entre las concentraciones de clorofila a y b, CHL_a/CHL_b , así como la relación CHL/Ca. También, se ha determinado los valores las velocidades específicas y las productividades en clorofilas totales, q_{CHL} y P_{CHL} , y en carotenoides totales, q_{Ca} y P_{Ca} .

Por otra parte, también se han calculado a lo largo del cultivo los porcentajes en proteínas referido a la biomasa seca, % P, de acuerdo con la ecuación [5.5]. También se ha determinado los valores de las velocidades específicas, q_p , y las productividades P_p , de formación de proteínas.

Al final de cada cultivo se han determinado los contenidos en proteínas crudas, en lípidos totales, composición en ácidos grasos y composición elemental de la biomasa formada.

a) Pigmentos

A través de los resultados obtenidos, se ha observado que los valores de %CHL y %Ca aumentaron en la fase exponencial y de desaceleración del crecimiento a 15 y 20°C, y luego empezaron a disminuir hasta el final del experimento. Sin embargo, los valores de %CHL y %Ca a 25 y 30°C disminuyeron rápidamente desde las primeras horas de inicio del cultivo, Figura 5.25 y 5.26. Cabe indicar que, la diferencia en los valores de %CHL es significativa con la temperatura, en todos los experimentos. En el cultivo a 15°C, se observó el valor más alto de %CHL, 3,36%. Ugwu *et al.* (2007), determinó que el contenido de clorofila en *Chlorella sorokiniana*, en un medio de cultivo sintético (MM4 modificado), a pH ajustado a 6,0, disminuye cuando la temperatura aumenta.

Los porcentajes de clorofilas totales obtenidos al final de los cultivos son inferiores a 0,4%, excepto para el cultivo realizado a 15°C (Tablas C1 a C24, Anexo C). En este sentido, los resultados obtenidos en esta investigación están de acuerdo con lo indicado por Milner (1953), que señala que el porcentaje de clorofilas totales en *C. pyrenoidosa* se encuentra en el intervalo de 0,01 a 6,0%, dependiendo de las condiciones de cultivo.

Por otra parte, también cabe destacar que los contenidos de clorofilas totales y carotenoides por célula presentan una evolución similar al %CHL y %Ca para las cuatro temperaturas. A 15 y 20°C, aumentan en la fase exponencial y después disminuyen en las fases de desaceleración y estacionaria. A 25 y 30°C, la disminución es desde el inicio del cultivo.

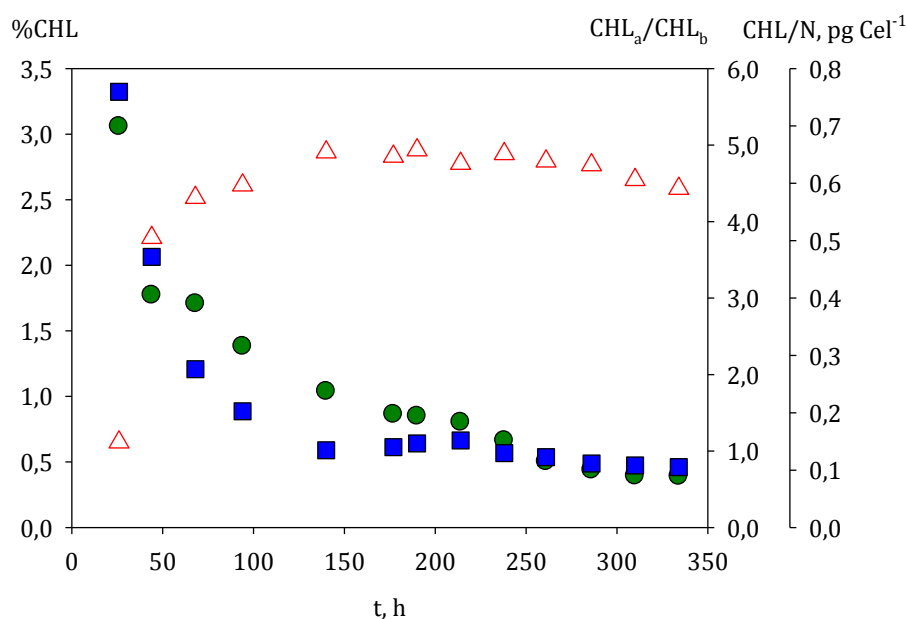


Figura 5.25 Variación del porcentaje de clorofilas totales (●), relación entre los contenidos de clorofilas 'a' y 'b' (△), y contenido de clorofilas totales por célula (■) en *C. pyrenoidosa* con el tiempo en cultivo del medio R-L, a la temperatura 30°C, Exp. 8 RL.

En lo referente a la relación CHL_a/CHL_b , se ha observado un aumento rápido durante la fase exponencial y después disminuyó de forma lenta a partir de fase de desaceleración hasta el final del cultivo. En este punto se puede indicar que, el contenido de clorofila 'a' aumentó durante la fase exponencial y después disminuyó; por otra parte, la concentración de clorofila 'b' se incrementó durante el transcurso de todo del cultivo; este hecho justifica la variación observada en la relación CHL_a/CHL_b . Este resultado coincide con el obtenido por Hammouda *et al.* (2015) utilizando la microalga *Chlorella* sp. en un medio sintético.

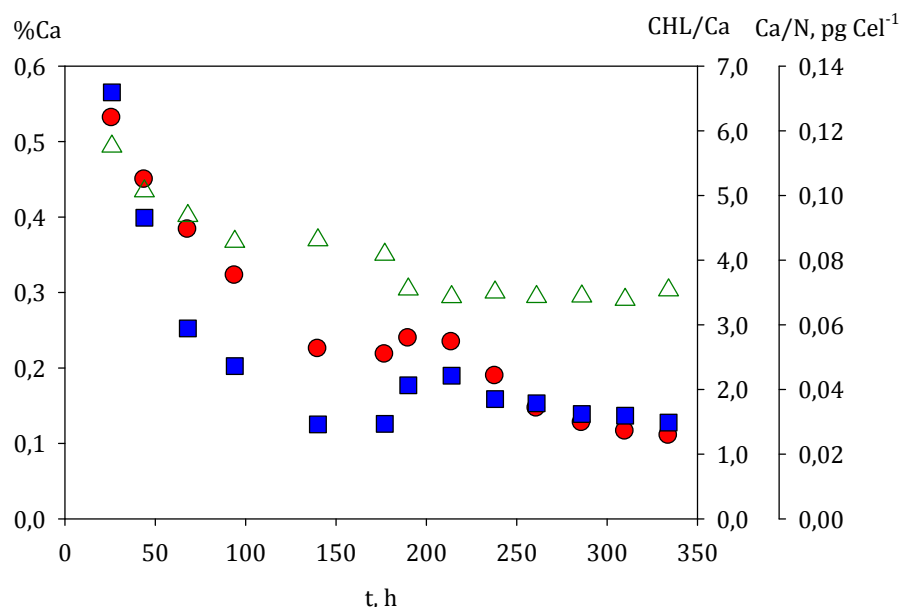


Figura 5.26 Variación del porcentaje de carotenoides totales (●), relación entre los contenidos de clorofilas y carotenoides totales (△), y contenido de carotenoides por célula (■) en *C. pyrenoidosa* con el tiempo en cultivo del medio R-L, a la temperatura 30°C, Exp. 8 RL.

La evaluación de la velocidad específica de formación de clorofilas, de acuerdo con su definición q_{CHL} se puede expresar de la siguiente ecuación [5.9]:

$$q_{\text{CHL}} = \frac{1}{x} \frac{d\text{CHL}}{dt} \quad [5.9]$$

Considerando como hipótesis de partida que la formación de clorofilas está asociada al crecimiento, se podría indicar que:

$$\frac{d\text{CHL}}{dt} = \alpha_{\text{CHL}} \frac{dx}{dt} \quad [5.10]$$

donde α_{CHL} es el coeficiente estequiométrico. Al multiplicar la ecuación anterior por dt , resulta:

$$d\text{CHL} = \alpha_{\text{CHL}} dx \quad [5.11]$$

La integración de esta expresión en un determinado intervalo de tiempo:

$$\int_{\text{CHL}_0}^{\text{CHL}} d(\text{CHL}) = \alpha_{\text{CHL}} \int_{x_0}^x dx \quad [5.12]$$

conduce a la siguiente ecuación:

$$(\text{CHL} - \text{CHL}_0) = \alpha_{\text{CHL}} (x - x_0) \quad [5.13]$$

El cálculo de α_{CHL} , se ha llevado a cabo representando la concentración neta de clorofilas formadas $(\text{CHL} - \text{CHL}_0)$ vs a la concentración neta de biomasa producida $(x - x_0)$.

Se ha observado una recta en valores experimentales de la fase exponencial de crecimiento, lo que indicará que efectivamente la formación de clorofilas está asociada al crecimiento en el cultivo en este periodo de tiempo.

Finalmente, dividiendo los dos miembros de la ecuación [5.10] por la concentración de biomasa, x , se deduce la ecuación:

$$q_{\text{CHL}} = \alpha_{\text{CHL}} \mu \quad [5.14]$$

De forma similar a la utilizada para la determinación de la velocidad específica máxima de formación de clorofilas, y bajo la hipótesis de que la formación de carotenoides está asociada al crecimiento, se puede deducir la expresión que determina la velocidad específica máxima de formación de carotenoides:

$$q_{\text{Ca}} = \alpha_{\text{Ca}} \mu \quad [5.15]$$

donde α_{Ca} , sería el coeficiente estequiométrico para la formación de carotenoides, y μ la velocidad específica de crecimiento. Aquí también, la determinación de este coeficiente se ha realizado en aquellos cultivos donde las representaciones de las concentraciones de carotenoides netas formada, $\text{Ca} - \text{Ca}_0$, frente a las de biomasa neta producida, $x - x_0$, presentan cierta linealidad. Al igual que ha sucedido con las clorofilas, en todos los cultivos en la fase exponencial de crecimiento se ha observado un línea recta y mediante

ajuste por mínimos cuadrado se han obtenidos los valores de α_{Ca} , Tabla 5.11. Por tanto, también se puede confirmar que formación de carotenoides está asociada a la formación de biomasa al menos en la fase exponencial de crecimiento.

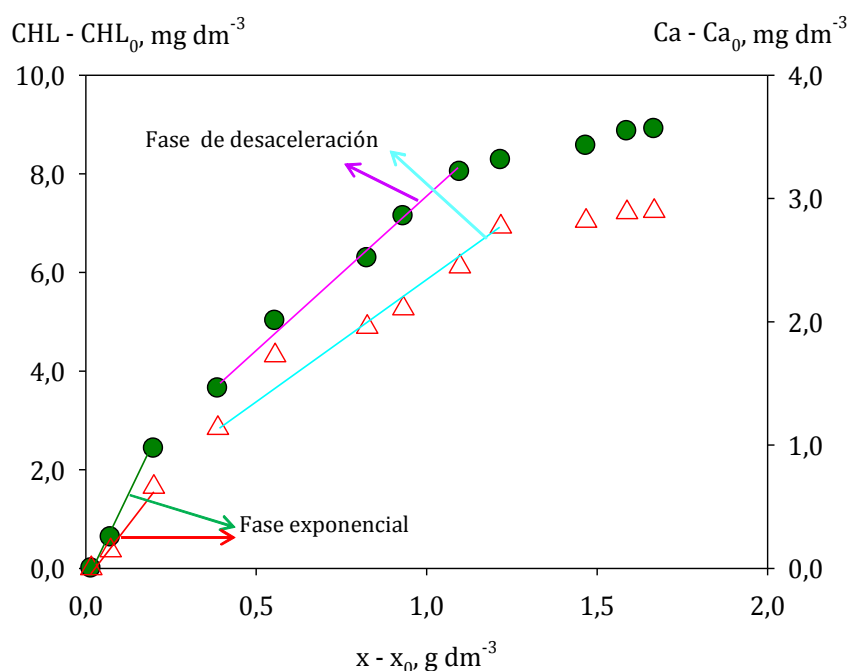


Figura 5.27 Relación entre la concentración neta de clorofilas totales (●), y carotenoides totales (Δ), con la concentración de biomasa neta producida de *C. pyrenoidosa* en el cultivo con medio R-L, a la temperatura de 30°C, Exp. 8 RL.

En general, a la vista de los resultados obtenidos para los parámetros la relación entre concentración neta de clorofilas y carotenoides totales con la concentración de biomasa neta producida, a partir del inicio del experimento hasta el final de la fase de desaceleración aumentó, Figura 5.27, y luego en algunos experimentos disminuyó hasta al final del cultivo. En esto punto, se puede indicar que las condiciones de operación tal como temperatura, salinidad, y concentración de nutrientes) pueden afectar a la producción y composición bioquímica en las microalgas.

A efecto de comparación, y a diferencia de lo encontrado en esta investigación, cabe indicar que la relación entre $CHL - CHL_0$ y $Ca - Ca_0$ con la biomasa neta producida, utilizando un medio sintético con la microalga *B. braunii* a 30°C, fue aumentando durante el transcurso de todo el cultivo, Órpez (2015).

Para las cuatro temperaturas ensayadas, y partir de representaciones similares a la de la Figura 5.27, se ha podido determinar los valores de la velocidad específica máxima y productividad volumétrica en clorofilas totales y carotenoides totales, utilizando las ecuaciones [5.14] y [5.15], Tabla 5.11. Para cada temperatura se han realizado dos experimentos lo que ha permitido calcular el valor medio, junto con la desviación estándar correspondiente.

Tabla 5.11. Velocidades específicas máximas y productividades volumétricas en formación de clorofilas y carotenoides, a las temperaturas de 15 a 30°C en cultivos realizados con medio Rodríguez-López

T (°C)	q_{CHL} (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	$P_{\text{CHL}} 10^2$ (mg dm ⁻³ h ⁻¹)	q_{Ca} (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	$P_{\text{Ca}} 10^2$ (mg dm ⁻³ h ⁻¹)
15	0,75 ± 0,20	2,47 ± 0,12	0,16 ± 0,02	0,483 ± 0,17
20	0,40 ± 0,03	5,50 ± 0,85	0,10 ± 0,01	0,658 ± 0,01
25	0,81 ± 0,10	8,11 ± 0,20	0,18 ± 0,01	2,19 ± 0,08
30	0,36 ± 0,02	4,59 ± 0,82	0,11 ± 0,01	1,25 ± 0,30

Se observó diferencias significativas para los valores de q_{CHL} , P_{CHL} , q_{Ca} , y P_{Ca} . A temperatura de 25°C se determinan valores más altos. Se ha detectado que a medida que la temperatura aumenta de 15 a 25°C, los valores de P_{CHL} y P_{Ca} aumentan y luego disminúan. Por otro parte, los variables q_{CHL} y q_{Ca} . En este caso, es posible que la iluminación tenga un efecto sobre la formación de clorofila y carotinoides con el efecto de las temperaturas.

b) Proteínas

A partir de los valores experimentales de la concentración de proteínas, número de células y concentración en biomasa, se han calculado el porcentaje en proteínas referido a la biomasa seca, %P, y el contenido de proteínas por célula, P/N. También se ha determinado los valores de las velocidades específicas, q_p , y las productividades P_p , de formación de proteínas. Finalmente, a partir del análisis elemental de la biomasa, se ha podido calcular el porcentaje de proteínas crudas, %P_{cruda}.

De forma similar a la utilizada para la determinación de la velocidad específica máxima de formación de clorofilas, y bajo la hipótesis de que la formación de proteínas está asociada al crecimiento, se puede deducir la expresión que determina la velocidad específica máxima de formación de proteínas:

$$q_p = \alpha_p \mu \quad [5.16]$$

donde α_p , sería el coeficiente estequiométrico para la formación de proteínas, y μ la velocidad específica de crecimiento. Aquí también, la determinación de este coeficiente se ha realizado en todos cultivos y para cada una de las temperaturas, a partir de las representaciones de las concentraciones de proteínas netas formada, $P - P_0$, frente a las de biomasa neta producida, $x - x_0$. Este último parámetro se ha determinado en la fase exponencial de crecimiento y en el periodo de comportamiento lineal de la biomasa.

En general, se observó que los parámetros %P y P/N a 15 y 30°C disminuían en el transcurso del experimento. Sin embargo, a 20 y 25°C, el %P y la relación P/N aumentan durante la fase exponencial y luego disminuyen de forma lenta a partir de la fase de desaceleración. Al final de los experimentos, se analizó la biomasa de *C. pyrenoidosa*, y partir del %N se determinó el contenido de proteínas crudas, Figura 5.28.

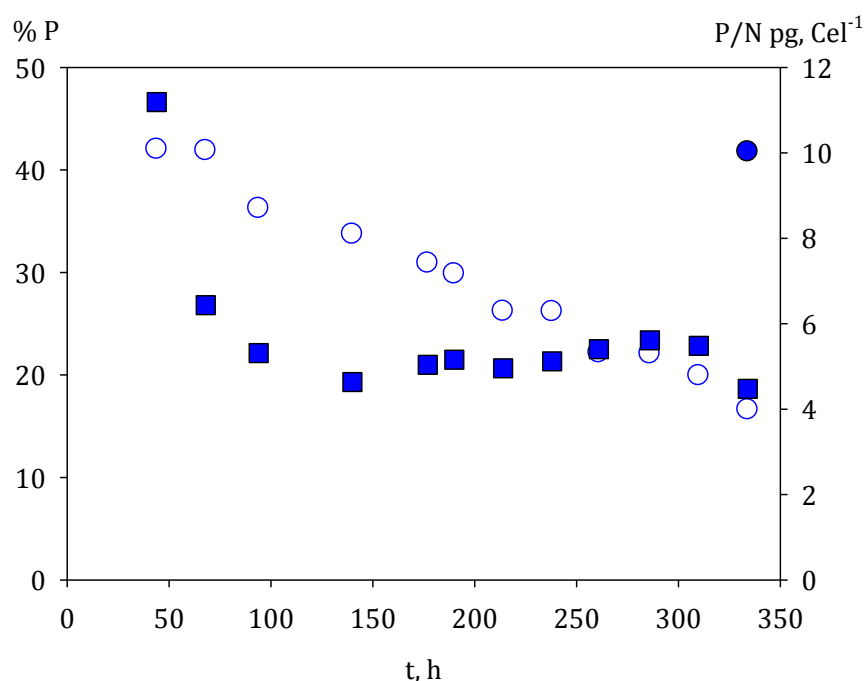


Figura 5.28 Variación del porcentaje de proteínas (○), y contenido de proteínas por célula (■) con el tiempo en *C. pyrenoidosa*, en medio R-L, y a la temperatura 30°C. Contenido de proteína cruda al final del cultivo (●), Exp. 8 RL.

Cabe indicar que, todos los procesos metabólicos que ocurren dentro de la célula y en todas las fases de crecimiento tuvieron un efecto en la formación de proteínas hasta el final del experimento.

A partir de los resultados se ha determinado que la relación entre concentración neta de proteínas y concentración de biomasa neta producida, a partir del inicio del experimento hasta el final de la fase de desaceleración aumentó. Posteriormente, disminuyó hasta al final del cultivo tal como se observa para el bioproceso llevado a cabo a 30°C, Figura 5.29. Igual comportamiento fue observado a las restantes temperaturas, pero con disminuciones más pronunciadas y a tiempos más cortos en los cultivos llevados a cabo a más baja temperatura.

Los ajustes obtenidos en las representaciones de $(P-P_0)$ vs $(x-x_0)$ han sido aceptable para las fases exponencial y de desaceleración, y ello ha permitido determinar los coeficientes estequiométricos, α_p , en ambas zonas que finalmente han conducido a calcular las velocidades específicas máximas y productividades volumétrica de formación de proteínas, utilizando la ecuación [5.16]. Este hecho permite confirmar que en esta serie experimental la formación de proteínas está ligada al crecimiento al menos en las fases exponencial y de desaceleración.

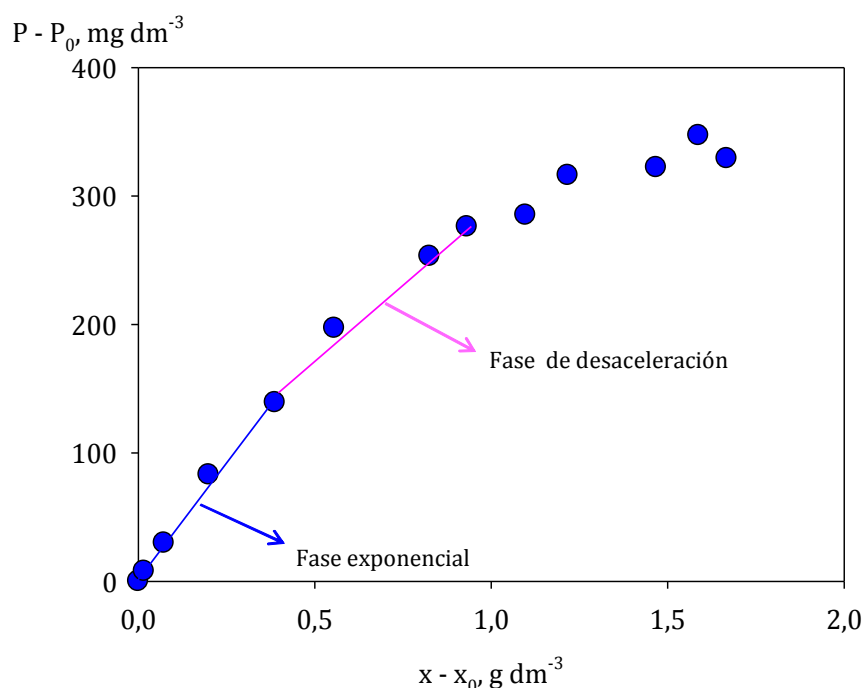


Figura 5.29 Relación entre la concentración neta de proteínas (●) y la concentración de biomasa neta producida usando *C. pyrenoidosa* en el cultivo con medio R-L, a la temperatura de 30°C, Exp. 8 RL.

Se ha detectado que a medida que la temperatura aumenta de 15 a 25°C, los valores de q_p y P_p aumentan. A temperatura de 25°C se han determinado los valores más altos. Por tanto, se ha observado cierta influencia directa de la temperatura sobre la formación de proteínas.

Tabla 5.12. Velocidades específicas máximas y productividades volumétricas en proteínas en el rango de 15 a 30°C, en cultivos de *C. pyrenoidosa* en medio Rodríguez-López

T (°C)	q_p (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	P_p 10 (mg dm ⁻³ h ⁻¹)
15	9,71 ± 0,13	2,30 ± 0,10
20	14,8 ± 0,8	6,40 ± 0,22
25	19,9 ± 0,7	7,57 ± 0,81
30	14,9 ± 0,2	7,55 ± 0,47

También los valores medios de proteína cruda determinada al final del cultivo, % P_{Cruda} , junto con la desviación estándar correspondiente se ha calculado para las cuatro temperaturas ensayadas, Tabla 5.13. El valor más alto del % P_{Cruda} fue 44,6% a 25°C, utilizando un medio sintético de cultivo rico en nitrógeno, tal como es el medio Rodríguez-López. Estos porcentajes de proteínas obtenidos están dentro del rango general indicado (0-55%) para algas unicelulares del género *Chlorella*, Dubinsky *et al.* (1980).

Tabla 5.13. Porcentajes en proteínas crudas, en el rango de 15 a 30°C, en cultivos de *C. pyrenoidosa* en medio Rodríguez-López

T (°C)	15	20	25	30
P_{Cruda} (%)	24,1 ± 0,0	24,2 ± 0,0	44,7 ± 0,0	41,7 ± 0,1

En este contexto, Rekha *et al.* (2012) utilizando *Chlorella vulgaris*, cultivada en un medio sintético (Chu-10), a un pH próximo a 7,5, con iluminación artificial (fotoperiodos 12 luz: 12 oscuridad),

observaron que operando en el rango de 25 a 35°C, el porcentaje de proteínas más elevado fue 51,9% en el rango 25 a 30°C, mientras que a temperaturas más elevadas (rango 30-35°C) este porcentaje fue más bajo, 47,9%. Esta disminución observada a las temperaturas más elevadas tiene cierta similitud con el descenso detectado en esta investigación a 25 y 30°C.

c) Lípidos totales y ácidos grasos

Al final de todos los experimentos de esta serie, se alcanzó la fase estacionaria, la biomasa fue recolectada y se determinó el contenido de lípidos totales. A partir de la fracción lipídica de la biomasa se ha determinado su composición en ácidos grasos. Estos ácidos grasos han sido agrupados en saturados (SAT), monoinsaturados (MON), poliinsaturados (POL), esenciales (ESE), y ácidos grasos superiores poliinsaturados n-3 (identificados por AGSP); también se ha calculado la relación ó índice n3/n6.

Se ha observado que el porcentaje de lípidos totales aumenta con la temperatura en el rango 15 a 25°C y luego disminuye a 30°C. El valor más alto fue 48,8% a 25°C, Figura 5.30. En este punto, se puede indicar que las altas temperaturas dañan a los microorganismos al desnaturalizar las enzimas, las proteínas transportadoras y otras proteínas. El calor también deteriora la membrana microbiana, la doble capa lipídica se funde y se desintegra; por ello, a pesar de que las enzimas funcionales actúan más rápidamente a temperaturas elevadas, el microorganismo puede alterarse hasta el punto de inhibir su crecimiento, pudiendo ocurrir que el daño sea irreversible.

En relación con los resultados obtenidos, previamente cabe indicar que el metabolismo en algas puede modificarse de forma importante con las condiciones de operación, Guschina y Harwood (2006). En este sentido, Converti *et al.* (2009), en cultivos de *Chlorella vulgaris* comprueba que la temperatura de operación influye de forma importante en el porcentaje de lípidos totales.

Como conclusión, se puede destacar que la variación de temperatura ensayada en esta investigación ha inducido un cierto efecto en la producción de lípidos, al menos hasta 25°C.

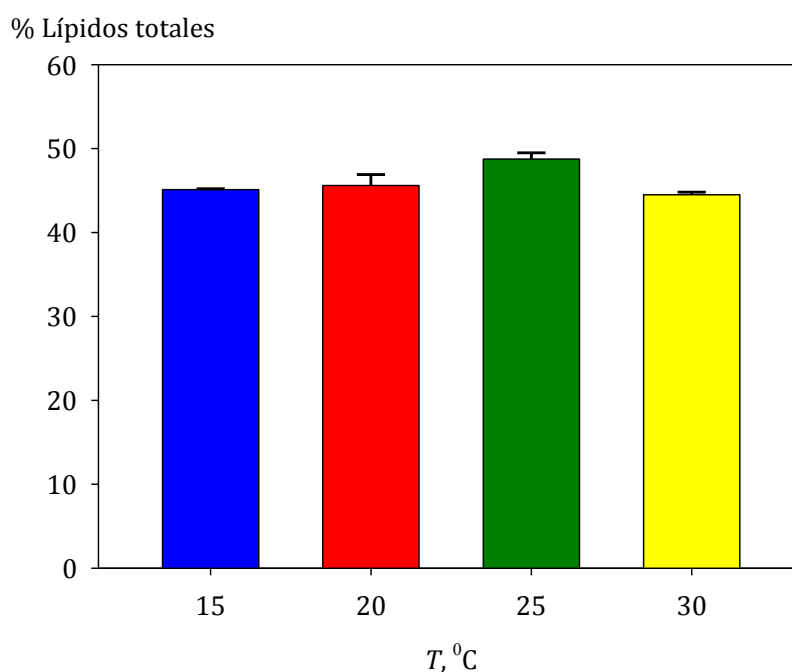


Figura 5.30 Contenido de lípidos totales al final de cada experimento, con *C. pyrenoidosa* en cultivo con medio R-L, a las temperaturas 15(■), 20(■), 25(■), y 30 (■) °C.

El perfil de ácidos grasos de la fracción lipídica de la biomasa se determinó al final del experimento en todos los cultivos, expresándose como porcentaje respecto al total de ácidos grasos. A partir de los cromatogramas obtenidos, los porcentajes de cada una de estas fracciones de ácidos grasos.

En general, en todos los experimentos el ácido graso más abundante fue el ácido oleico (18:1) 40,1% a la temperatura de 15°C. Se observó una estrecha relación entre la temperatura y el porcentaje de cada ácido graso; cuando la temperatura aumentó las fracciones de POL (%) y ESE (%) se incrementaron. Por otra parte, las fracciones de MON (%) y SAT (%) disminuyeron, Tabla 5.14.

Tabla 5.14. Composición en ácidos grasos de la fracción lipídica de *C. pyrenoidosa* en cultivo con medio R-L, a diferentes temperaturas

<i>T</i> (°C)	SAT	MON	POL	ESE	AGSP	n3/n6
15	23,7 ± 0,4	41,2 ± 0,2	31,1 ± 0,5	28,2 ± 0,5	0,03 ± 0,00	1,61 ± 0,03
20	21,3 ± 0,2	40,9 ± 0,1	31,5 ± 0,1	28,7 ± 0,0	0,10 ± 0,01	1,31 ± 0,00
25	21,6 ± 0,4	37,7 ± 0,6	37,2 ± 0,5	29,2 ± 0,1	0,16 ± 0,05	1,32 ± 0,03
30	21,2 ± 0,5	34,6 ± 0,1	41,3 ± 0,1	34,4 ± 0,1	0,15 ± 0,01	1,24 ± 0,05

El contenido de MON es mayor que el de POL debido a las mayores concentraciones de ácido oleico a las temperaturas 15 y 20°C. En la fracción de ácidos grasos poliinsaturados, cabe indicar que a medida que la temperatura aumenta los contenidos de ácido linolénico disminuyen. El valor más alto de la fracción POL fue 41,3% a 30°C. Tanmay *et al.* (2019) han obtenido resultados similares con *C. vulgaris* a 28°C, en un medio sintético.

El valor más alto de la relación n3/n6 fue 1,61 a temperatura de 15°C. En estos casos y con todas las temperaturas, el valor n3/n6 no está en el rango (2-5) donde se considera que la biomasa tiene cierto valor nutricional, Webb y Chu (1982).

d) Composición elemental de la biomasa

El análisis de la composición elemental se realizó a la biomasa seca obtenida al final de cada experimento, tal como se explica en el apartado 4 de este Memoria. También, se ha determinado la relación entre los porcentajes de carbono y de nitrógeno, C/N.

En consideración a los resultados observados, el contenido de carbono fue más alto a 15°C, 52,8%, y el mínimo a 30°C, 48,5%. El mayor contenido de nitrógeno, 7,16%, se obtiene a 25°C, mientras que el de hidrógeno fue a 15°C. La biomasa procedente de cultivos a 30°C contenía el mayor porcentaje de oxígeno y azufre 37,7% y 0,49%, respectivamente. Por otra parte, la relación C/N más alta fue a 15°C, 13,7. Figura 5.31 es un ejemplo que muestra el análisis elemental de biomasa seca de *C. pyrenoidosa* a 30°C.

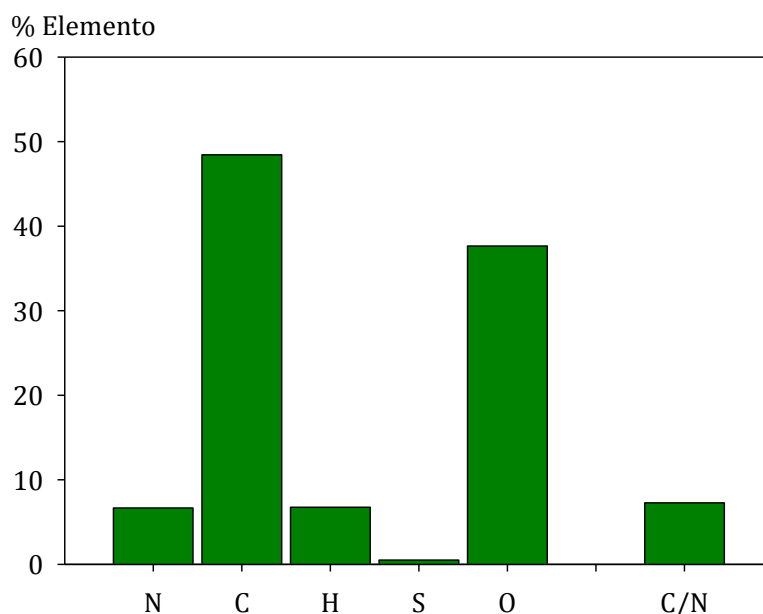


Figura 5.31 Composición elemental de la biomasa de *C. pyrenoidosa* determinada al final de los cultivos, en el medio R-L, a temperatura de 30°C, Exp. 8 RL.

5.3.2 Influencia de la velocidad específica de suministro de aire

El aire es de primordial importancia ya que contiene la fuente de carbono para la fotosíntesis en forma de dióxido de carbono. Para cultivos muy densos, el CO₂ que acompaña al aire (0,035%) burbujeado a través del cultivo limita el crecimiento de algas y el suministro de aire puede complementarse con dióxido de carbono puro. Además, la adición de CO₂ amortigua el agua contra los cambios de pH como resultado del balance de CO₂/H₂CO₃.

La aeración del medio se puede realizar por agitación mecánica o burbujeando una fase gaseosa; esta segunda alternativa se puede realizar introduciendo gases puros (O₂, N₂ y CO₂) en el aire o bien aire enriquecido en CO₂. La aeración en ausencia de agitación mecánica, mantiene una distribución uniforme de las microalgas. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que no todas las especies de algas pueden tolerar una mezcla vigorosa con el aire, Sánchez *et al.* (1993).

5.3.2.1 Producción de biomasa

Los resultados experimentales correspondientes al estudio del efecto del nivel de aeración, utilizando medio de cultivo sintético Rodríguez-López, se recogen en las Tablas C.25 a C.48 y sus representaciones gráficas en las Figuras C.9 a C.16 (Anexo C).

Inicialmente, se han obtenido las curvas de crecimiento para los experimentos 9 RL, 11 RL, 13 RL y 15 RL, realizados a los niveles de aeración de 0,0, 0,5 1,0, y 1,5 v/v/min, Figura 5.32. En estos cultivos se ha detectado fase de adaptación, excepto en el de mayor nivel de aeración, 1,5 v/v/min, Figuras C.9 a C.16 (Anexo C). Es necesario aclarar en este punto, que la información que se encuentra en bibliografía respecto a esta variable de operación, suelen ser inexistente, o en múltiples ocasiones el suministro de aire a los cultivos es mediante simple agitación orbital del cultivo; en otros casos, en los que se introduce una fase gaseosa en el reactor, se indica un caudal volumétrico (dm³ min⁻¹) pero no el volumen del biorreactor o recipiente donde se lleva a cabo el cultivo.

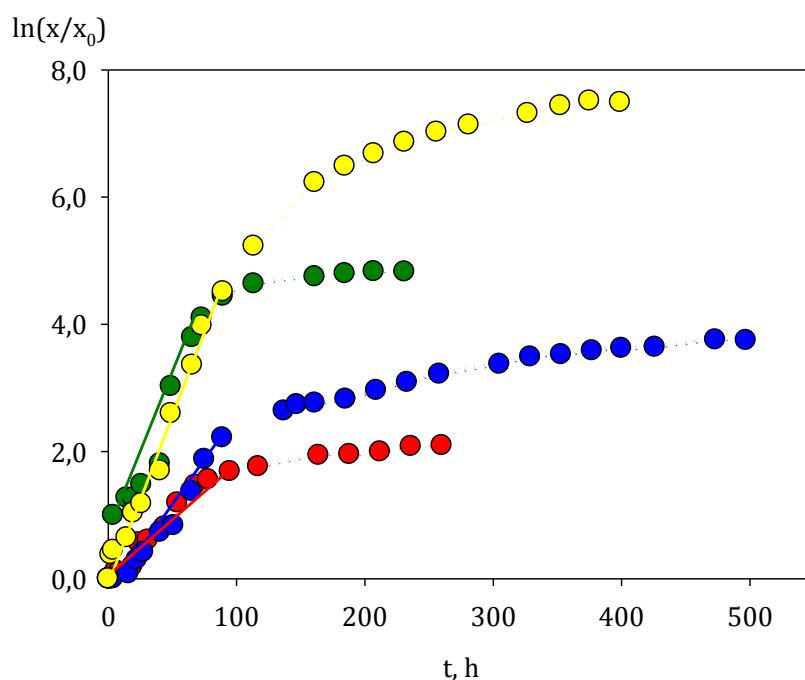


Figura 5.32 Curvas de crecimiento de *C. pyrenoidosa*, en medio R-L, realizados a niveles de aeración de 0,0 (●), 0,5 (●), 1,0 (●) y 1,5 (●) v/v/min.

Por otra parte, los valores medios de la concentración de biomasa más elevada, velocidad específica máxima de crecimiento y productividad volumétrica en biomasa, junto con los valores de la desviación estándar correspondiente, se muestran para cada cultivo en la Tabla 5.15.

Tabla 5.15. Concentraciones de biomasa más elevadas, velocidades específicas máximas de crecimiento y productividades de biomasa, en cultivos realizados con medio Rodríguez-López

EXP	Q (v/v/min)	$x_{\max}$ (g dm ⁻³)	μ_m (h ⁻¹)	$P_b \cdot 10^3$ (g dm ⁻³ h ⁻¹)
<u>9 RL</u> <u>10 RL</u>	0,0	0,056 ± 0,01	0,021 ± 0,001	0,65 ± 0,00
<u>11 RL</u> <u>12 RL</u>	0,5	0,65 ± 0,01	0,024 ± 0,002	3,22 ± 0,10
<u>13 RL</u> <u>14 RL</u>	1,0	1,79 ± 0,03	0,047 ± 0,001	6,65 ± 0,11
<u>15 RL</u> <u>16 RL</u>	1,5	1,50 ± 0,10	0,048 ± 0,005	4,95 ± 0,20

En general, la concentración de biomasa aumenta a medida que aumenta el flujo de aire; pero hasta cierto límite del flujo de aire. Se observó que, el valor más alto de concentración de biomasa se obtuvo con el nivel de aeración 1 v/v/min.

A partir de los resultados obtenidos, el valor de la velocidad específica máxima de crecimiento aumenta de 0,0 a 1,5 v/v/v min. Por otra parte, la productividad en biomasa se incrementó de 0,0 a 1,0 v/v/min, y posteriormente disminuyó, Figura 5.33.

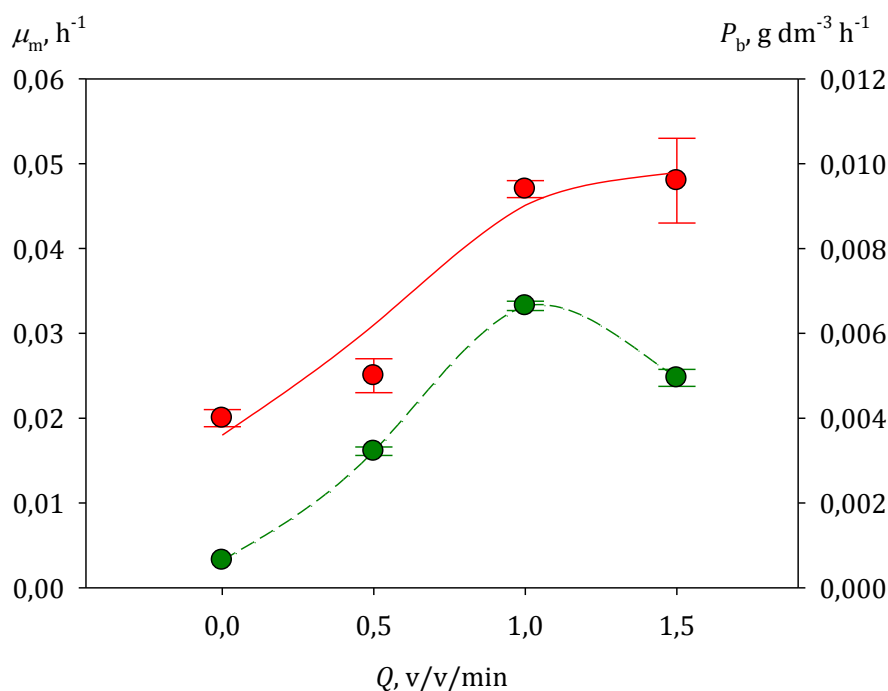


Figura 5.33 Velocidades específicas de crecimiento, μ_m , h^{-1} (●), y productividades volumétricas en biomasa, P_b , $g\ dm^{-3}\ h^{-1}$ (●). Influencia del nivel de aeración, usando el medio Rodríguez-López.

El incremento en las concentraciones de biomasa es inducido por el aumento en Q ; es posible explicar que cuanto mayor flujo de aire dentro del biorreactor más concentraciones de gases puros (O_2 , N_2 y CO_2) se determinará en el medio de cultivo. Esto indica que la entrada de aire es suficiente para alcanzar los valores de crecimiento más altos.

La variación de la velocidad específica máxima de crecimiento con la velocidad específica de suministro de aire, Q , se ha ajustado a una ecuación tipo polinómica:

$$\mu_m = a + bQ + cQ^2 \quad [5.17]$$

El ajuste se ha realizado mediante regresión no lineal utilizando el software estadístico OriginPro 8, obteniendo los siguientes resultados para los distintos parámetros:

$$a = 0,0181\ h^{-1}$$

$$b = 0,0272\ h^{-1}\ (v/v/min)^{-1}$$

$$c = -0,40\ 10^{-2}\ h^{-1}\ (v/v/min)^{-1}$$

Con los valores de los parámetros a , b y c , se ha reproducido la ecuación [5.17] quedando representada en la Figura 5.35 por una línea continua.

Siendo el sumatorio de los cuadrados de los residuos:

$$SSQ = 7,22\ 10^{-7}$$

Derivando la ecuación [5.17] e igualando a cero, se puede determinar la velocidad específica de suministro de aire que origina un valor máximo de μ_m y $Q_{\max}$ resultando:

$$(\mu_m)_{\max} = 0,0494\ h^{-1} \quad Q_{\max} = 1,46\ v/v/min$$

Con respecto a la fase de desaceleración, se observa que la productividad en biomasa aumentó en el rango de nivel de aeración 0,5-1,0 v/v/m y luego disminuyó. Este comportamiento es diferente al observado con otra clorofícea, *S. obliquus*. En el caso de *S. obliquus* se observó que la productividad disminuía con el caudal de aire hasta $Q = 0,5$ v/v/min y permanecía constante a valores de Q más elevados, Hodaifa *et al.* (2010b).

5.3.2.2 Composición bioquímica de la biomasa

Durante el transcurso de los cultivos en medio Rodríguez-López y para cada uno de los caudales de aire ensayados con *C. pyrenoidosa*, se calcularon los porcentajes de pigmentos, %CHL, y %Ca, referidos a biomasa seca. Estos parámetros se calcularon de acuerdo con las ecuaciones [5.3] y [5.4]. También, se han evaluado CHL/N, Ca/N, y la relación entre CHL_a/CHL_b , así como la relación CHL/Ca. Así mismo, se ha determinado los valores las velocidades específicas y las productividades en clorofilas totales, q_{CHL} y P_{CHL} , y en carotenoides totales, q_{Ca} y P_{Ca} .

Por otra parte, se han calculado a lo largo del cultivo, %P, de acuerdo con la ecuación [5.5]. También se ha determinado los valores de las velocidades específicas, q_p , y las productividades P_p , de formación de proteínas.

Al final de cada cultivo se determinó los contenidos en proteínas crudas, en lípidos totales, composición en ácidos grasos y composición elemental de la biomasa formada.

a) Pigmentos

A través de los resultados obtenidos, se ha observado que, en general, los valores de %CHL y %Ca disminuyeron desde la propia fase exponencial para los cuatro caudales ensayados, Figuras 5.34 y 5.35. Cabe indicar que los valores %CHL y %Ca se afectan con el nivel de aeración, en todos los experimentos.

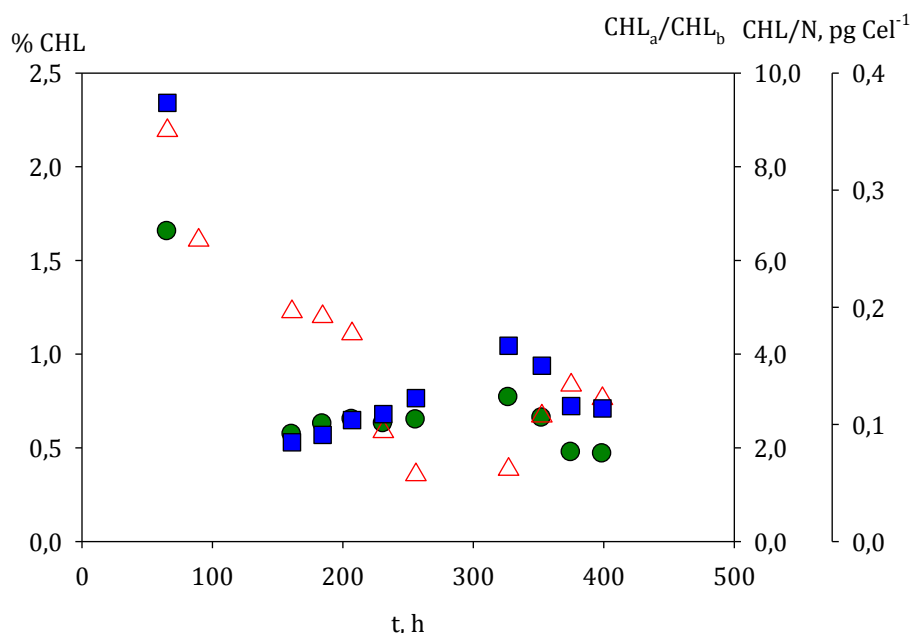


Figura 5.34 Variación del porcentaje de clorofilas totales (●), relación entre los contenidos de clorofilas 'a' y 'b' (△), y contenido de clorofilas totales por célula (■) en *C. pyrenoidosa* con el tiempo, en medio R-L, a nivel de aeración 1,5 v/v/min, Exp. 15 RL.

Los porcentajes de clorofilas totales determinados al final de los cultivos están en el rango 0,01 a 6,0%, (Tablas C25 a C48, Anexo C). En este punto, los resultados obtenidos están de acuerdo con lo indicado por

Milner (1953), que señala que el porcentaje de clorofilas totales en *C. pyrenoidosa* se encuentra en el intervalo de 0,01 a 6,0%, dependiendo de las condiciones de cultivo. Por otra parte, también cabe destacar que los contenidos de clorofilas totales y carotenoides por célula presentan una evolución similar al %CHL y %Ca para los cuatro niveles de aeración.

La relación CHL_a/CHL_b en las niveles de aeración 0,0 y 1,0 v/v/min, aumentó durante la fase exponencial y después disminuyó de forma lenta a partir de la fase de desaceleración hasta el final del cultivo. En este caso se puede indicar que, el contenido de clorofila 'a' aumentó durante la fase exponencial y después disminuyó; por otra parte, la concentración de clorofila 'b' se incrementó durante el transcurso de todo el cultivo; este hecho podría justificar la variación observada en la relación CHL_a/CHL_b .

Sin embargo, se ha detectado que la relación CHL_a/CHL_b en los niveles de aeración 0,5 y 1,5 v/v/min disminuye desde las primeras horas del inicio del cultivo.

La relación CHL/Ca en todas de las niveles de aeración, excepto a nivel 0,0 v/v/min, disminuyó durante el transcurso del experimento.

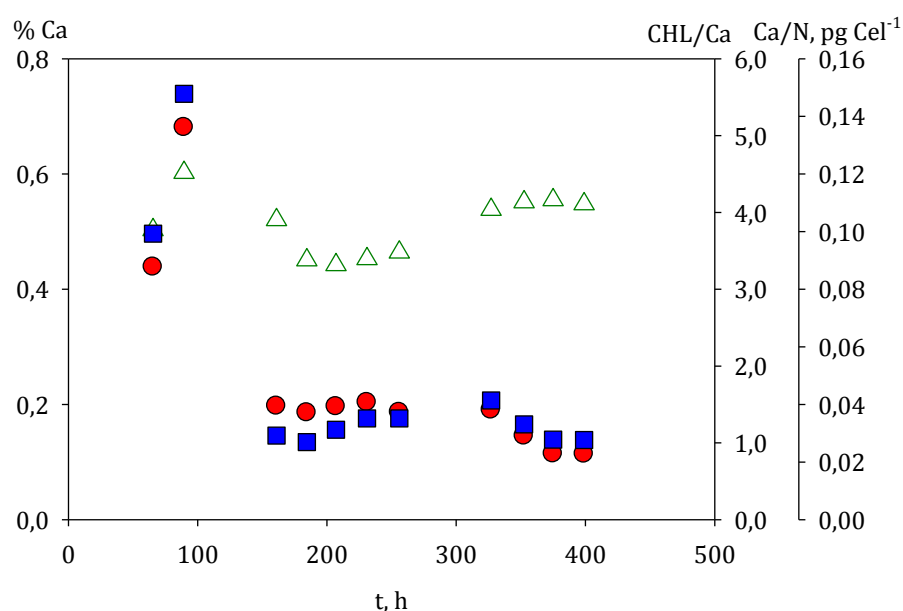


Figura 5.35 Variación del porcentaje de carotenoides totales (●), relación entre los contenidos de clorofilas y carotenoides totales (△), y contenido de carotenoides por célula (■) en *C. pyrenoidosa* con el tiempo en cultivo del medio R-L, a nivel de aeración 1,5 v/v/min, Exp. 15 RL.

En general, a partir de los resultados, se puede observar que las condiciones de operación bajo diferentes niveles de flujo de aire pueden afectar la producción y composición bioquímica de las microalgas. Con niveles de aeración bajos, no se observaron relaciones claras entre la concentración neta de clorofila y los carotenoides totales con la concentración de biomasa neta producida en la fase exponencial.

Por otro lado, con los niveles 1,0 y 1,5 v/v/min, la relación entre la concentración neta de clorofila y los carotenoides totales aumentó con la concentración neta de biomasa producida, desde el comienzo del experimento hasta el final de la fase de desaceleración, Figura 5.36.

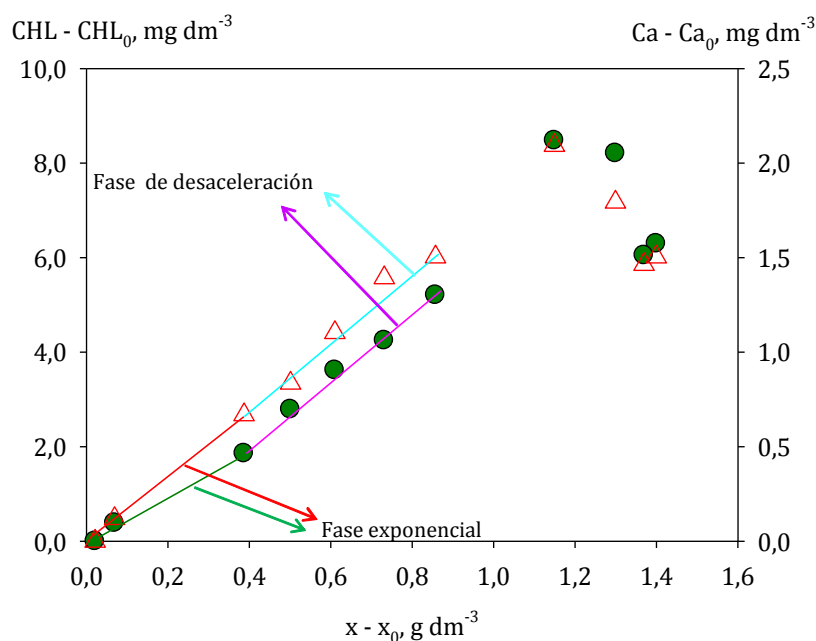


Figura 5.36 Relación entre la concentración neta de clorofilas totales (●) y carotenoides totales (Δ), vs concentración de biomasa neta obtenida de *C. pyrenoidosa* en medio R-L, a nivel de aeración 1,5 v/v/min, Exp. 15 RL.

Para las cuatro niveles de aeración ensayados, y a partir de representaciones similares a las de la Figura 5.36, fue posible determinar los valores máximos de velocidad específica máxima, y los rendimientos en clorofilas y carotenoides totales, utilizando las ecuaciones [5.14] y [5.15], Tabla 5.16.

Tabla 5.16. Velocidades específicas máximas y productividades volumétricas en formación de clorofilas y carotenoides, a nivel de aeración en cultivos realizados con medio Rodríguez-López

Q v/v/min	q_{CHL} (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	$P_{\text{CHL}} 10^2$ (mg dm ⁻³ h ⁻¹)	$q_{\text{Ca}} 10$ (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	$P_{\text{Ca}} 10^2$ (mg dm ⁻³ h ⁻¹)
0,0	-	1,49 ± 0,60	-	0,276 ± 0,016
0,5	0,33 ± 0,00	1,77 ± 0,20	0,768 ± 0,05	0,515 ± 0,032
1,0	0,81 ± 0,12	8,11 ± 0,20	1,79 ± 0,09	2,16 ± 0,08
1,5	0,46 ± 0,08	3,21 ± 0,05	1,54 ± 0,10	0,817 ± 0,074

En general, se ha observado que, los valores q_{CHL} , P_{CHL} , q_{Ca} y P_{Ca} aumenta y luego disminuyeron con el nivel de aeración suministrado al fotobiorreactor. A nivel de aeración 1,0 v/v/min se determinan valores más altos. Cabe indicar que, con el nivel 0,0 v/v/min no se pudo determinar los valores de q_{CHL} y q_{Ca} , debido a que apenas hubo crecimiento y la concentración de la biomasa en la fase exponencial fue muy pequeña.

b) Proteínas

A partir de los resultados, de concentración de proteínas, número de células y concentración en biomasa, se calcularon el porcentaje en proteínas referido a biomasa seca, %P, y el contenido de proteínas por célula, P/N. Así mismo, se ha determinado los valores de las velocidades específicas, q_p , y las productividades P_p , de formación de proteínas. Finalmente, se ha podido calcular el porcentaje de proteínas crudas, %P_{cruda}.

En general, se ha observado que el %P y P/N disminuye durante el transcurso del cultivo en todas los niveles de aeración, excepto cuando no se suministra aire, nivel 0,0 v/v/min; en este caso, el %P y P/N disminuyen desde las primeras horas del inicio del cultivo hasta el fin de fase exponencial, y luego aumenta hasta el final del experimento. En este punto, se puede indicar que los altos niveles de aeración pueden provocar estrés celular; este hecho podría justificar la disminución observada en ambos parámetros en los ensayos realizados.

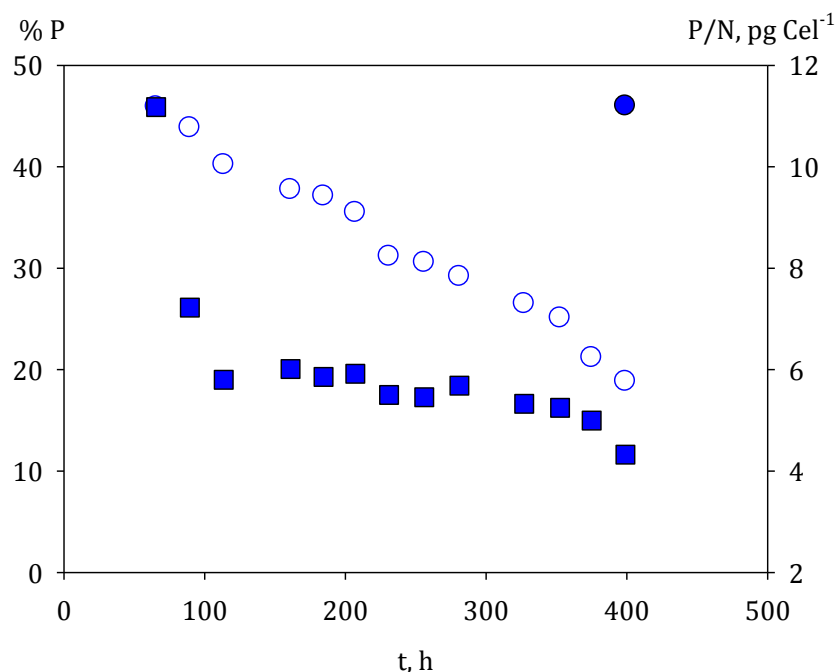


Figura 5.37 Variación del porcentaje de proteínas (○), y contenido de proteínas por célula (■) con el tiempo en *C. pyrenoidosa*, en medio R-L, y a nivel de aeración 1,5 v/v/min. Contenido de proteína cruda al final del cultivo (●), Exp. 15 RL.

Los ajustes obtenidos en las representaciones de (P-Po) vs (x-xo) han sido aceptable para las fases exponencial y de desaceleración, y ello ha permitido determinar los coeficientes estequiométricos, α_p , en ambas zonas que finalmente han conducido a calcular las velocidades específicas máximas y productividades volumétricas de formación de proteínas, utilizado la ecuación [5.16]. Este hecho nos permite afirmar que la formación de proteínas está asociada al crecimiento al menos en las fases exponencial y de desaceleración.

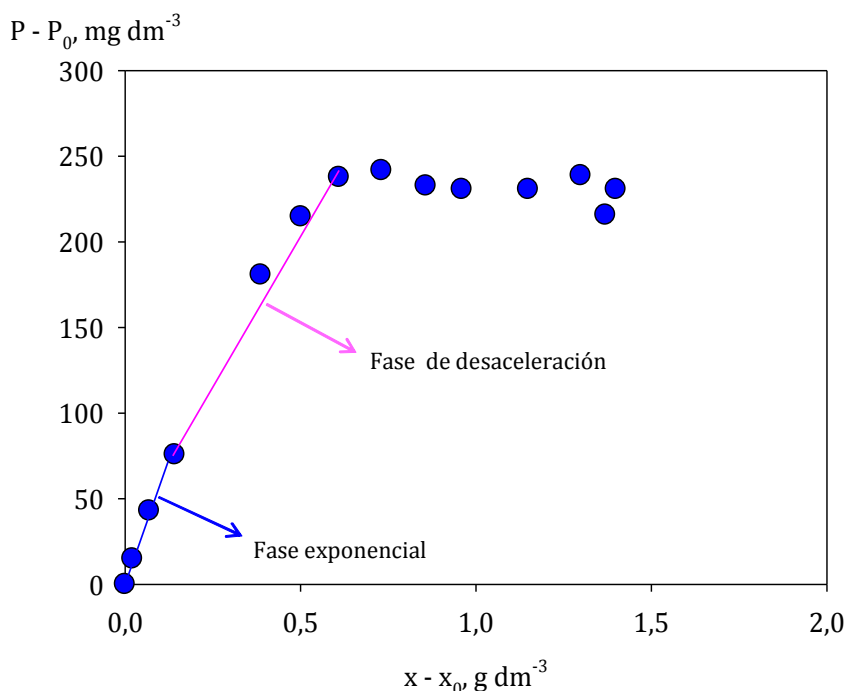


Figura 5.38 Relación entre la concentración neta de proteínas (●) y la concentración de biomasa neta producida usando *C. pyrenoidosa* en el cultivo con medio R-L, y a nivel de aeración 1,5 v/v/min, Exp. 15 RL.

Se ha detectado que a medida que el nivel de aeración aumenta de 0 a 1,5 v/v/min, los valores de q_p , y P_p se incrementan. Se ha observado influencia directa del nivel de aeración sobre la formación de proteínas, Tabla 5.17.

Tabla 5.17. Velocidades específicas máximas y productividades volumétricas en proteínas a nivel de aeración, en cultivos de *C. pyrenoidosa* en medio Rodríguez-López

Q v/v/min	q_p (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	P_p 10 (mg dm ⁻³ h ⁻¹)
0,0	-	1,51 ± 0,11
0,5	8,73 ± 0,48	6,90 ± 0,35
1,0	19,9 ± 0,7	7,67 ± 0,91
1,5	20,3 ± 0,7	8,47 ± 0,11

También los valores de proteína cruda determinada al final del cultivo, %P_{Cruda}, junto con la desviación estándar correspondiente se ha calculado para los cuatro niveles de aeración, Tabla 5.18. Se observó que, %P_{Cruda} aumentó ligeramente con el nivel de aeración, determinándose el valor más alto, 46,1%, a 1,5 v/v/min.

Tabla 5.18. Porcentajes en proteínas crudas, a nivel de aeración, en cultivos de *C. pyrenoidosa* en medio Rodríguez-López

Q v/v/min	0,0	0,5	1,0	1,5
P _{Cruda} (%)	41,7 ± 0,2	42,5 ± 0,8	44,7 ± 0,0	46,1 ± 0,1

En este punto, cabe destacar que el %P_{Cruda} aumenta con Q al igual que ocurre con q_p y P_p . En relación con la proteína cruda, también es necesario tener en cuenta lo indicado por Becker (1994), que expresa que es un parámetro con cierto error y que no refleja de forma apropiada el contenido real de proteínas que considera nitrógeno no proteico de la célula que forma parte de ácidos nucleicos, amidas, glucosamidas u otros componentes de la pared celular.

c) Lípidos totales y ácidos grasos

Al final de los experimentos de esta serie, la biomasa fue separada y se determinó el contenido de lípidos totales. A partir de la fracción lipídica de la biomasa se ha determinado su composición en ácidos grasos. Estos ácidos grasos han sido agrupados en saturados (SAT), monoinsaturados (MON), poliinsaturados (POL), esenciales (ESE), y ácidos grasos superiores poliinsaturados n-3 (AGSP); también se ha calculado la relación n3/n6.

Se ha observado que el porcentaje de lípidos totales aumenta con el nivel de aeración en el rango 0,0 a 1,0 v/v/min, y luego disminuye a nivel 1,5 v/v/min. En términos de contenido total de lípidos, la biomasa de *C. pyrenoidosa* alcanzó un 48,8% en cultivos con nivel de aeración de 1,0 v/v/min, Figura 5.39.

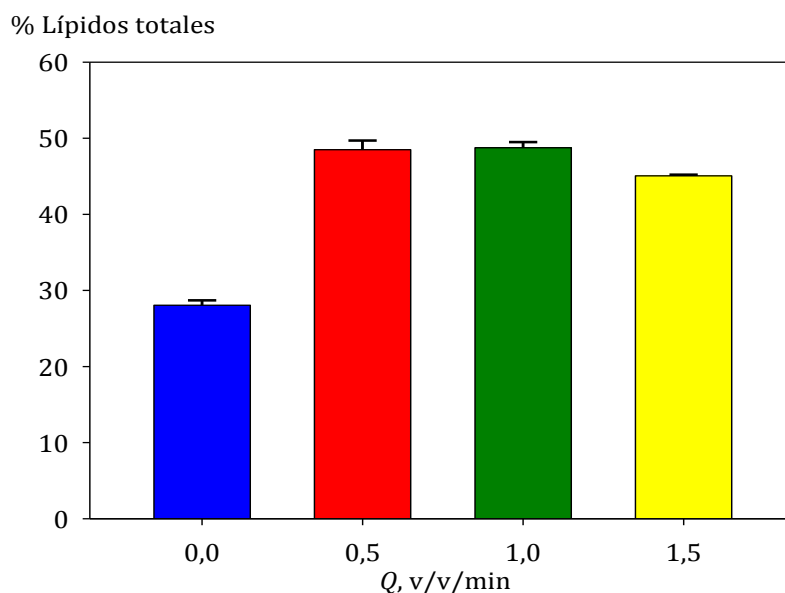


Figura 5.39 Contenido de lípidos totales al final de cada experimento, con *C. pyrenoidosa* en cultivos con medio R-L, a nivel de aeración 0,0 (■), 0,5 (■), 1,0 (■), y 1,5 (■) v/v/min.

Cabe señalar que los mayores contenidos en lípidos totales en *C. pyrenoidosa* se determinan a niveles de aeración intermedios, 0,5 y 1,0 v/v/min. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Li *et al.* (2008b), Se ha reportado que las células con alto contenido de lípidos totales se producen en condiciones de estrés fisiológico.

En todos los cultivos y al final del experimento, el perfil de ácidos grasos de la fracción lipídica de la biomasa fue determinado. A partir de los cromatogramas similares al que se muestra, se han calculado, los porcentajes de ácidos grasos obtenidos en la fracción lipídica de la biomasa.

A partir de los resultados se observó que con niveles de aeración 0,0 y 1,5 v/v/min el ácido graso más abundante fue el linolénico (18:3n3), con 34,1% y 36,8, respectivamente. El ácido graso de mayor concentración con nivel de 0,5 v/v/min fue linoleico (18:2n6) con 25,9%. Por otra parte, a 1,0 v/v/min el ácido oleico (18:1), presentó el máximo contenido, 35,2%. Otros POL identificados fueron: 18:2n3, 18:4n3, 20:2n6, 20:5n3 y 22:5n3, (Tablas C25 a C48, Anexo C).

El mayor porcentaje en la fracción de SAT (%), se determinó en el cultivo con nivel de aeración 1,5 v/v/min. Sin embargo, la fracción de MON (%), fue más alta a 1,0 v/v/min. El mayor porcentaje se registró en la fracción de POL (%), siendo el valor medio más alto detectado 52,0%, obtenido en el cultivo con 0,5 v/v/min. Al igual que con las anteriores fracciones, los porcentajes de ESE y AGSP no presentan una tendencia definida de variación con el nivel de aeración, Tabla 5.19.

Estos resultados son muy próximos a los obtenidos con *C. vulgaris* (microalga de características muy parecida a *C. pyrenoidosa*) cuando se cultivó en un medio sintético, a 25°C, un nivel de aeración de 0,625 v/v/min y 0,29 %CO₂, Melinda *et al.* (2012); estos autores determinan 23,5% de SAT, 49,0% de MON, 27,2% de POL y 30,3% de ESE.

Tabla 5.19. Composición en ácidos grasos de la fracción lipídica de *C. pyrenoidosa* en cultivo con medio R-L, a diferentes niveles de aeración

Q v/v/min	SAT	MON	POL	ESE	AGSP	n3/n6
0,0	35,9 ± 0,1	21,7 ± 0,2	43,1 ± 0,1	38,5 ± 0,2	0,457 ± 0,0	26,3 ± 0,9
0,5	22,4 ± 0,0	22,7 ± 0,1	52,0 ± 0,1	44,7 ± 0,1	0,262 ± 0,2	0,73 ± 0,7
1,0	21,6 ± 0,4	37,7 ± 0,6	37,2 ± 0,5	29,2 ± 0,5	0,161 ± 0,5	1,32 ± 0,0
1,5	38,3 ± 0,0	19,9 ± 0,3	46,1 ± 0,5	42,3 ± 0,8	0,390 ± 0,6	18,5 ± 0,2

Cabe destacar que la relación n3/n6 presenta valores muy elevados en condiciones extremas del nivel de aeración.

d) Composición elemental de la biomasa

El análisis de la composición elemental se realizó a la biomasa seca obtenida al final de cada experimento. También, se ha determinado la relación C/N.

A partir de los resultados, el contenido de carbono fue más alto en todos los niveles de aeración, siendo el valor más alto (50,1%) a 1,5 v/v/min, y el mínimo (48,1%) a 0,0 v/v/min. La biomasa procedente de cultivos a nivel 1,5 v/v/min contenía el mayor porcentaje de nitrógeno y azufre 7,4% y 0,71%, respectivamente. El contenido más elevado de hidrógeno 6,89%, se obtuvo a 1,0 v/v/min, mientras que el oxígeno fue 38,6% sin suministro de aire. Por otra parte, la relación C/N más elevado (7,21) fue a nivel de aeración 0,0 v/v/min. A título de ejemplo se muestra el análisis elemental de la biomasa seca de *C. pyrenoidosa* obtenida a 1,5 v/v/min, Figura 5.40.

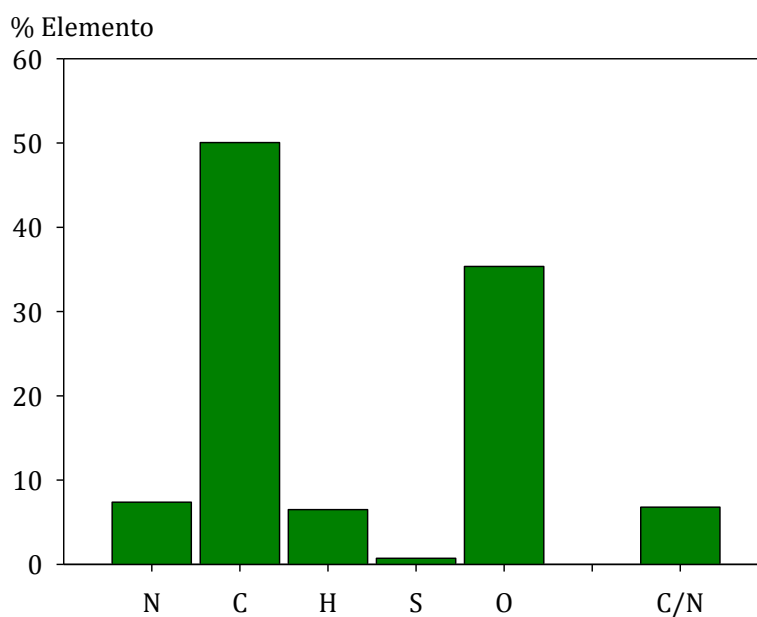


Figura 5.40 Composición elemental de la biomasa de *C. pyrenoidosa* determinada al final de los cultivos, en el medio R-L, a nivel de aeración 1,5 v/v/min, Exp. 15 RL.

5.4 CULTIVOS DE *Chlorella pyrenoidosa* EN AGUAS RESIDUALES

En este apartado se ha abordado el estudio de la utilización de los diferentes tipos de aguas residuales de almazara como medio nutriente para el crecimiento de *C. pyrenoidosa* fijando las variables de operación temperatura (25°C) y velocidad específica de suministro de aire (1,0 v/v/min) que condujeron a una mayor producción de biomasa y a una composición físico-química enriquecida en lípidos. Por otra parte, se ha tratado de mejorar el medio nutriente utilizando conjuntamente aguas residuales de almazaras y urbanas procedentes de tratamiento secundario. Finalmente, en los medios de cultivos con aguas residuales que has conducido a los mejores resultados, de tipo cinético y de composición, se ha estudiado la influencia de la concentración de CO₂ (en la fase gas que se introduce en el fotobiorreactor) en el rango de 1,0 a 15,0 v/v/min.

Al igual que en el apartado anterior, la cuantificación del crecimiento celular se ha llevado a cabo mediante dos parámetros cinéticos:

- 1- Velocidad específica máxima de crecimiento.
- 2- Productividad volumétrica en biomasa.

Para la determinación de la composición de la biomasa, y sus variaciones durante los cultivos, se han calculado los valores de las concentraciones en biomasa, número de células, pigmentos (clorofilas y carotenoides totales) y proteínas. Así mismo, se ha determinado los valores de las velocidades específicas y productividades en clorofilas totales, y en carotenoides totales. También, se ha determinado las velocidades específicas, y las productividades de formación de proteínas. Además, al final de los cultivos, se ha determinado el contenido total en lípidos, el perfil en ácidos grasos de la fracción lipídica de la biomasa y la composición elemental de la biomasa. Finalmente, a partir del análisis elemental de la biomasa, se ha podido calcular el porcentaje de proteínas crudas.

5.4.1 Utilizando aguas residuales de lavado de aceitunas

En esta serie se ha estudiado el uso de diferentes concentraciones de aguas de lavado de aceitunas (5, 10, 20, 30, 50 y 100%) como medio nutriente para el crecimiento de *C. pyrenoidosa* en cultivos llevados a cabo en fotobiorreactores discontinuos, tipo tanque agitado, a 25°C y un nivel de aeración de 1,0 v/v/min.

Los resultados experimentales correspondientes al estudio de la utilización de las aguas de lavado de aceitunas como medio de cultivo, se recogen en las Tablas D.1 a D.36 y sus representaciones gráficas en las Figuras D.1 a D.12 (Anexo D).

5.4.1.1 Producción de biomasa

A través de los resultados experimentales, se calcularon los valores de concentración de biomasa, el número de células por unidad de volumen y los datos utilizados para la representación gráfica frente al tiempo, que permitieron obtener las curvas de crecimiento y establecer la duración de la fase exponencial, tal como se indica a título de ejemplo para tres cultivos de esta serie en la Figura 5.41.

En general, en los cultivos de esta serie se ha observado fase de adaptación; la de mayor duración tiene lugar en los cultivos con 5 y 50% de agua residual. Por otra parte, también cabe destacar que la concentración máxima de biomasa alcanzada al final del experimento aumentó cuando en el cultivo se incrementó el porcentaje de 5 a 30%, y luego disminuyó. El valor más alto fue 0,571 g dm⁻³ usando 30% de agua residual como medio de cultivo, Tabla. 5.20.

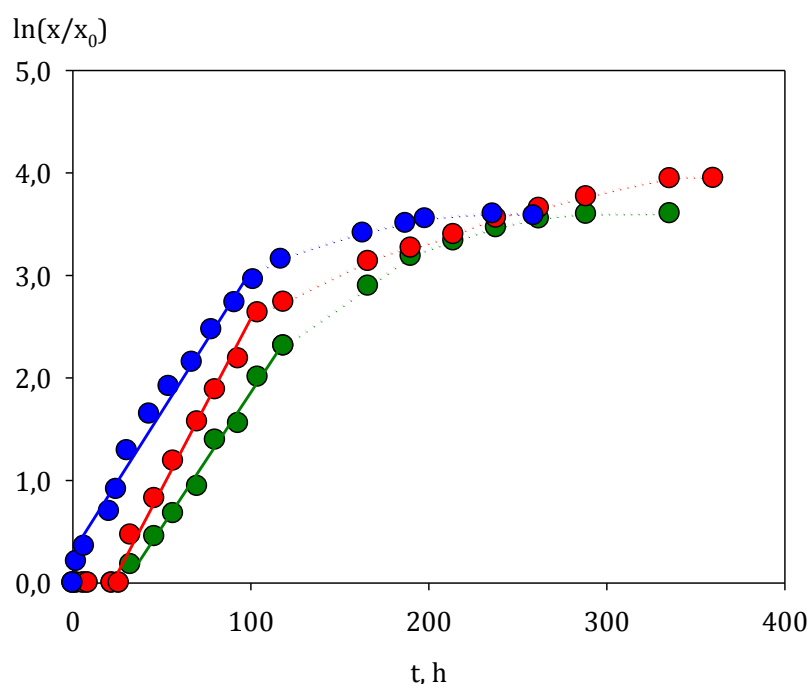


Figura 5.41 Curvas de crecimiento de *C. pyrenoidosa*, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas con 5% (●), 50% (●), 100% (●), a 25°C y nivel de aeración de 1 v/v/min, en los experimentos 1 ALF, 9 ALF, 12 ALF.

Se puede observar que los valores máximos experimentales de μ_m y P_b se han alcanzado en medios de cultivos con 50% de aguas de lavado de aceitunas. Con esta concentración, μ_m es $0,036 \text{ h}^{-1}$ y P_b $2,22 \cdot 10^{-3} \text{ g dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$, Tabla 5.20.

Tabla 5.20. Concentraciones de biomasa más elevadas, velocidades específicas máximas de crecimiento y productividades de biomasa, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas

EXP	% ALF (v/v)	$x_{\max}$ (g dm^{-3})	μ_m (h^{-1})	$P_b \cdot 10^3$ ($\text{g dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$)
<u>1 ALF</u> <u>2 ALF</u>	5	$0,336 \pm 0,008$	$0,024 \pm 0,009$	$1,75 \pm 0,1$
<u>3 ALF</u> <u>4 ALF</u>	10	$0,410 \pm 0,053$	$0,029 \pm 0,001$	$1,80 \pm 0,1$
<u>5 ALF</u> <u>6 ALF</u>	20	$0,422 \pm 0,015$	$0,030 \pm 0,002$	$1,99 \pm 0,00$
<u>7 ALF</u> <u>8 ALF</u>	30	$0,571 \pm 0,048$	$0,032 \pm 0,006$	$2,15 \pm 0,2$
<u>9 ALF</u> <u>10 ALF</u>	50	$0,500 \pm 0,117$	$0,036 \pm 0,008$	$2,22 \pm 0,00$
<u>11 ALF</u> <u>12 ALF</u>	100	$0,478 \pm 0,024$	$0,034 \pm 0,002$	$2,10 \pm 0,3$

A partir de los resultados obtenidos, se ha observado que los valores medios de la velocidad específica máxima de crecimiento y productividad volumétrica en biomasa aumentaron conforme la proporción de agua residual fue mayor en el medio de cultivo (de 5 a 50%), y concentraciones mayores de 50% ambos parámetros empezaron a disminuir. En este punto, se puede indicar que un porcentaje del 50% de agua residual de lavado de aceitunas constituye el medio de cultivo más favorable para el crecimiento de *C. pyrenoidosa*, Figura 5.42. Estos resultados son inferiores a los obtenidos por Jaiswal y Prasath (2016) con *C. pyrenoidosa* usando como medio de cultivo aguas residuales urbanas procedentes de una residencia universitaria. Estos autores indican un crecimiento efectivo y una producción de biomasa elevada cuando

el medio de cultivo contenía una concentración superior al 50% de agua residual, alcanzándose concentraciones de biomasa de $1,369 \text{ g dm}^{-3}$ en los ensayos realizados a 25°C , fotoperiodo 12 h iluminación/12 h oscuridad y Erlenmeyer en agitador orbital. En este caso, aunque en nuestra investigación se ha usado un fotobiorreactor y condiciones de operación más controladas, el agua de lavado de aceitunas tiene menor concentración de compuestos de nitrógeno y fósforo que un agua residual urbana. Además, las aguas procedentes de almazaras contienen en mayor o menor medida compuestos fenólicos que como es bien conocido tienen carácter antioxidante y son por tanto inhibidores del crecimiento celular. Estos hechos pueden justificar esta menor concentración de biomasa en los experimentos realizados en esta investigación usando aguas residuales de lavado de aceitunas.

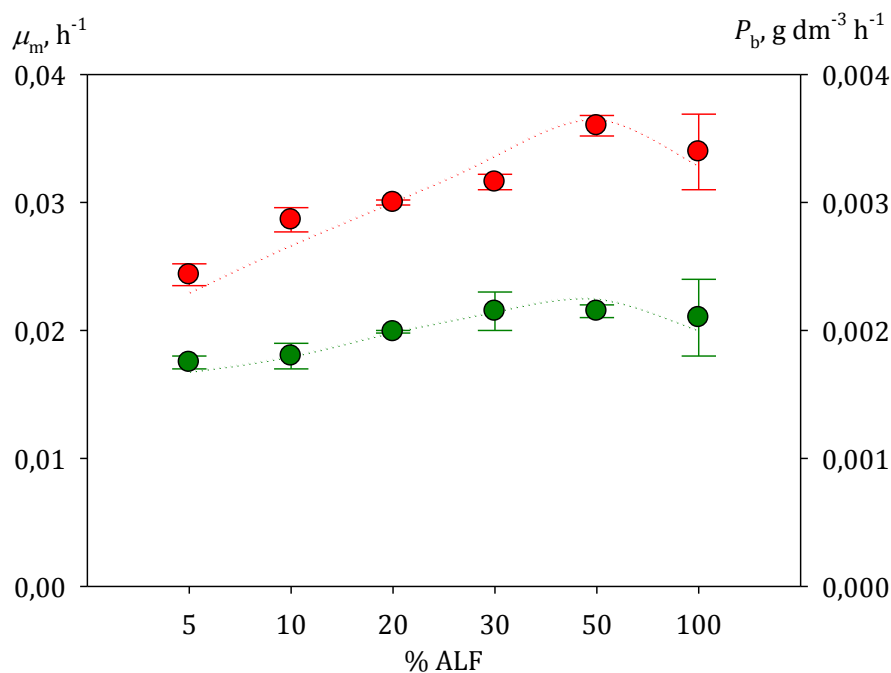


Figura 5.42 Velocidades específicas máxima de crecimiento, μ_m, h^{-1} (●), y productividades volumétricas en biomasa, $P_b, \text{g dm}^{-3} \text{h}^{-1}$ (●). Influencia de la concentración en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas (ALF).

5.4.1.2 Composición bioquímica de la biomasa

a) Pigmentos

A través de los resultados obtenidos por todos los experimentos en esta serie, se ha observado que los valores de %CHL y %Ca aumentaron en la fase exponencial y de desaceleración y luego empezaron a disminuir hasta el final del experimento. Se observó que los parámetros %CHL y %Ca, determinados al final del experimento, aumentan con la concentración de ALF en el medio de cultivo; con una concentración del 100% de ALF se obtuvo los más altos porcentajes de clorofila total, 2,4%, y carotenoides totales, 0,50%. Se detecta que en medios con mayor contenido en nitrógeno y otros nutrientes la formación de pigmentos está favorecida. Este resultado y justificación estaría de acuerdo con lo indicado de forma general por Rhees (1978), donde observó que las algas unicelulares bajo restricción de nitrógeno contienen un contenido de clorofila más bajo.

Por otra parte, también cabe destacar que los contenidos de clorofilas totales y carotenoides por célula a lo largo del cultivo presentan una evolución similar al %CHL y %Ca, excepto con el porcentaje del 5% de ALF; en estos cultivos con el 5% de ALF, los parámetros CHL/N y Ca/N disminuyen con el tiempo de cultivo, Figuras 5.43 y 5.44.

Se observó que hubo un cambio en el tamaño de la célula a medida que aumentaba la concentración del %ALF en el cultivo; estos resultados coinciden con la apreciación de Sharma *et al.* (2012) que detectan que la deficiencia de magnesio interrumpía la división celular en *C. vulgaris*, lo que originaba células de gran tamaño. Por tanto, si el número de células permanece constante y sin embargo el porcentaje de clorofilas aumenta con el tiempo, el parámetro CHL/N aumenta a lo largo del experimento, hecho que justifica lo observado experimentalmente.

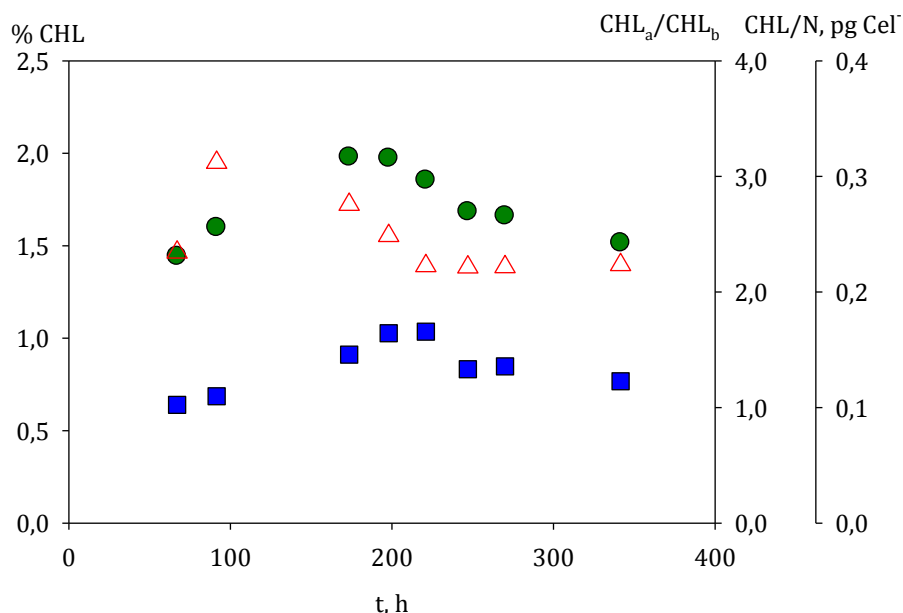


Figura 5.43 Variación del porcentaje de clorofilas totales (●), relación entre los contenidos de clorofilas 'a' y 'b' (△), y contenido de clorofilas totales por célula (■) en *C. pyrenoidosa* con el tiempo, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas al 50%, Exp. 10 ALF.

En lo referente a la relación CHL_a/CHL_b , se observó un aumento rápido durante la fase exponencial y después disminuyó de forma lenta a partir de fase de desaceleración hasta el final del cultivo. En este punto se puede indicar que, el contenido de clorofila 'a' aumentó durante la fase exponencial y después disminuyó; por otra parte, la concentración de clorofila 'b' se incrementó durante el transcurso de todo del cultivo; este hecho justifica la variación observada en la relación CHL_a/CHL_b .

El contenido de clorofila de un cultivo es un indicador de su actividad fotosintética y crecimiento. Las células de algas cultivadas bajo estrés por nitrógeno muestran un bajo contenido de clorofila, Rhee (1978).

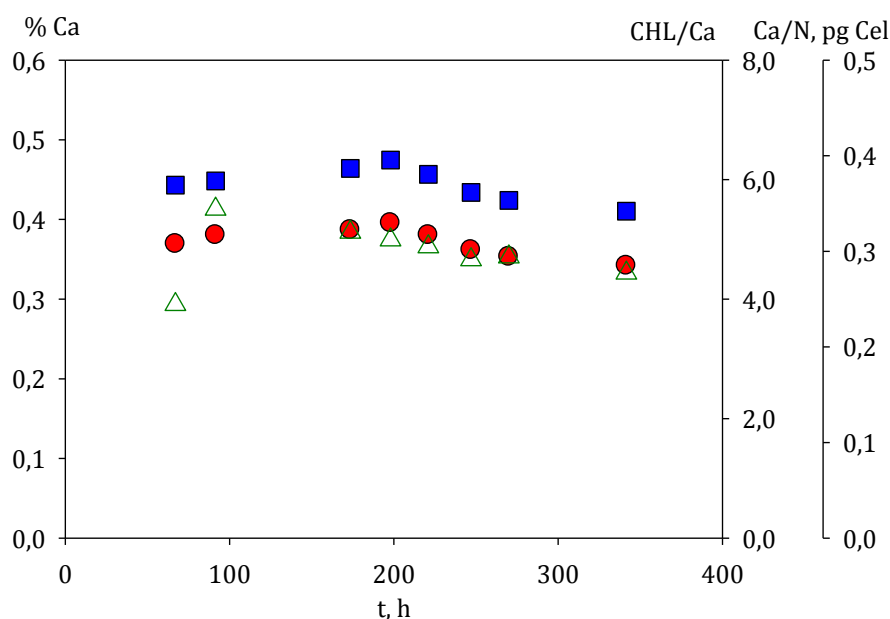


Figura 5.44 Variación del porcentaje de carotenoides totales (●), relación entre los contenidos de clorofilas y carotenoides totales (△), y contenido de carotenoides por célula (■) en *C. pyrenoidosa* con el tiempo, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas al 50%, Exp. 10 ALF.

La relación CHL/Ca en todos los experimentos, excepto a concentración 100% de ALF, aumentó a partir de las primeras horas del cultivo hasta al final de la fase exponencial, y luego disminuyó hasta el final del experimento. Como se señaló anteriormente, a medida que aumenta la concentración de ALF, aumenta el contenido de nitrógeno, fósforo y otros nutrientes, y esta modificación del medio parece afectar más positivamente a la formación de clorofilas totales que a la producción de carotenoides totales. Esto podría justificar que la relación CHL/Ca aumente con el tiempo de proceso.

En general, el ajuste de $(\text{CHL} - \text{CHL}_0)$ y $(\text{Ca} - \text{Ca}_0)$ vs $(x - x_0)$, ha sido posible en el transcurso de todo el experimento, a diferencia de lo observado en las otras series, Figura. 5.45. Por tanto, si se tiene un único ajuste se ha podido a determinar un solo coeficiente estequiométrico, α_{CHL} o α_{Ca} , para todo el cultivo. Este hecho indica que la formación de pigmentos está asociada a la formación de biomasa en todo el cultivo. Este resultado observado en esta serie del experimentos coincide con lo determinado en *B. braunii* usando la misma instalación experimental y configuración de fotobiorreactor, aunque solo se usaron aguas residuales urbanas procedentes de tratamiento secundaria, Órpez (2015).

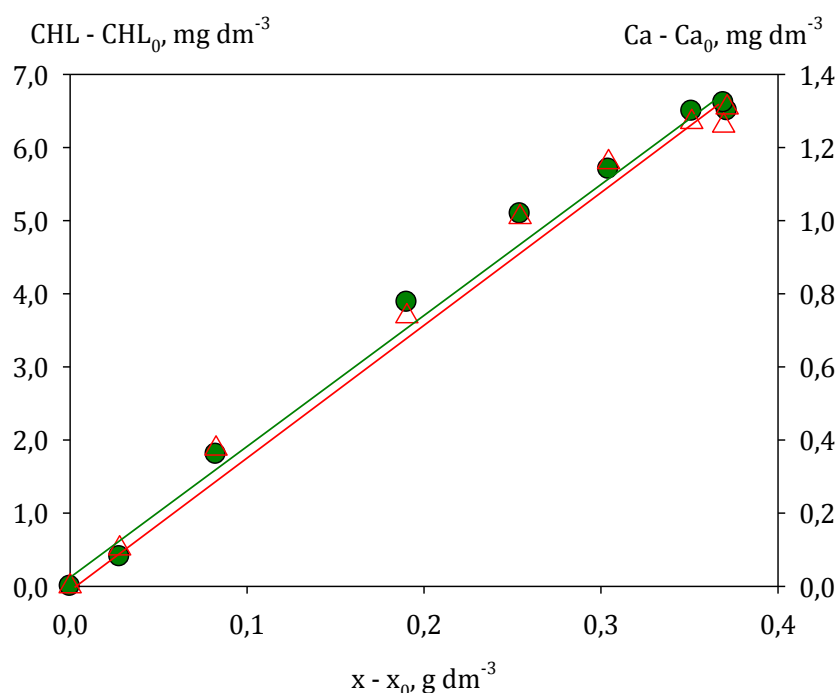


Figura 5.45 Relación entre la concentración neta de clorofilas totales (●) y carotenoides totales (△), vs concentración de biomasa neta obtenida de *C. pyrenoidosa* en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas al 50%, Exp. 10 ALF.

Este único valor de α_{CHL} o α_{Ca} permite determinar tanto la velocidad específica máxima de formación de clorofilas, o de carotenoides, como las productividades volumétricas de ambos pigmentos, Tabla 5.21. Para cada medio de cultivo (%ALF) se han realizado dos experimentos lo que ha permitido calcular el valor medio, junto con la desviación estándar correspondiente.

Tabla 5.21. Velocidades específicas máximas y productividades volumétricas en formación de clorofilas y carotenoides, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas

% ALF (v/v)	q_{CHL} ($\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	$P_{\text{CHL}} 10^2$ ($\text{mg dm}^{-3} \text{h}^{-1}$)	$q_{\text{Ca}} 10$ ($\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	$P_{\text{Ca}} 10^3$ ($\text{mg dm}^{-3} \text{h}^{-1}$)
5	$0,359 \pm 0,010$	$2,62 \pm 0,08$	$0,876 \pm 0,012$	$6,39 \pm 0,00$
10	$0,454 \pm 0,030$	$2,82 \pm 0,15$	$1,09 \pm 0,00$	$6,75 \pm 0,00$
20	$0,597 \pm 0,090$	$3,96 \pm 0,62$	$1,34 \pm 0,05$	$8,86 \pm 0,30$
30	$0,598 \pm 0,090$	$4,02 \pm 0,58$	$1,26 \pm 0,11$	$8,49 \pm 0,80$
50	$0,682 \pm 0,005$	$4,17 \pm 0,03$	$1,37 \pm 0,04$	$8,36 \pm 0,20$
100	$0,801 \pm 0,043$	$4,95 \pm 0,26$	$1,56 \pm 0,03$	$9,66 \pm 0,21$

Cabe destacar que en el cultivo con 100% de ALF se alcanzaron los valores más elevados de la velocidad específica máxima y productividad volumétrica en clorofilas y carotenoides totales.

b) Proteínas

Se observó que, usando aguas de lavado de aceitunas como medio de cultivo, el porcentaje de proteínas, %P, aumentaba durante la fase exponencial hasta la fase de desaceleración, y posteriormente comenzó a disminuir hasta el final del experimento. Figura 5.46.

Por otra parte, se ha obtenido el contenido de proteínas por célula determinándose que a concentraciones bajas de ALF (en el rango 5 a 30%) disminuía durante el transcurso de todo el experimento, mientras que a concentraciones más altas de ALF en el medio de cultivo (50 y 100%) la relación P/N aumentaba en las fases exponencial y desaceleración y posteriormente disminuía, Figura

5.46. La variación observada puede explicarse considerando que la síntesis de proteínas está relacionada con el contenido de N del medio de cultivo. El descenso continuo de P/N observado en medios con bajas concentraciones de ALF está ligado con la disminución exhaustiva de N en el medio.

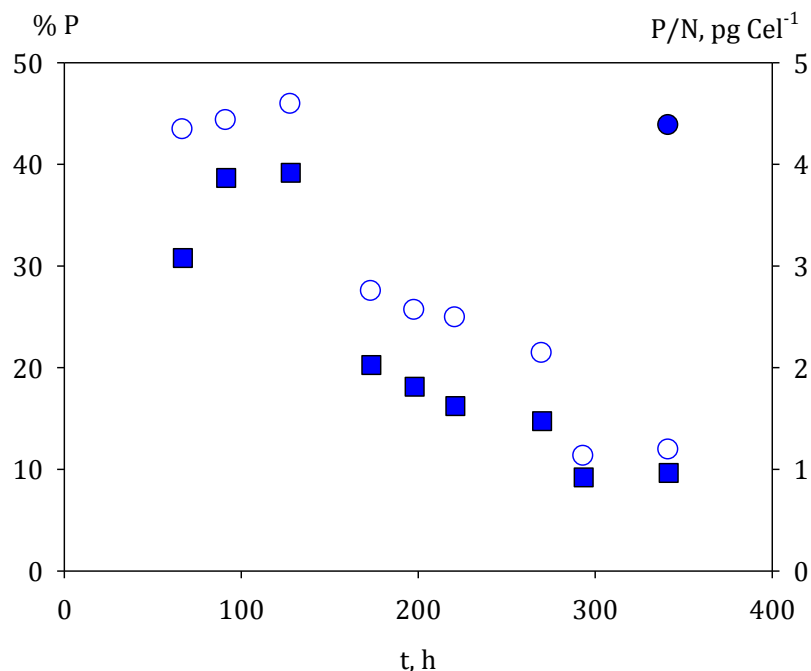


Figura 5.46 Variación del porcentaje de proteínas (○), y contenido de proteínas por célula (■) con el tiempo en *C. pyrenoidosa*, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas al 50%. Contenido de proteína cruda al final del cultivo (●), Exp. 10 ALF.

A diferencia de lo observado en los pigmentos, los ajustes obtenidos en las representaciones de (P-Po) vs (x-xo) han sido aceptable en todos los cultivos, considerando por separado las fases exponencial y de desaceleración, y ello ha permitido determinar los coeficientes estequiométricos, α_p , en ambas fases. En esta serie de experimentos en los que se ha usado como medio de cultivo aguas de lavado de aceitunas, esta apreciación sobre α_p permite justificar que la formación de proteínas está asociada al crecimiento al menos en la fase exponencial, Figura 5.47. A partir de estos valores de α_p se ha podido calcular las velocidades específicas máximas y productividades volumétricas de formación de proteínas.

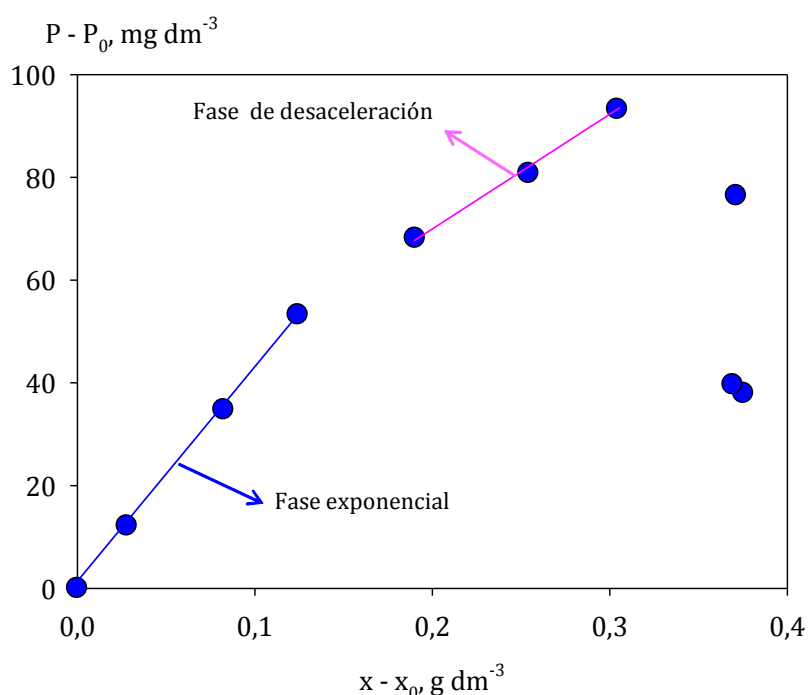


Figura 5.47 Relación entre la concentración neta de proteínas (●) y la concentración de biomasa neta producida usando *C. pyrenoidosa* en cultivos realizados con aguas de lavado de aceitunas al 50%, Exp. 10 ALF.

En general, se ha detectado que a medida que la concentración de ALF en el medio de cultivo aumentaba de 5 a 100%, no se observa una tendencia definida en los valores de q_p y P_p . Por tanto, no se ha observado influencia directa de la concentración del ALF sobre la formación de proteínas, Tabla 5.22.

Tabla 5.22. Velocidades específicas máximas y productividades volumétricas en proteínas en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas con *C. pyrenoidosa*

% ALF (v/v)	q_p (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	P_p (mg dm ⁻³ h ⁻¹)
5	13,6 ± 0,4	0,497 ± 0,089
10	11,1 ± 0,2	0,596 ± 0,173
20	12,3 ± 0,3	0,358 ± 0,128
30	13,7 ± 0,5	0,422 ± 0,045
50	14,9 ± 0,2	0,480 ± 0,231
100	14,6 ± 0,2	0,450 ± 0,121

También los valores medios de proteína cruda determinada al final del cultivo, % P_{Cruda} , junto con la desviación estándar correspondiente se ha calculado para las concentraciones de ALF ensayadas. No se ha observado una tendencia definida cuando se modificó el porcentaje del ALF en el medio de cultivo, Tabla 5.23, registrándose valores promedios en el rango 44,2-46,0%.

Tabla 5.23. Porcentajes en proteína cruda, en cultivos de *C. pyrenoidosa* en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas

% ALF (v/v)	5	10	20	30	50	100
P_{Cruda} (%)	45,1 ± 0,6	44,2 ± 0,4	46,0 ± 0,2	44,8 ± 0,03	44,4 ± 0,5	45,9 ± 0,1

c) Lípidos totales y ácidos grasos

Al final de todos los experimentos de esta serie, se alcanzó la fase estacionaria, la biomasa fue recolectada y se determinó el contenido de lípidos totales. A partir de la fracción lipídica de la biomasa se ha determinado su composición en ácidos grasos.

Se ha observado que el porcentaje de lípidos totales aumenta con la concentración de ALF. El valor más alto fue 48,0% en cultivo 100% de las aguas lavado de aceitunas, Figura 5.48. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en estudios previos en los que las microalgas se cultivaron bajo condiciones de estrés, tales como alta concentración de OMW, limitación de nitrógeno y fosfato o alta salinidad. En condiciones de estrés, la formación de lípidos está favorecida ya que estos son compuestos de almacenamiento preferidos debido a su estado altamente reducido y se empaquetan en las células y son claves para la supervivencia de las microalgas (He *et al.* 2015; Wang *et al.* 2015; Yao *et al.* 2015 y Pruvost *et al.* 2011).

En general, existe una relación inversa entre el contenido de lípidos totales y la concentración nitrógeno, Gouveia y Oliveira (2009).

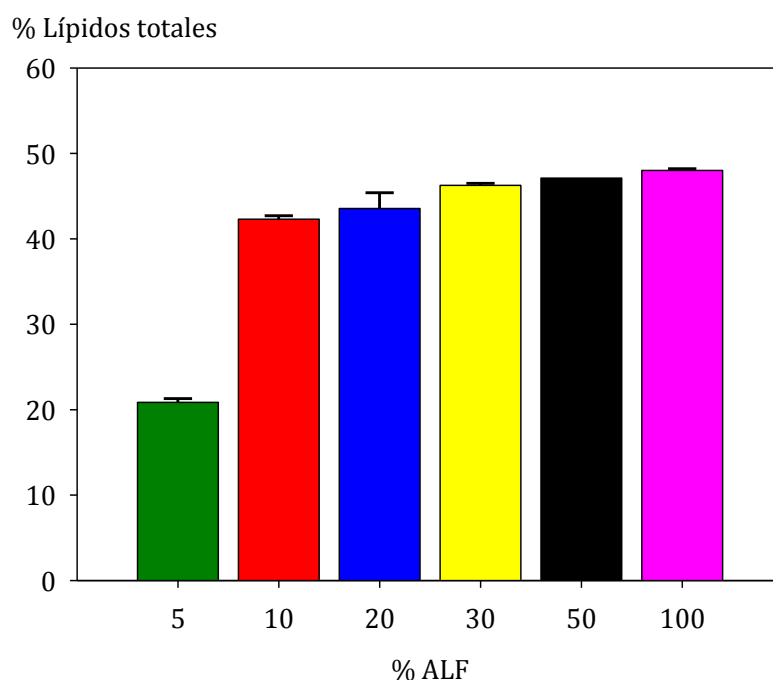


Figura 5.48 Contenido de lípidos totales al final de cada experimento, con *C. pyrenoidosa* en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas en concentraciones de 5 (■), 10 (■), 20 (■), 30 (■), 50 (■), 100% (■).

A partir de los resultados se observó que con las diferentes concentraciones de ALF, el ácido graso más abundante fue linolénico (18:3n3). Otros ácidos grasos poliinsaturados identificados fueron: 18:2n3, 18:4n3, 20:2n6, 20:5n3 y 22:5n3, (Tablas D.1 a D.36, Anexo D).

A partir de los cromatogramas similares al que se muestra, se ha observado que la fracción de ácidos grasos saturados disminuye con la concentración de ALF. Se detectó el valor más alto de MON 14,6% en cultivos con 100% de ALF, destacando que el ácido oleico (18:1) presentaba el más alto porcentaje. Por otra parte, la fracción de poliinsaturados presenta el valor más alto en todos los experimentos; en concentración al 10% de ALF fue 47,2%. Al igual que con las anteriores fracciones, el porcentaje de AGSP no presenta una tendencia definida con las concentraciones de ALF. El valor más alto de la relación n3/n6 fue 1,97 a concentración 30% de ALF; este valor está próximo al rango donde se considera que la biomasa

tiene cierto valor nutricional. En este sentido, la bibliografía indica que la biomasa producida en el cultivo puede tener una aceptable calidad nutricional si la relación $n3/n6$ está en el rango 2-5, Webb y Chu (1982), Tabla 5.24.

Tabla 5.24. Composición en ácidos grasos de la fracción lipídica de *C. pyrenoidosa* en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas, a diferentes concentraciones

%ALF	SAT	MON	POL	ESE	AGSP	n3/n6
5	30,4 ± 0,3	12,5 ± 0,3	43,4 ± 0,1	38,9 ± 0,7	0,145 ± 0,1	1,65 ± 0,02
10	29,0 ± 0,3	12,7 ± 0,1	47,2 ± 0,5	41,3 ± 0,6	0,918 ± 0,7	1,41 ± 0,03
20	28,8 ± 0,3	12,6 ± 0,5	45,5 ± 0,1	39,7 ± 0,7	1,39 ± 0,7	1,39 ± 0,01
30	28,6 ± 0,1	13,8 ± 0,2	42,4 ± 0,6	38,4 ± 0,5	0,764 ± 0,1	1,97 ± 0,02
50	28,5 ± 0,2	14,3 ± 0,1	41,7 ± 0,1	34,7 ± 0,1	0,447 ± 0,0	1,23 ± 0,01
100	26,7 ± 0,3	14,6 ± 0,1	46,4 ± 0,6	41,4 ± 0,5	0,330 ± 0,0	1,26 ± 0,01

Los componentes del medio del cultivo y condiciones experimentales tienen un impacto importante y esencial en la formación de los ácidos grasos. Tal como se ha indicado, el medio de cultivo usado contenía poca concentración de compuestos de nitrógeno, y fósforos lo que afecta al contenido de ácidos grasos.

La disponibilidad inicial de N en el medio sintético de control fue de 140 mg dm⁻³, Rodríguez-López, (1964). Este hecho indicó que todos los experimentos en esta serie se realizaron bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno.

d) Composición elemental de la biomasa

Cabe indicar que en todos los cultivos se registraron diferencias en la composición elemental de la biomasa recolectada, siendo el porcentaje de nitrógeno muy bajo. Este hecho se puede justificar considerando que el medio con aguas de lavado de aceitunas tiene menor concentración de fuente de nitrógeno (Tablas 5.2 y 5.4) y por lo tanto las células han podido asimilar menos N. El porcentaje más alto en la biomasa de *C. pyrenoidosa* correspondió al 'C', mientras que el 'S' fue el de menor contenido, Figura 5.48. No se observó una diferencia en el contenido de nitrógeno entre los medios de cultivos, y este hecho ha conducido a que la relación C/N estuviese en el rango 6,25-6,75.

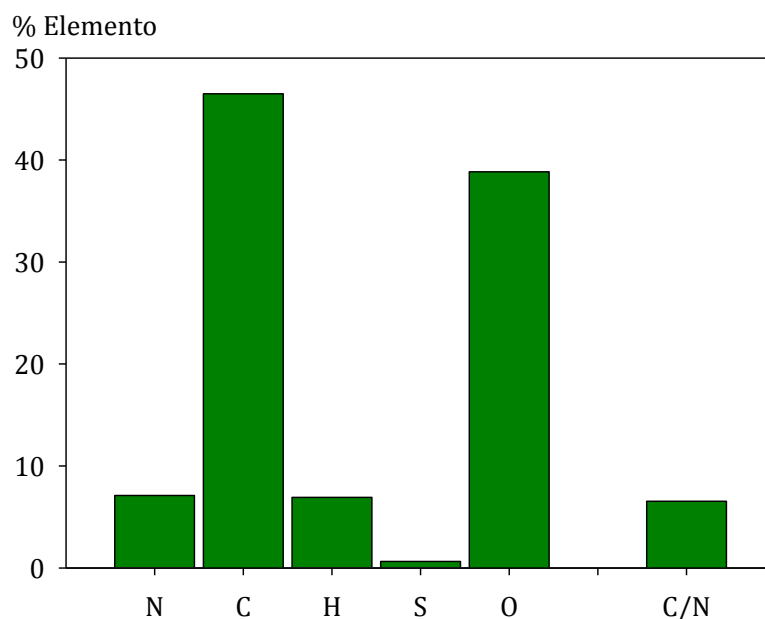


Figura 5.48 Composición elemental de la biomasa de *C. pyrenoidosa* determinada al final de los cultivos, en experimentos realizados usando aguas de lavado de aceitunas de concentración 50%, Exp. 10 ALF.

5.4.2 Usando aguas residuales de lavado de aceites

En esta serie se ha estudiado el uso de diferentes concentraciones de aguas de lavado de aceites (5, 10, 20, 30, 50 y 100%) como medio nutriente para el crecimiento de *C. pyrenoidosa*. Los resultados experimentales correspondientes al estudio, se recogen en las Tablas D.36 a D.72 y sus representaciones gráficas en las Figuras D.12 a D.24 (Anexo D).

5.4.2.1 Producción de biomasa

Inicialmente, se han obtenido las curvas de crecimiento para los experimentos 1 ALA, 7 ALA, 11 ALA. En los cultivos de esta serie se detecta fase de adaptación en el medio de cultivo con concentraciones 10, 20 y 30% de %ALA, Figura 5.49. Estos resultados ya indican que la concentración de %ALA como medio de cultivo tiene un efecto directo en el crecimiento.

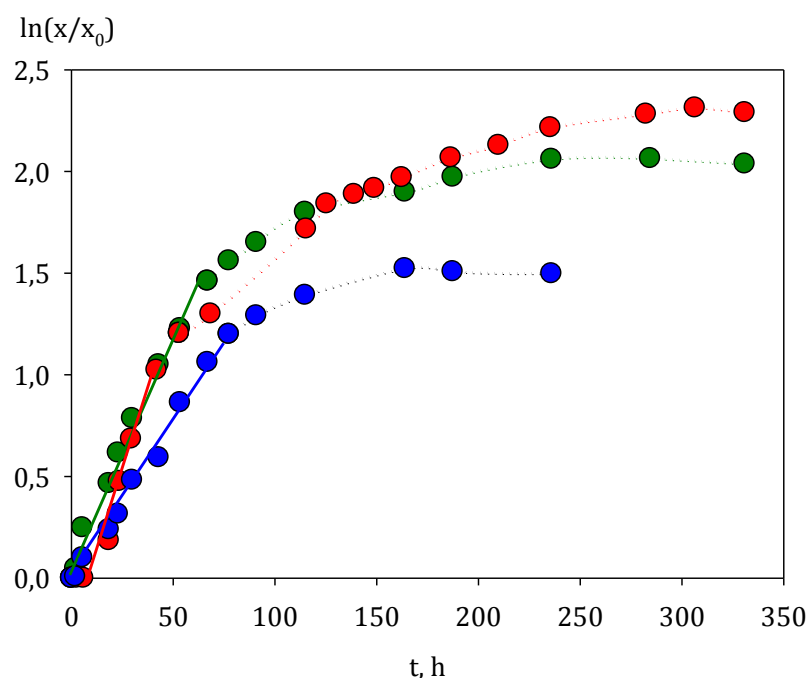


Figura 5.49 Curvas de crecimiento de *C. pyrenoidosa*, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites con 5% (●), 30% (●), 100% (●), a 25°C y nivel de aeración de 1 v/v/min, en los experimentos 1 ALA, 7 ALA, 11 ALA.

En relación a la formación de biomasa, y en experimentos con replica, los valores medios de la concentración de biomasa más elevada, velocidad específica máxima de crecimiento y productividad volumétrica en biomasa, junto con los valores de la desviación estándar correspondiente, fueron calculados en cada cultivo, Tabla 5.25.

Tabla 5.25. Concentraciones de biomasa más elevadas, velocidades específicas máximas de crecimiento y productividades de biomasa, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites

EXP	% ALA (v/v)	x_{max} (g dm ⁻³)	μ_m (h ⁻¹)	$P_b 10^3$ (g dm ⁻³ h ⁻¹)
<u>1 ALA</u> <u>2 ALA</u>	5	0,278 ± 0,015	0,021 ± 0,001	1,01 ± 0,01
<u>3 ALA</u> <u>4 ALA</u>	10	0,254 ± 0,030	0,025 ± 0,001	1,30 ± 0,10
<u>5 ALA</u> <u>6 ALA</u>	20	0,243 ± 0,037	0,027 ± 0,008	1,40 ± 0,00
<u>7 ALA</u> <u>8 ALA</u>	30	0,218 ± 0,013	0,028 ± 0,003	1,40 ± 0,30
<u>9 ALA</u> <u>10 ALA</u>	50	0,196 ± 0,005	0,023 ± 0,002	1,05 ± 0,05
<u>11 ALA</u> <u>12 ALFA</u>	100	0,174 ± 0,029	0,019 ± 0,004	0,750 ± 0,150

A partir de los resultados obtenidos, los valores medios de μ_m y P_b aumentaron de 5 a 30% de ALA, y luego ambos parámetros empezaron a disminuir. En este punto, se puede indicar que experimentalmente el 30% es la concentración más favorable para el crecimiento de *C. pyrenoidosa* con el medio de ALA, Figura 5.50.

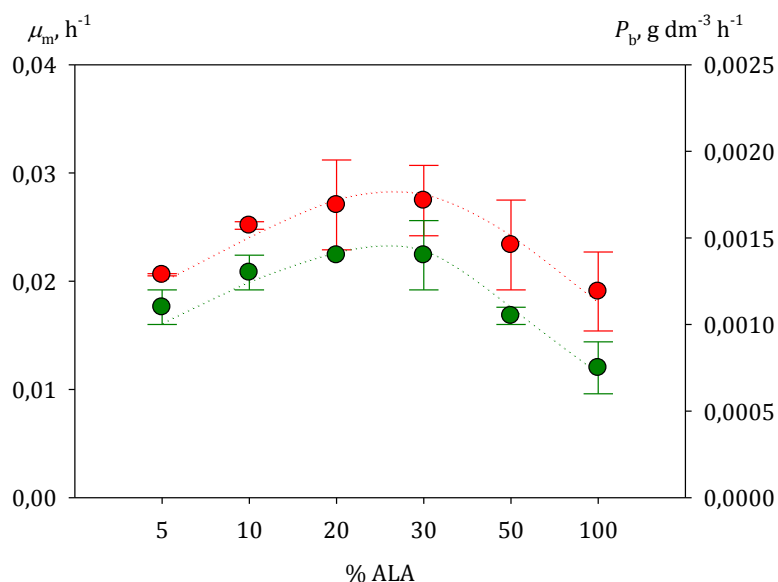


Figura 5.50 Velocidades específicas máxima de crecimiento, μ_m , h^{-1} (●), y productividades volumétricas en biomasa, P_b , $g\ dm^{-3}\ h^{-1}$ (●). Influencia de la concentración en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites (ALA).

En este caso, a pesar del uso de condiciones de operación más controladas, el agua de lavado de aceite tiene una baja concentración de compuestos de nitrógeno y fósforo; además, contiene mayor contenido de compuestos fenólicos en comparación con las aguas residuales urbanas. Como es bien conocido los compuestos fenólicos son antioxidantes y, por lo tanto, inhiben el crecimiento celular. Este hecho puede inducir a pensar que la concentración del 30% del agua de lavado de aceite en todos los experimentos realizados en esta investigación es el nivel máximo que fue capaz de soportar *C. pyrenoidosa* en las condiciones de operación ensayadas; a concentraciones superiores, los efectos de inhibición son más acusados.

Cabe indicar que, el medio de cultivo utilizado contenía poca concentración de fuente de nitrógeno e ión fosfato; estos compuestos afectan en forma directa en el crecimiento. El crecimiento está influenciado por el contenido de nutrientes del medio de cultivo, especialmente la relación entre N: P; en este sentido la bibliografía indica que la relación óptima es 8:1 si se desea un crecimiento mayor de microalgas del género *Chlorella*, Aslan y Hepdan (2006). Por otra parte, tal como se ha indicado, la concentración de compuestos fenólicos tiene un claro efecto inhibitorio en el crecimiento de *C. pyrenoidosa*.

5.4.2.2 Composición bioquímica de la biomasa

a) Pigmentos

A partir de los resultados obtenidos, se observó que los valores de %CHL y %Ca aumentaron en las fases exponenciales y de desaceleración del crecimiento, y luego comenzaron a disminuir hasta el final del experimento, excepto que a bajas concentraciones de ALA (5 y 10%) estos contenidos aumentaron ligeramente durante todo el cultivo, Figuras 5.51 y 5.52. Cabe señalar que los valores de %CHL presenta una variabilidad diferente para cada concentración de ALA. Cabe indicar que, el porcentaje de clorofilas totales en *C. pyrenoidosa* se encuentra en el intervalo de 0,5 a 1,5%, dependiendo de las condiciones de cultivo. Por otro lado, también se debe tener en cuenta que los contenidos totales de clorofilas y carotenoides por célula aumentaron durante el transcurso del experimento. Se observó que el contenido de clorofilas aumentaba con las concentraciones de aguas de lavado de aceites, ya que se incrementaba el

contenido de magnesio en el medio responsable de la formación de clorofilas en las células. En este sentido, cabe indicar que el ión Mg^{2+} tiene un papel clave en la agregación de ribosomas en unidades funcionales y para la formulación de catalasa, Finkle y Appleman (1953).

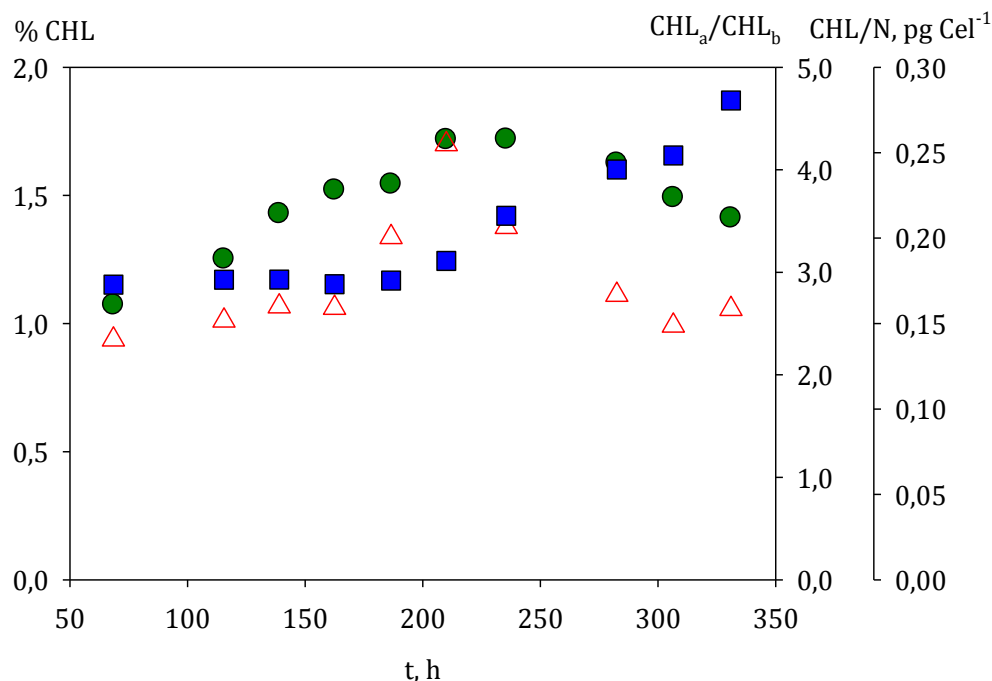


Figura 5.51 Variación del porcentaje de clorofilas totales (●), relación entre los contenidos de clorofilas 'a' y 'b' (△), y contenido de clorofilas totales por célula (■) en *C. pyrenoidosa* con el tiempo, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites al 30%, Exp. 7 ALA.

Por otro lado, se determinó que los contenidos de clorofila 'a' son más elevados que los de clorofila 'b' cuando se usan ALA como medio nutriente, observándose que la relación CHL_a/CHL_b , presentó un valor máximo en los cultivos con concentración 100% de ALA. Por otra parte, se ha detectado que la relación CHL/Ca en los cultivos fue diferente para cada concentración de %ALA usada como medio nutriente. En los cultivos con 5 y 10% de ALA, la relación CHL/Ca aumentó durante el transcurso de todo el experimento. Sin embargo, con otras concentraciones la relación fue alta en la fase exponencial permaneciendo prácticamente constante en la fase de desaceleración.

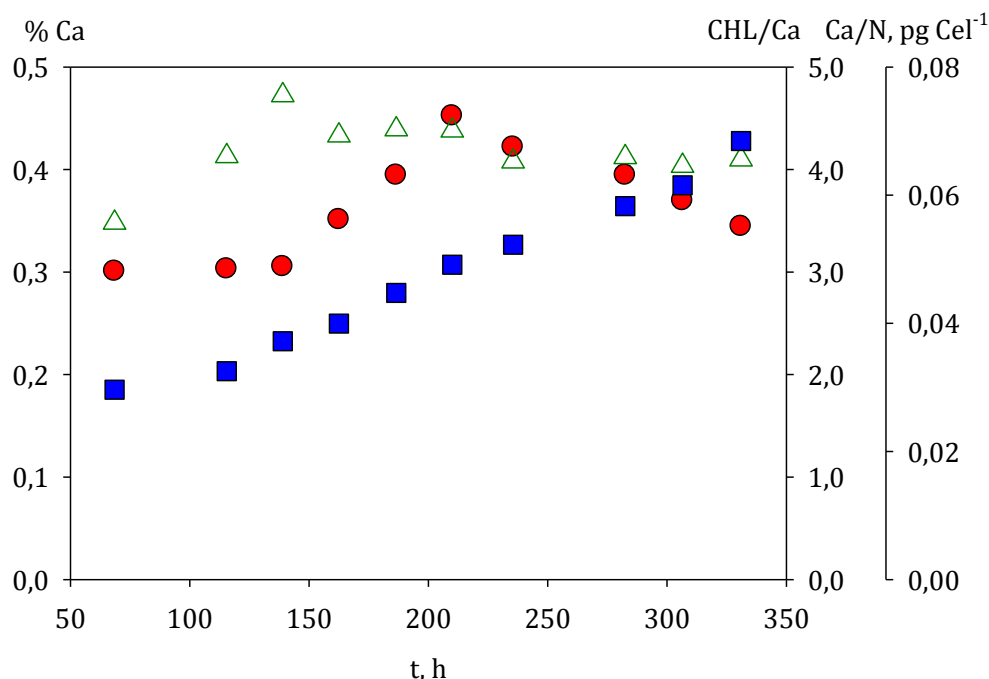


Figura 5.52 Variación del porcentaje de carotenoides totales (●), relación entre los contenidos de clorofilas y carotenoides totales (△), y de carotenoides por célula (■) en *C. pyrenoidosa* con el tiempo, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites al 30%, Exp. 7 ALA.

En general, el ajuste de los datos de $(\text{CHL} - \text{CHL}_0)$ y $(\text{Ca} - \text{Ca}_0)$ vs $(x - x_0)$, ha sido posible en el transcurso de todo el experimento, Figura. 5.53. Por ello, se ha llevado a cabo un único ajuste que ha permitido determinar un solo coeficiente estequiométrico, α_{CHL} o α_{Ca} , para todo el cultivo. Este hecho sobre los coeficientes estequiométricos permite justificar que la formación de pigmentos está asociada al crecimiento en todo el cultivo. A partir de estos valores de α_{CHL} o α_{Ca} se ha podido calcular las velocidades específicas máximas y productividades volumétricas de formación de clorofilas y carotenoides, Tabla 5,26.

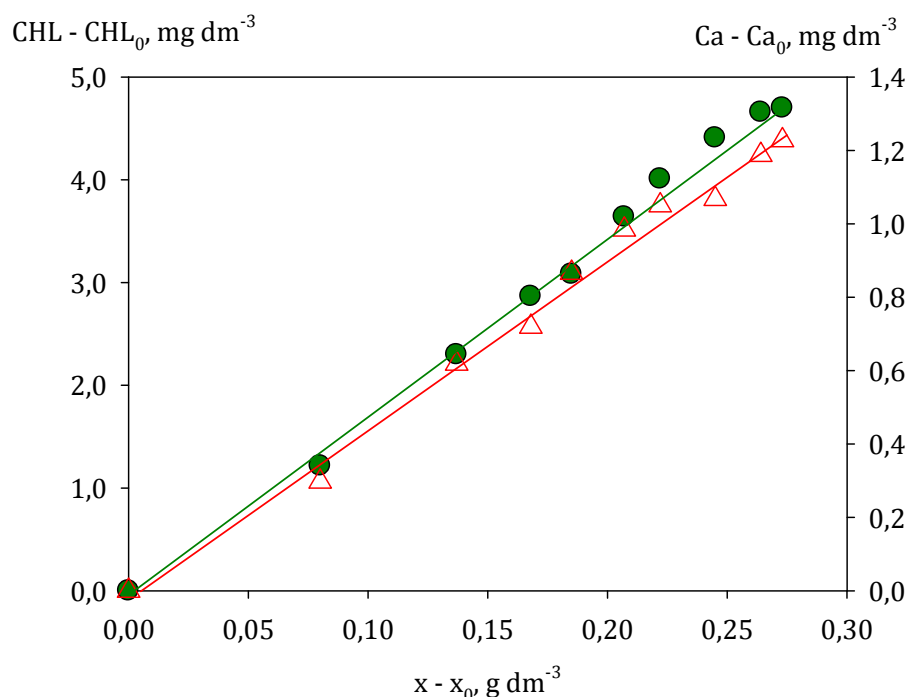


Figura 5.53 Relación entre la concentración neta de clorofilas totales (●) y carotenoides totales (△) vs concentración de biomasa neta obtenida de *C. pyrenoidosa* en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites al 30%, Exp. 7 ALA.

En general, se ha detectado que a medida que la concentración de ALA en el medio de cultivo aumentaba de 5 a 30%, se observa una tendencia definida en los valores de q_{CHL} , P_{CHL} , q_{Ca} y P_{Ca} ; a concentraciones superiores a 30% se detecta una disminución estos parámetros tanto en clorofilas como en carotenoides, Tabla 5.26. Concretamente, se ha observado influencia directa de la concentración del ALA sobre la formación de ambos pigmentos. Cabe destacar que en el cultivo con 30% de ALA se alcanzaron los valores más elevados de la velocidad específica máxima y productividad volumétrica en clorofilas y carotenoides totales.

Tabla 5.26. Velocidades específicas máximas y productividades volumétricas en formación de clorofilas y carotenoides, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites

% ALA (v/v)	$q_{\text{CHL}} 10$ ($\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	$P_{\text{CHL}} 10^2$ ($\text{mg dm}^{-3} \text{h}^{-1}$)	$q_{\text{Ca}} 10^2$ ($\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	$P_{\text{Ca}} 10^3$ ($\text{mg dm}^{-3} \text{h}^{-1}$)
5	$2,87 \pm 0,07$	$1,37 \pm 0,04$	$8,93 \pm 0,11$	$4,25 \pm 0,00$
10	$3,20 \pm 0,28$	$1,66 \pm 0,14$	$7,38 \pm 0,38$	$3,84 \pm 0,19$
20	$3,65 \pm 0,78$	$1,89 \pm 0,41$	$8,91 \pm 0,81$	$4,62 \pm 0,42$
30	$4,13 \pm 0,66$	$2,07 \pm 0,33$	$10,6 \pm 0,14$	$5,32 \pm 0,70$
50	$3,46 \pm 0,01$	$1,66 \pm 0,00$	$8,28 \pm 0,00$	$3,96 \pm 0,00$
100	$2,60 \pm 0,06$	$1,03 \pm 0,02$	$6,65 \pm 0,11$	$2,63 \pm 0,45$

b) Proteínas

A partir de los resultados obtenidos para todas las concentraciones de ALA, se observó que los parámetros %P y P/N disminuían en el transcurso de todos los experimentos. Al final de los cultivos, se analizó la biomasa de *C. pyrenoidosa*, y partir del %N se determinó el contenido de proteínas crudas, Figura 5.54. Como es bien conocido la síntesis de proteínas está relacionada con el contenido de N del medio de cultivo y por tanto la fuente del nitrógeno es un indicador para determinar el parámetro %P.

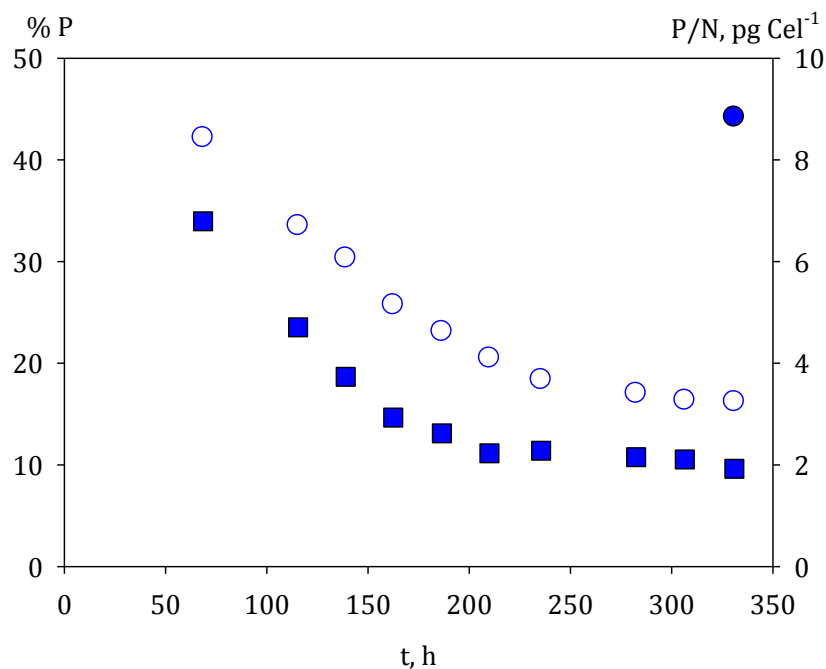


Figura 5.54 Variación del porcentaje de proteínas (○), y contenido de proteínas por célula (■) con el tiempo en *C. pyrenoidosa*, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites al 30%. Contenido de proteína cruda al final del cultivo (●), Exp. 7 ALA.

Los porcentajes de proteínas fueron diferentes de los reportados para *C. pyrenoidosa* en trabajos previos del Grupo Bioprocesos, en medios que utilizaban mezclas de aguas de lavado de aceitunas y aguas de lavado de aceites, Malvis *et al.* (2019); en este último trabajo se determinaron porcentajes de proteínas entre 6,2% y 30,8%, correspondiente a cultivos con 5% y 50% de aguas residuales de almazaras.

Los ajustes obtenidos en las representaciones de $(P-P_0)$ vs $(x-x_0)$ han sido aceptable para las fases exponencial y de desaceleración, y ello ha permitido determinar los coeficientes estequiométricos, α_p . De nuevo se comprueba en esta serie que la formación de proteínas está asociada a la formación de biomasa. Estos coeficientes estequiométricos, determinados en ambas zonas, permiten calcular las velocidades específicas máximas y productividades volumétricas de formación de proteínas, Figura 5.55.

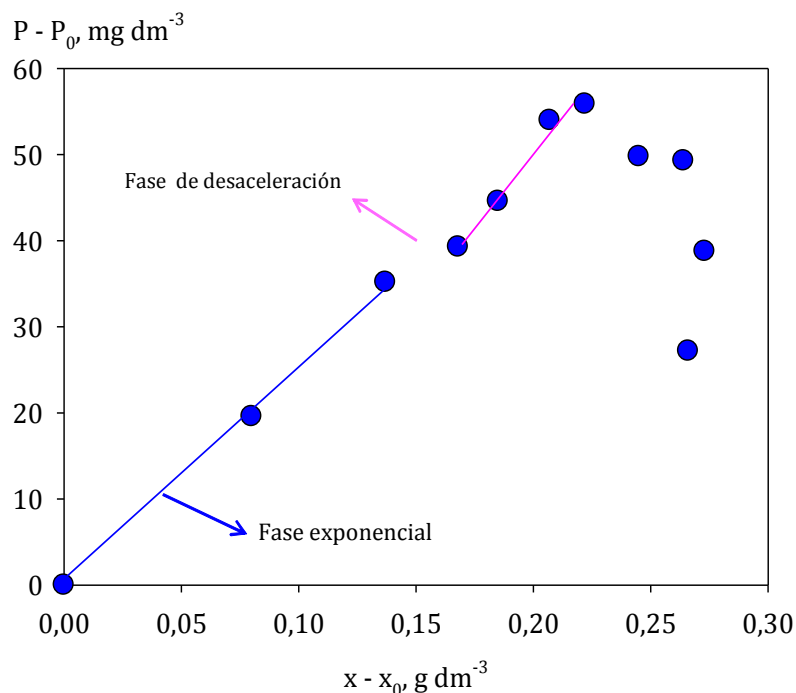


Figura 5.55 Relación entre la concentración neta de proteínas (●) y la concentración de biomasa neta producida usando *C. pyrenoidosa* en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites al 30%, Exp. 7 ALF.

En general, se ha detectado que a medida que la concentración de ALA en el medio de cultivo aumentaba de 5 a 20% o 30% de ALA, se detecta que q_p o P_p se incrementa; a concentraciones de ALA superiores a 20 o 30% ambos parámetros disminuyen. Por tanto, se ha observado influencia directa de la concentración de ALA sobre la formación de proteínas, Tabla 5.27.

Tabla 5.27. Velocidades específicas máximas y productividades volumétricas en proteínas en cultivos de *C. pyrenoidosa*, realizados usando aguas de lavado de aceites

% ALA (v/v)	q_p (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	P_p 10 (mg dm ⁻³ h ⁻¹)
5	6,19 ± 0,56	1,37 ± 0,12
10	9,36 ± 0,27	2,68 ± 0,10
20	13,0 ± 0,2	2,91 ± 0,84
30	10,2 ± 0,1	3,61 ± 0,12
50	10,1 ± 0,4	1,80 ± 0,45
100	8,08 ± 0,27	1,69 ± 0,13

Por otra parte, en el contenido de proteínas crudas calculado al final de cada experimento, se observó que el valor de P_{Cruda} estaba en un rango muy estrecho, del 43,1 al 44,6%, Tabla 5.28, no detectándose una tendencia definida con el aumento de la concentración de agua residual en el medio de cultivo.

Tabla 5.28. Porcentajes en proteínas crudas, en cultivos de *C. pyrenoidosa* realizados usando aguas de lavado de aceites

% ALA (v/v)	5	10	20	30	50	100
P_{Cruda} (%)	$44,6 \pm 0,1$	$43,3 \pm 0,1$	$43,1 \pm 0,1$	$44,4 \pm 0,2$	$44,6 \pm 0,3$	$43,8 \pm 0,1$

A efecto de comparación, se puede indicar que el contenido de proteínas en *S. obliquus*, alga muy similar a *C. pyrenoidosa*, alcanzó un valor de hasta 43,8% (Hodaifa *et al.*, 2013) cuando las microalgas se cultivaron en un medio sin deficiencia de N como es el medio sintético de Rodríguez-López (1964).

c) Lípidos totales y ácidos grasos

Al final de todos los experimentos de esta serie, se alcanzó la fase estacionaria, la biomasa fue recolectada y se determinó el contenido de lípidos totales. A partir de la fracción lipídica de la biomasa se ha determinado su composición en ácidos grasos.

Se ha observado que el porcentaje de lípidos totales aumentaba con la concentración de ALA, Figura 5.56. El valor más alto fue 50,0% en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites con concentraciones de 100%.

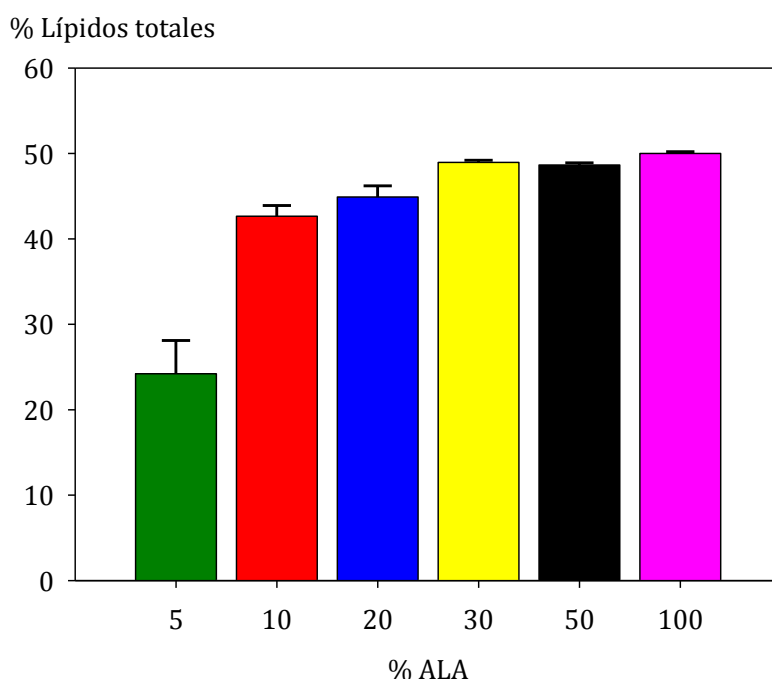


Figura 5.56 Contenido de lípidos totales al final de cada experimento, con *C. pyrenoidosa* en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites en concentraciones de 5 (■), 10 (■), 20 (■), 30 (■), 50 (■), 100% (■).

El perfil de ácidos grasos de la fracción lipídica de la biomasa se determinó al final del experimento en todos los cultivos, expresándose como porcentaje respecto al total de ácidos grasos. A partir de los cromatogramas obtenidos, se han calculado, los porcentajes de cada una de las fracciones de ácidos grasos obtenidos.

En general, en todo los experimentos de esta serie el ácido graso más abundante fue el ácido linolénico (18:3n3), con 28,5% en el medio con concentración 5% de aguas de lavado de aceites. El mayor porcentaje se registró en la fracción de POL (%), siendo el valor medio más alto detectado de ácidos grasos poliinsaturados 47,1%, obtenido en el cultivo con 30% de ALA, Tabla 5.29. No obstante, los valores de la fracción de ESE que se obtienen en los cultivos son muy próximos a los observados para la fracción de POL. Los principales ácidos grasos poliinsaturados identificados fueron: 18:2n3, 18:2n6, 18:3n3, 18:4n3, 20:2n6, 20:5n3 y 22:5n3, Tablas D.36 a D.72 (Anexo D).

El contenido del medio del cultivo y condiciones experimentales tienen un efecto muy importante y esencial en la formación de los ácidos grasos. Tal como se ha indicado anteriormente, el medio de cultivo utilizado contenía poca concentración de compuestos de fósforos, y nitrógeno lo que afecta al contenido de ácidos grasos. Es necesario indicar que el mayor porcentaje de SAT en el cultivo de 5% podría atribuirse al bajo porcentaje de la fracción de ácidos grasos monoinsaturados identificados en la fracción lipídica de la biomasa, Tabla 5.29. Este hecho es similar al observado por Malvis *et al.* (2019), cuando utilizo medios deficientes en N y P para *C. pyrenoidosa*.

Tabla 5.29. Composición en ácidos grasos de la fracción lipídica de *C. pyrenoidosa* en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites, a diferentes concentraciones

%ALA	SAT	MON	POL	ESE	AGSP	n3/n6
5	29,9 ± 0,7	13,7 ± 0,0	43,9 ± 0,8	41,4 ± 0,5	0,855 ± 0,055	2,76 ± 0,02
10	29,7 ± 0,8	16,0 ± 0,6	36,7 ± 0,1	33,4 ± 0,7	0,677 ± 0,017	1,37 ± 0,05
20	28,6 ± 0,1	15,6 ± 0,1	42,6 ± 0,3	38,3 ± 0,2	0,837 ± 0,025	1,79 ± 0,01
30	27,0 ± 0,3	11,7 ± 0,5	47,1 ± 0,7	41,9 ± 0,6	0,566 ± 0,076	1,56 ± 0,20
50	27,9 ± 0,4	19,5 ± 0,5	44,7 ± 0,5	38,6 ± 0,9	-	1,18 ± 0,04
100	27,8 ± 0,1	16,8 ± 0,0	42,8 ± 0,4	36,8 ± 0,3	-	1,28 ± 0,01

d) Composición elemental de la biomasa

Inicialmente, cabe indicar que se registraron diferencias en la composición elemental de la biomasa recolectada en todos los experimentos realizados. Por otro lado, hubo una diferencia destacada en el contenido de nitrógeno, y ello puede ser debido a la diferencia en la composición del medio del cultivo. El porcentaje más alto en la biomasa de *C. pyrenoidosa* correspondió al carbono, este hecho ha conducido a que la mayor relación entre carbono y nitrógeno C/N, fuese 6,30 cuando se utilizó aguas de lavado de aceites en un 20%, Figura 5.57. Beuckels *et al.* (2015) observaron que *Chlorella* y *Scenedesmus* pueden ajustar la concentración interna de N y P en la biomasa en función de la concentración de N y P en el medio de aguas residuales.

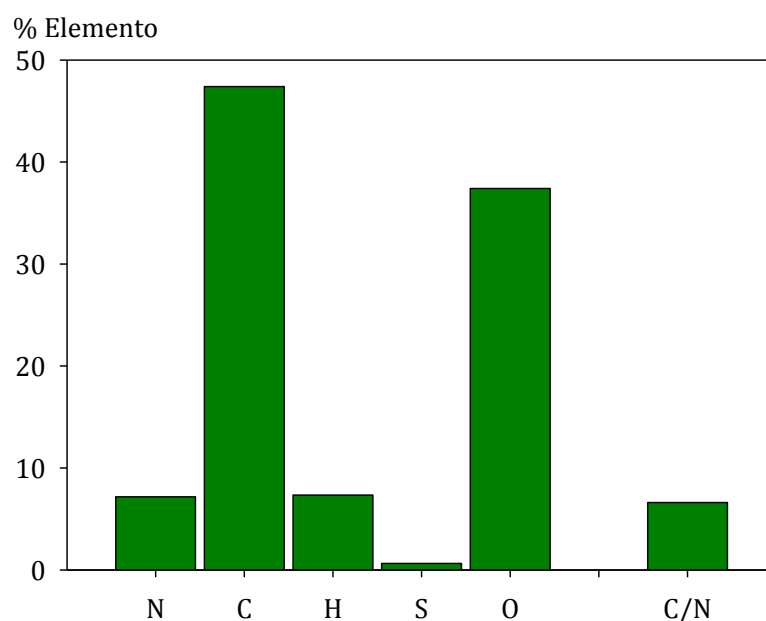


Figura 5.57 Composición elemental de la biomasa de *C. pyrenoidosa* determinada al final de los cultivos, en experimentos realizados usando aguas de lavado de aceites de concentración 30%, Exp. 7 ALA.

5.4.3 Ensayos con aguas residuales de almazara y aguas residuales urbanas de tratamiento biológico

En esta serie experimental, las aguas residuales urbanas de tratamiento biológico, RU, se han utilizado como medio de cultivo, mezcladas con el agua producida en almazaras. Específicamente, se ha usado 50% de aguas de lavado de aceitunas (ALF) con RU, y 30% de aguas de lavado de aceites (ALA) con RU. Por otra parte, se ha usado los tres tipos de aguas conjuntamente como medio de cultivo con concentraciones diferentes; un primer ensayo con 15% de ALF, 30% de ALA y el resto con RU, y otro ensayo con 20% de ALF, 30% de ALA y el resto RU.

5.4.3.1 Producción de biomasa

A partir de los resultados experimentales, se ha calculado los valores de concentración de biomasa (x) y el número de células por unidad de volumen. Con los valores de x se ha podido obtener las curvas de crecimiento y establecer la duración de la fase exponencial, para los cultivos de esta serie, Figura 5.58. Paralelamente, a partir de los datos x vs t se ha establecido la duración de la fase de desaceleración del crecimiento, observándose que tiene comportamiento lineal.

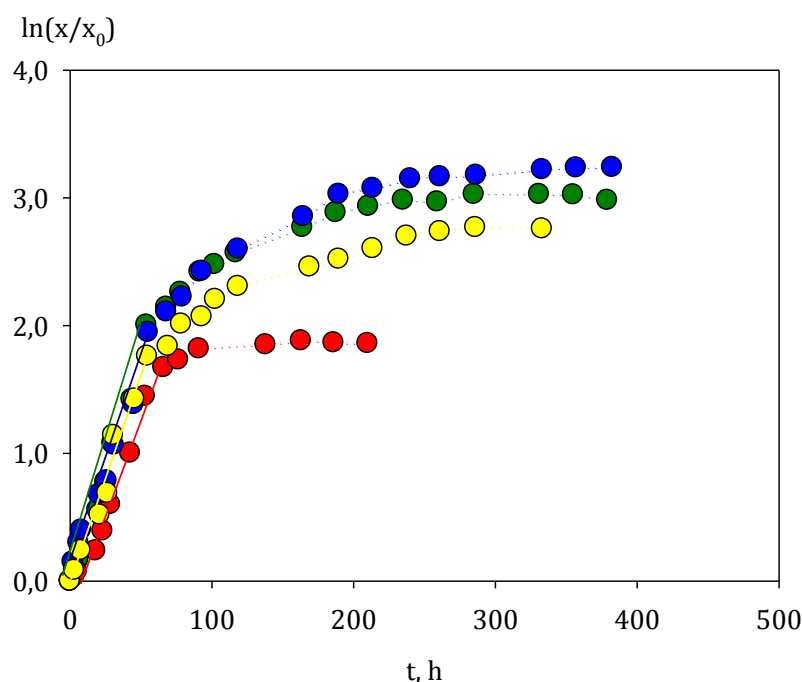


Figura 5.58 Curvas de crecimiento de *C. pyrenoidosa*, en cultivos realizados usando aguas de almazaras y aguas residuales urbanas: 50% ALF y RU (●), 30% ALA y RU (●), 15% ALF, 30% ALA y RU (●), y 20% ALF, 30% ALA y RU (●). Se operó a 25°C y a un nivel de aeración de 1 v/v/min, en los experimentos 2 ALFRU, 2 ALARU, 2 ALFARU y 4 ALFARU.

En todos los cultivos de esta serie no se ha observado fase de adaptación. Por otra parte, el valor más alto de biomasa alcanzada al final del experimento fue $0,996 \text{ g dm}^{-3}$ en cultivo usando 50% de aguas de lavado de aceitunas mezclada con aguas residuales urbanas. En este caso cabe destacar que las aguas residuales urbanas fueron un factor influyente en la formación de biomasa al aumentar la concentración de nutrientes en el medio de cultivo, Tabla 5.30. Se puede observar que los valores máximos experimentales de μ_m y P_b se han alcanzado en medios de cultivos con 50% de aguas de lavado de aceitunas y 50% de aguas residuales urbanas. A esta concentración, μ_m fue $0,035 \text{ h}^{-1}$ y P_b $3,05 \cdot 10^{-3} \text{ g dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$.

Tabla 5.30. Concentraciones de biomasa más elevadas, velocidades específicas máximas de crecimiento y productividades de biomasa, en cultivos realizados usando las aguas de lavado de almazara mezclada con aguas residuales urbanas

EXP	% (v/v)	$x_{\max}$ (g dm^{-3})	μ_m (h^{-1})	$P_b \cdot 10^3$ ($\text{g dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$)
<u>1 ALFRU</u> 2 ALFRU	50:50	$0,996 \pm 0,034$	$0,035 \pm 0,001$	$3,05 \pm 0,00$
<u>1 ALARU</u> 2 ALARU	30:70	$0,289 \pm 0,035$	$0,026 \pm 0,001$	$2,40 \pm 0,30$
<u>1 ALFARU</u> 2 ALFARU	15:30:55	$0,862 \pm 0,016$	$0,030 \pm 0,001$	$2,65 \pm 0,25$
<u>3 ALFARU</u> 4 ALFARU	20:30:50	$0,696 \pm 0,062$	$0,031 \pm 0,001$	$2,00 \pm 0,00$

A partir de los resultados obtenidos, los valores medios de μ_m y P_b estuvieron directamente influenciados por el porcentaje de la concentración de agua de lavado de aceitunas, fundamentalmente en la velocidad específica máxima de crecimiento, Figura 5.59.

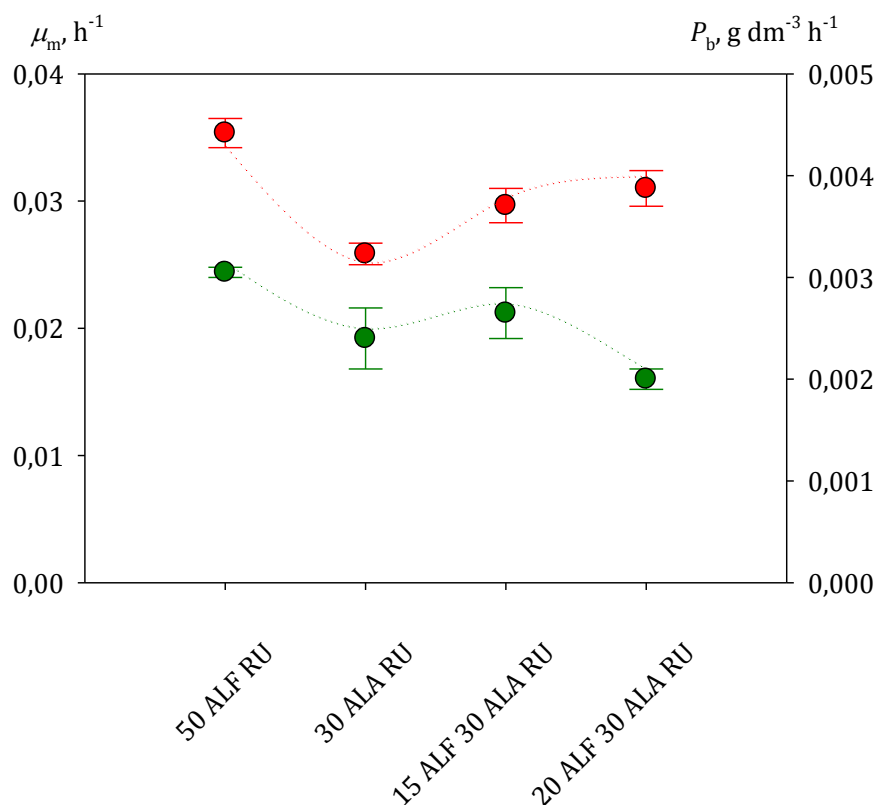


Figura 5.59 Velocidades específicas máxima de crecimiento, μ_m , h^{-1} (●), y productividades volumétricas en biomasa, P_b , $g\ dm^{-3}\ h^{-1}$ (●). Influencia de la concentración en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas mezcladas con aguas residuales urbanas.

Por otro lado, estos resultados ya indican que la concentración de ALA con RU, como medio de cultivo, tiene un efecto directo sobre el crecimiento. La proporción de ALA es un factor muy importante porque contiene compuestos fenólicos que a su vez inhiben el crecimiento. En este punto, se puede indicar que el 50% de ALF mezclado con RU empíricamente es la concentración más favorable para el crecimiento de *C. pyrenoidosa* en esta serie.

5.4.3.2 Composición bioquímica de la biomasa

a) Pigmentos

A través de los resultados obtenidos, se ha observado que las concentraciones de agua residual urbana tiene un efecto importante sobre la composición bioquímica de la biomasa. En los cultivos con 50% de ALF mezclada con RU, y en aquellos con 30% de ALA mezclada con RU, 15% de ALF, 30% de ALA mezclada con RU, los valores de %CHL, y %Ca, aumentaron en la fase exponencial y de desaceleración del crecimiento, y luego empezaron a disminuir hasta el final del experimento, Figuras 5.60 y 5.61. Por otra parte, cabe indicar que, cuando se mezclan las aguas de almazara (20% de ALF y 30% de ALA) con RU, los %CHL, y %Ca, empezaron a disminuir en forma lenta desde el inicio hasta el final del cultivo.

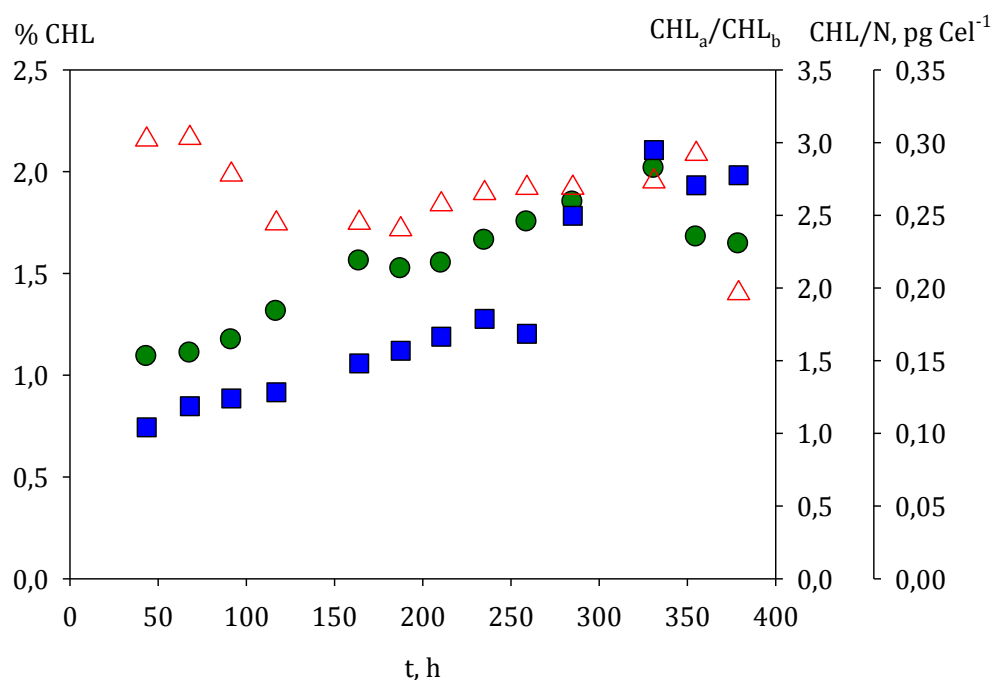


Figura 5.60 Variación del porcentaje de clorofilas totales (●), relación entre los contenidos de clorofilas 'a' y 'b' (△), y contenido de clorofilas totales por célula (■) en *C. pyrenoidosa* con el tiempo, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas al 50% mezcla con agua residuales urbanas, Exp. 2 ALFRU.

Se ha observado que los porcentajes de clorofilas son bajos y ello puede deberse a que el medio de cultivo no constituye un sistema alimentario integrado para el crecimiento. Wu y Miao (2014) destacaron que el nitrógeno es un nutriente esencial para microalgas. La limitación de nitrógeno normalmente conlleva una disminución de la fotosíntesis, Li *et al.* (2012)

En lo referente a la relación CHL_a/CHL_b , se ha observado una disminución durante la fase exponencial y después aumentó de forma lenta a partir de fase de desaceleración hasta el final del cultivo. En este punto se puede indicar que, el contenido de clorofila 'a' y 'b' cambió durante el transcurso de todo del cultivo.

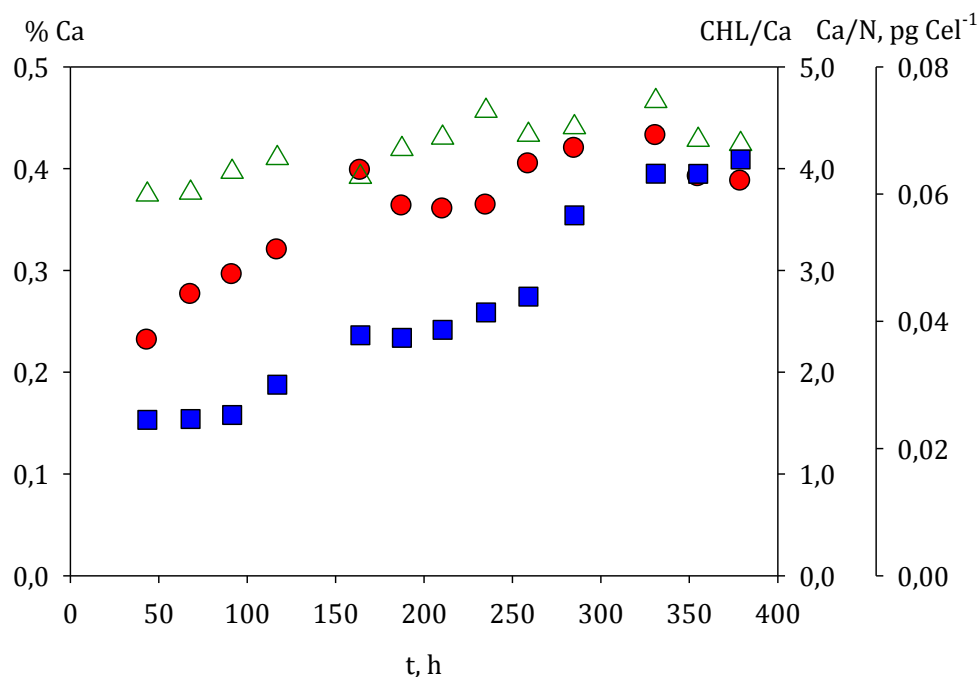


Figura 5.61 Variación del porcentaje de carotenoides totales (●), relación entre los contenidos de clorofilas y carotenoides totales (△), y de carotenoides por célula (■) en *C. pyrenoidosa* con el tiempo, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas al 50% mezclada con aguas residuales urbanas, Exp. 2 ALFRU.

Por otra parte, se ha observado que la relación CHL/Ca en los cultivos fue diferente para cada concentración de aguas de almazara mezclada con RU. En todos los cultivos de esta serie, la relación CHL/Ca aumentó de forma muy lenta durante el transcurso, excepto en los experimentos con 15% ALF, 30% de ALA y el resto RU, donde se detectó un aumento rápido.

Los ajustes obtenidos en las representaciones de $(\text{CHL}-\text{CHL}_0)$ vs $(x-x_0)$ y $(\text{Ca}-\text{Ca}_0)$ vs $(x-x_0)$ han sido aceptable en el transcurso de todo el experimento, y ello ha permitido determinar los coeficientes estequiométricos, α_{CHL} y α_{Ca} , en ambas zonas que finalmente han conducido a calcular las velocidades específicas máximas y productividades volumétricas de formación de clorofilas y carotenoides totales, Figura 5.62. Este hecho nos permite afirmar que la formación de clorofilas y carotenoides totales están asociada al crecimiento.

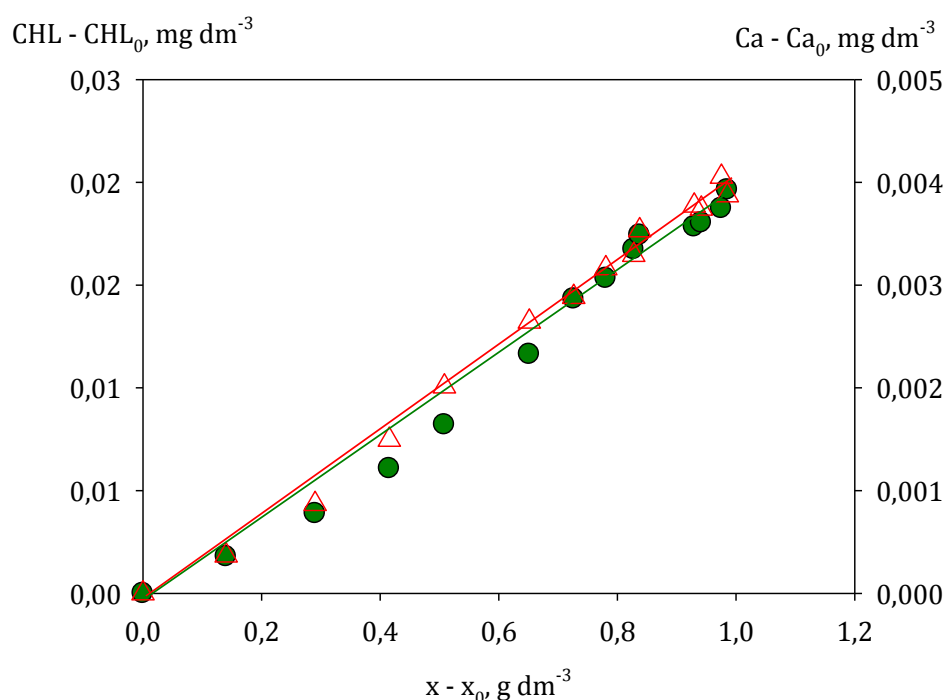


Figura 5.62 Relación entre la concentración neta de clorofilas totales (●) y carotenoides totales (Δ) vs concentración de biomasa neta obtenida de *C. pyrenoidosa* en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas al 50% mezcla con aguas residuales urbanas, Exp. 2 ALFRU.

Este único valor de α_{CHL} o α_{Ca} permite determinar tanto la velocidad específica máxima de formación de clorofilas, o de carotenoides, como las productividades volumétricas de ambos pigmentos, Tabla 5.31. Se observó que el valor más alto, en todos los parámetros, se registró en el cultivo que contenía 50% de ALF y 50% de RU; se puede explicar que cuando se ha usado ALA, el contenido de compuestos fenólicos inhibe el crecimiento y tiene un mayor efecto sobre el mismo que los nutrientes presentes que en las aguas residuales urbanas. En general, se ha observado una disminución en los valores de q_{CHL} y P_{CHL} cuando en el medio existía ALA.

Tabla 5.31. Velocidades específicas máximas y productividades volumétricas en formación de clorofilas y carotenoides, en cultivos realizados usando aguas de almazara mezclada con aguas residuales urbanas

% (v/v)	$q_{\text{CHL}} 10$ ($\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	$P_{\text{CHL}} 10^2$ ($\text{mg dm}^{-3} \text{h}^{-1}$)	$q_{\text{Ca}} 10^2$ ($\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	$P_{\text{Ca}} 10^3$ ($\text{mg dm}^{-3} \text{h}^{-1}$)
50ALFRU	$7,00 \pm 0,39$	$6,07 \pm 0,34$	$14,9 \pm 0,18$	$13,0 \pm 0,2$
30ALARU	$4,36 \pm 0,46$	$4,02 \pm 0,42$	$10,3 \pm 0,12$	$9,48 \pm 0,11$
15ALF30ALARU	$5,55 \pm 0,15$	$4,90 \pm 0,13$	$12,5 \pm 0,15$	$11,0 \pm 0,13$
20ALF30ALARU	$4,93 \pm 0,19$	$3,18 \pm 0,12$	$11,9 \pm 0,16$	$7,70 \pm 0,00$

b) Proteínas

Generalmente, se ha observado que el porcentaje de proteínas y el contenido de proteínas por célula disminuyen durante el transcurso del cultivo en cada experimento. Este hecho es similar al obtenido por Hodaifa *et al.* (2010a) operando con *S. obliquus*. Al final de los cultivos, los porcentajes en proteínas obtenidos son inferiores al 25%; el mayor valor de %P, 24,9%, se obtuvo en cultivo que contiene 30% de ALA mezclada con RU, Figura 5.63. En este punto cabe indicar que la síntesis de proteínas está relacionada con el contenido de N del medio de cultivo. También cabe destacar que los valores obtenidos en esta serie

al inicio del cultivo, donde la concentración de nitrógeno es significativa, está en el rango de 55-60%, valores que son concordantes con los aportados por Becker (1994).

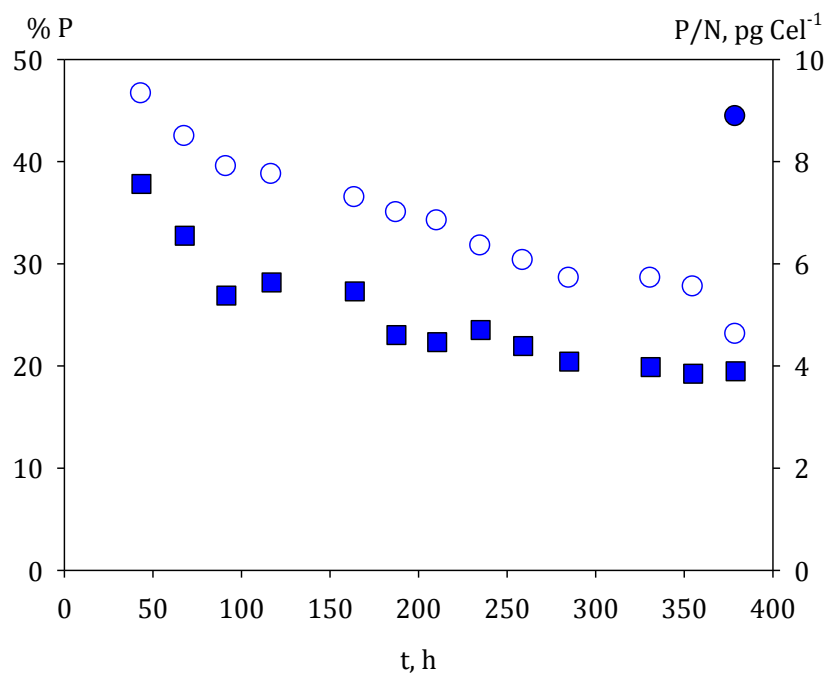


Figura 5.63 Variación del porcentaje de proteínas (○), y contenido de proteínas por célula (■) con el tiempo en *C. pyrenoidosa*, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas al 50% mezclada con aguas residuales urbanas. Contenido de proteína cruda al final del cultivo (●), Exp. 2 ALFRU.

Los ajustes obtenidos en las representaciones de $(P-P_0)$ vs $(x-x_0)$ para las fases exponencial y de desaceleración, han permitido determinar los coeficientes estequiométricos, α_p . Estos coeficientes estequiométricos, determinados en ambas zonas, permiten calcular las velocidades específicas máximas y productividades volumétricas de formación de proteínas, Figura 5.64.

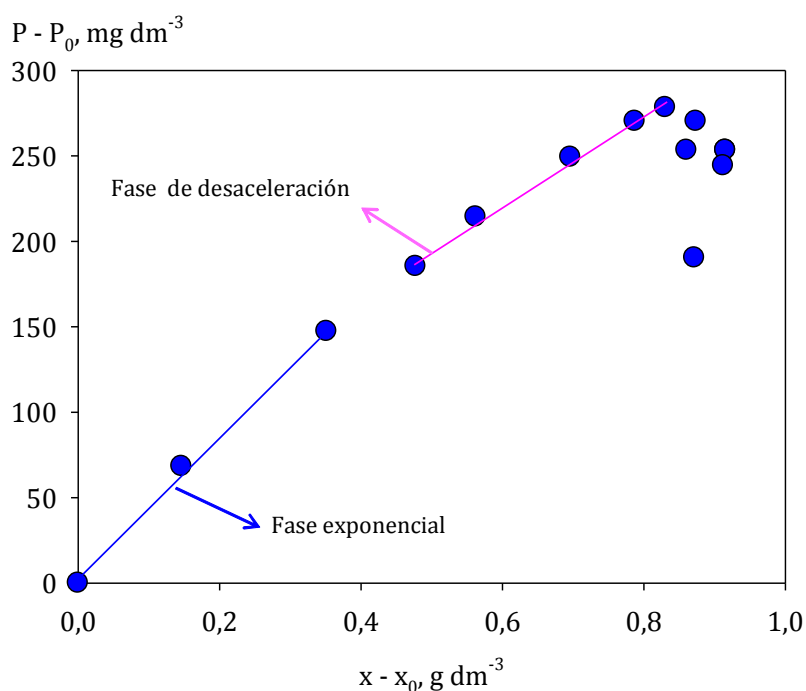


Figura 5.64 Relación entre la concentración neta de proteínas (●) y la concentración de biomasa neta producida usando *C. pyrenoidosa* en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas al 50% mezclada con aguas residuales urbanas, Exp. 2 ALFRU.

En general, se ha detectado que a medida que la concentración de ALF en el medio de cultivo aumenta, se observa que q_p se incrementa, mientras que P_p disminuye si está en presencia de ALA. Por tanto, se ha observado influencia directa de la concentración del RU y ALF sobre la formación de proteínas, Tabla 5.32.

Tabla 5.32. Velocidades específicas máximas y productividades volumétricas en proteínas en cultivos de *C. pyrenoidosa*, realizados usando aguas de almazaras mezclada con aguas residuales urbanas

% (v/v)	q_p (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	P_p 10 (mg dm ⁻³ h ⁻¹)
50ALFRU	15,6 ± 0,7	7,82 ± 0,14
30ALARU	10,3 ± 0,7	4,62 ± 0,13
15ALF30ALARU	12,8 ± 0,2	4,27 ± 0,08
20ALF30ALARU	13,6 ± 0,4	2,95 ± 0,03

También los valores medios de proteína cruda determinada al final del cultivo, % P_{Cruda} , junto con la desviación estándar correspondiente se ha calculado para cada las experimentos. No se ha observado una tendencia definida cuando se modificó el porcentaje del RU en el medio de cultivo, Tabla 5.33, registrándose valores promedios en el rango 42,5-46,6%.

Tabla 5.33. Porcentajes en proteína cruda, en cultivos de *C. pyrenoidosa* realizados usando aguas de almazaras mezclada con aguas residuales urbanas

% (v/v)	50ALFRU	30ALARU	15ALF30ALARU	20ALF30ALARU
P_{Cruda} (%)	46,4 ± 0,0	46,6 ± 0,3	42,5 ± 0,2	42,7 ± 0,2

c) Lípidos totales y ácidos grasos

Al final de los experimentos, se analizó la biomasa de *C. pyrenoidosa* para determinar el porcentaje de lípidos totales. En todos los medios de cultivos, el porcentaje de lípidos totales estuvieron en el rango de 41,3-46,0%, Figura 5.65. Estos valores son superiores a los descritos por Becker (1994) para *C. vulgaris* (14-22%).

Los medios de cultivos fueron pobres en nitrógeno, y ello ha facilitado que *C. pyrenoidosa* incremente su la capacidad de producir lípidos. Estos resultados son similares a los obtenidos por Gardner *et al.* (2011), que observaron que cuando las microalgas están bajo de nivel de N limita y con pH controlado, se facilita la síntesis de lípidos.

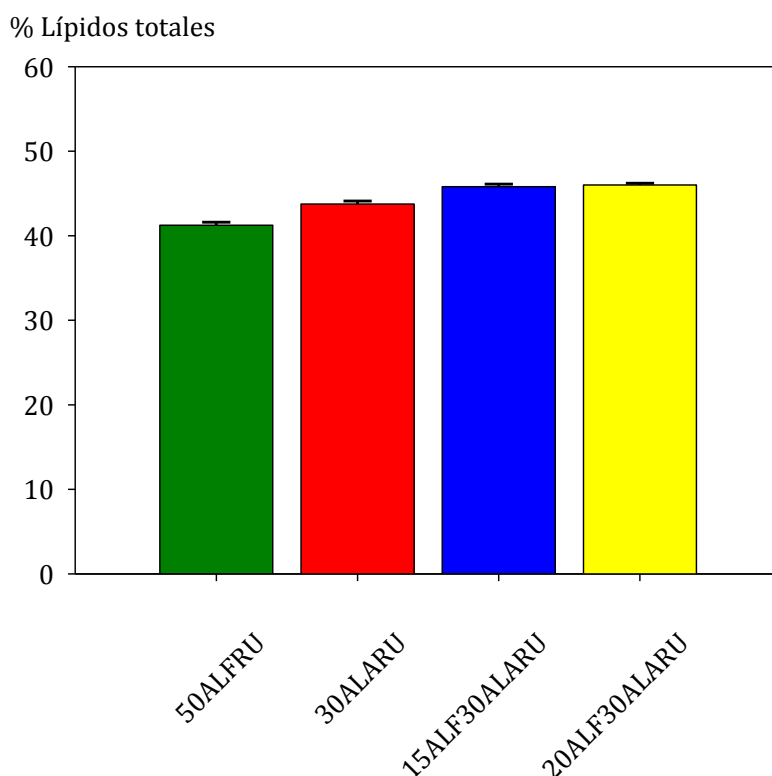


Figura 5.65 Contenido de lípidos totales al final de cada experimento, con *C. pyrenoidosa* en cultivos realizados usando aguas de almazaras mezclada con aguas residuales urbanas en EXP. 50ALFRU (■), 30ALARU (■), 15ALF30ALARU (■), 20ALF30ALARU (■).

El perfil de ácidos grasos de la fracción lipídica de la biomasa se determinó al final del experimento en todos los cultivos, expresándose como porcentaje respecto al total de ácidos grasos. A partir de los cromatogramas obtenidos, se han calculado, los porcentajes de cada una de las fracciones de ácidos grasos.

En consideración a los resultados obtenidos, se observa que el contenido de ALF tiene un efecto favorable en la formación de los ácidos 18:1 y 18:3n3; en los cultivos de 50ALFRU y 20ALF30ALARU el ácido graso más abundante fue el (18:1), mientras que en los cultivos 30ALARU y 15ALF30ALARU fue el 18:3n3. Por otra parte, el mayor porcentaje se registró en la fracción de poliinsaturados, siendo el valor medio más alto detectado de ácidos grasos poliinsaturados 46,3%, obtenido en el cultivo con 15% de ALF, 30% de ALA y 55% de RU, Tabla 5.34. No obstante, los valores de la fracción de ESE que se obtienen en los cultivos son muy próximos a los observados para la fracción de POL. El valor más alto de la relación n3/n6

fue 1,37 en el cultivo con agua de lavado de aceites y aguas residuales urbanas. En este caso, este valor está más próximo al rango 2-5, donde se considera que la biomasa tiene cierto valor nutricional, Webb y Chu (1982).

Tabla 5.34. Composición en ácidos grasos de la fracción lipídica de *C. pyrenoidosa* en cultivos realizados usando aguas de almazaras mezcladas con aguas residuales urbanas, a diferentes concentraciones

% (v/v)	SAT	MON	POL	ESE	AGSP	n3/n6
50ALFRU	26,5 ± 0,5	27,7 ± 0,5	39,2 ± 0,2	35,0 ± 0,4	0,586 ± 0,00	0,940 ± 0,098
30ALARU	28,7 ± 0,7	24,4 ± 0,0	41,1 ± 0,7	41,4 ± 0,1	0,400 ± 0,014	1,37 ± 0,008
15ALF30ALARU	22,7 ± 0,8	26,7 ± 0,8	46,3 ± 0,5	41,7 ± 0,4	0,553 ± 0,041	0,988 ± 0,054
20ALF30ALARU	25,2 ± 0,0	27,4 ± 0,0	41,5 ± 0,7	37,2 ± 0,5	0,488 ± 0,042	1,02 ± 0,003

Los componentes del medio del cultivo y condiciones experimentales tienen una influencia importante y esencial en la formación de los ácidos grasos. Tal como se ha indicado anteriormente, los medios de cultivos utilizado contenía poca concentración de compuestos de fósforo y nitrógeno lo que afecta al contenido de ácidos grasos, Hu *et al.* (2008). Por otra parte, se ha observado porcentajes altos de ácidos linoleico y linolénico en la fracción lipídica de la biomasa obtenida y este hecho coincide con lo indicado por Hu *et al.* (2008).

d) Composición elemental de la biomasa

El análisis de la composición elemental se realizó a la biomasa seca obtenida al final de cada experimento. También, se ha determinado la relación entre los porcentajes de carbono y de nitrógeno, así como la relación C/N.

A partir a los resultados observados, en esta serie el contenido de carbono fue el valor más alto, 46,8%, el mayor contenido de nitrógeno 7,46%, se obtiene en la biomasa procedente del cultivo con 30% de ALA mezclada con RU, mientras que el contenido de azufre estaba en el rango 0,34-0,54%, Figura 5.66.

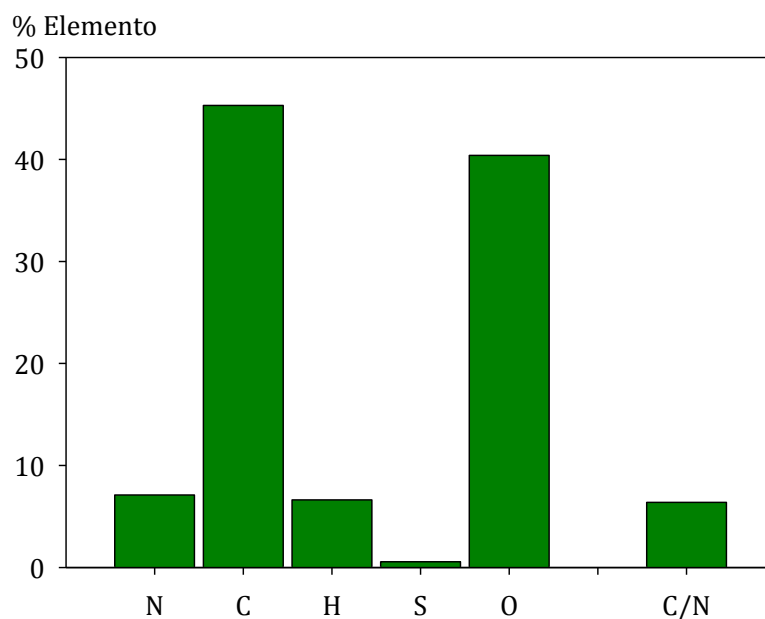


Figura 5.66 Composición elemental de la biomasa de *C. pyrenoidosa* determinada al final de los cultivos, en experimentos realizados usando aguas de lavado de aceitunas al 50% mezclada con aguas residuales urbanas, Exp. 2 ALFRU.

5.4.4 Efecto de la concentración de dióxido carbono en diferentes medios de cultivos

En esta serie experimental, se utilizó las aguas generadas en almazara y aguas residuales urbanas de tratamiento secundario. Se ha usado 50% aguas de lavado de aceitunas y 30% aguas de lavado de aceites, temperatura 25°C, un caudal volumétrico de aire de 1 v/v/min y concentraciones de dióxido de carbono en el aire en un rango de 0,035 – 15,0%.

5.4.4.1 Cultivos realizados con aguas de lavado de aceitunas

A. Producción de biomasa

Los resultados experimentales correspondientes al estudio del efecto del nivel de concentración de CO₂, utilizando como medio de cultivo aguas de lavado de aceitunas, se recogen en las Tablas D.97 a D.126 y sus representaciones gráficas en las Figuras D.33 a D.42 (Anexo D).

Inicialmente, se han obtenido las curvas de crecimiento para los experimentos realizados a las concentraciones de CO₂ de 1, 2, 5, 10 y 15% en aire, con un caudal volumétrico de fase gaseosa de 1 v/v/min en los fotobiorreactores. En los cultivos de esta serie no se detecta fase de adaptación. Por otra parte, se observó que la duración de la fase exponencial disminuye al aumentar la concentración de CO₂, donde el período más largo se detecta para una concentración de 0,035% de CO₂ en aire, Figura 5.67.

Por otra parte, los valores medios de la concentración de biomasa más elevada, velocidad específica máxima de crecimiento y productividad volumétrica en biomasa, junto con los valores de la desviación estándar correspondiente, se muestran para cada cultivo en la Tabla 5.35.

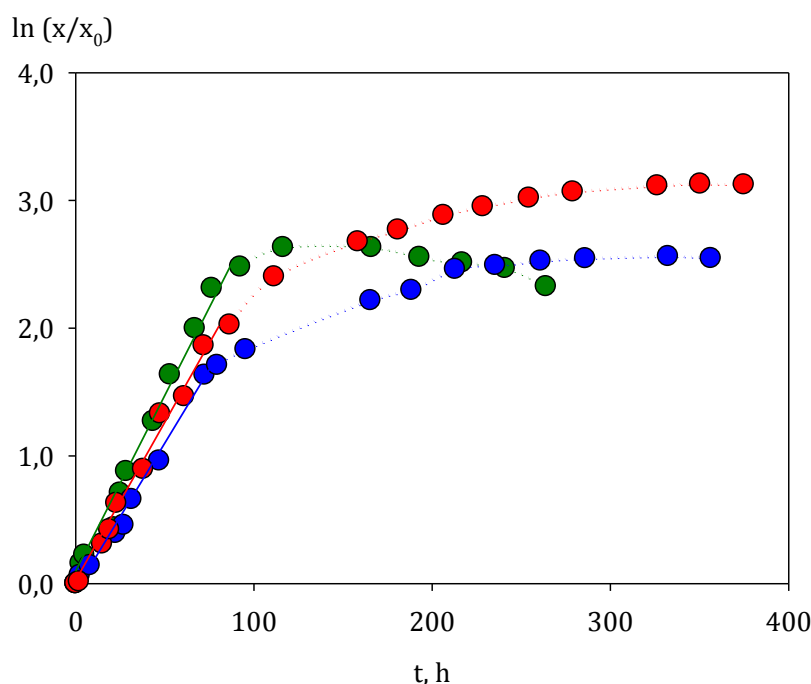


Figura 5.67 Curvas de crecimiento de *C. pyrenoidosa*, en cultivos realizados con aguas de lavado de aceitunas al 50% con diferentes % de CO₂ en la fase gas, 1% (●), 10% (●), 15% (●). Se operó a 25°C y a un nivel de aeración de 1 v/v/min, en los experimentos 1 ALFC, 7 ALFC y 9 ALFC.

En principio, y en relación con los experimentos 9 ALF y 10 ALF, debe tenerse en cuenta que el medio de cultivo que se ha utilizado con 50% de aguas de lavado de aceitunas con concentración 0,035% de CO₂, fue diferente en todas las especificaciones físicas y químicas de las aguas usadas en esta serie experimental. En este sentido, en las Tablas 5.1 y 5.2, es posible observar las caracterizaciones físico-

químicas de las aguas de lavado de aceitunas empleadas como medios de cultivos en esta serie, y que fueron tomadas el 3 de enero de 2018.

Tabla 5.35. Concentraciones de biomasa más elevadas, velocidades específicas máximas de crecimiento y productividades de biomasa, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas y adición de dióxido de carbono en la fase gas de entrada al fotobiorreactor

EXP	CO ₂ (%)	$x_{\max}$ (g dm ⁻³)	μ_m (h ⁻¹)	$P_b \cdot 10^3$ (g dm ⁻³ h ⁻¹)
<u>9 ALF</u> <u>10 ALF</u>	0,035	0,500 ± 0,117	0,036 ± 0,01	2,22 ± 0,00
<u>1 ALFC</u> <u>2 ALFC</u>	1	0,310 ± 0,002	0,029 ± 0,00	2,40 ± 0,30
<u>3 ALFC</u> <u>4 ALFC</u>	2	0,520 ± 0,005	0,031 ± 0,00	2,75 ± 0,09
<u>5 ALFC</u> <u>6 ALFC</u>	5	0,826 ± 0,009	0,031 ± 0,00	3,05 ± 0,00
<u>7 ALFC</u> <u>8 ALFC</u>	10	1,03 ± 0,008	0,032 ± 0,00	3,35 ± 0,03
<u>9 ALFC</u> <u>10 ALFC</u>	15	0,954 ± 0,009	0,025 ± 0,00	3,45 ± 0,02

En general, en esta serie la concentración de biomasa aumenta a medida que se incrementa el %CO₂; pero hasta cierto límite del CO₂. El incremento en las concentraciones de biomasa es inducido por el aumento en el % de CO₂; en principio, este hecho se podría justificar considerando que cuanto mayor concentración de CO₂ disuelto en el biorreactor se facilita la fotosíntesis pudiéndose alcanzar valores de crecimiento altos. Los resultados que se ha obtenidos son muy similares a los indicados por Sun *et al.* (2015) y Abd El Baky *et al.* (2012). A partir de los resultados obtenidos, los valores de la velocidad específica máxima de crecimiento y la productividad aumentan de con el porcentaje de dióxido de carbón, de 1 a 10%, y posteriormente disminuyó, Figura 5.68.

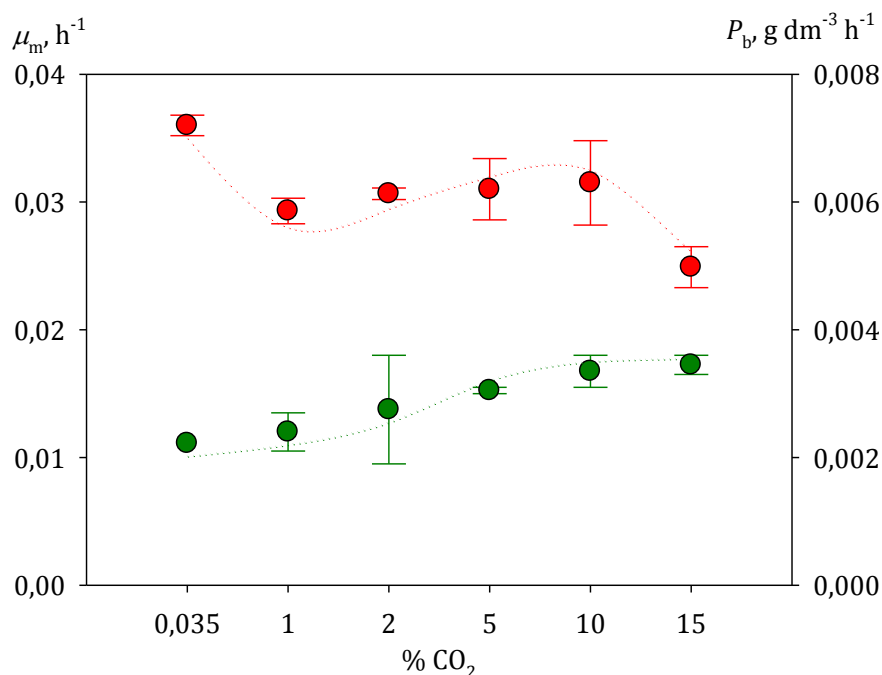


Figura 5.68 Velocidades específicas máxima de crecimiento, μ_m , h⁻¹ (●), y productividades volumétricas en biomasa, P_b , g dm⁻³ h⁻¹ (●). Influencia de la concentración en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas al 50% con diferentes % de CO₂.

B. Composición bioquímica de la biomasa

a) Pigmentos

A través de los resultados obtenidos, se ha observado que los valores de %CHL, CHL/N , y Ca/N disminuyen durante el transcurso de todos los experimentos, Figura 5.69. Por otra parte, el %Ca disminuyó durante el transcurso del cultivo, excepto en los experimentos con los 10 y 15% de CO_2 en el aire de entrada al fotobiorreactor, donde se detectó un aumento a partir de las primeras horas hasta la fase de desaceleración y luego disminuyó hasta el final del experimento, Figura 5.70. Los porcentajes de clorofilas totales determinados al final de los cultivos están en el rango 0,01 a 6,0%. Estos resultados están de acuerdo con lo indicado por Milner (1953), que señala que el porcentaje de clorofilas totales en *C. pyrenoidosa* se encuentra en el intervalo de 0,01 a 6,0%.

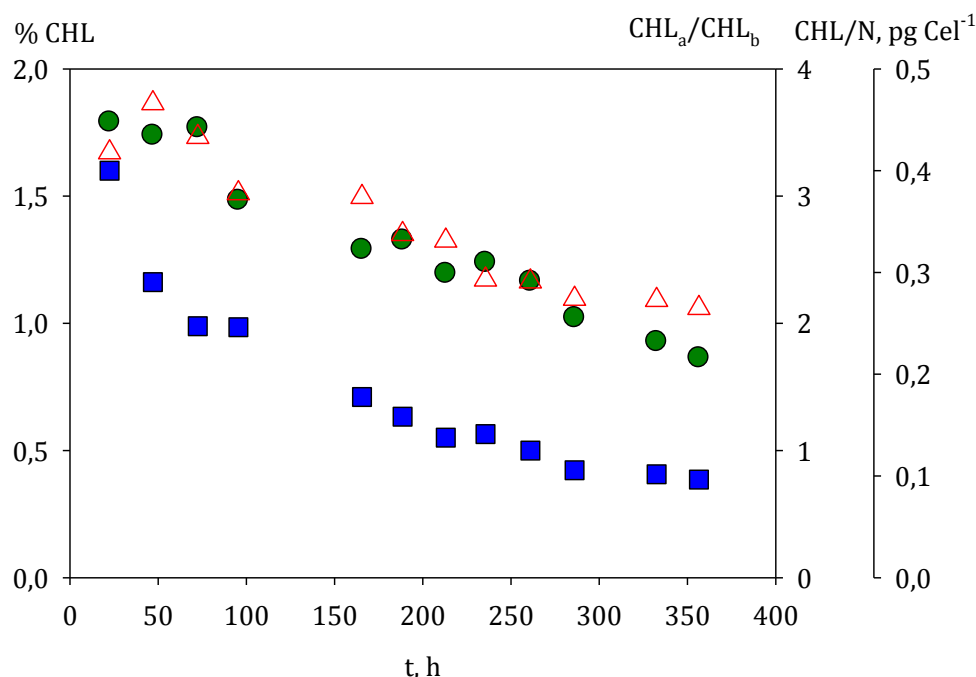


Figura 5.69 Variación del porcentaje de clorofilas totales (●), relación entre los contenidos de clorofilas 'a' y 'b' (△), y contenido de clorofilas totales por célula (■) en *C. pyrenoidosa* con el tiempo, en cultivos usando aguas de lavado de aceitunas al 50% y 10% CO_2 en la fase gas, Exp. 7 ALFC.

La relación $\text{CHL}_a/\text{CHL}_b$ y CHL/Ca , disminuyó durante el transcurso del cultivo, excepto con los porcentajes de CO_2 de 0,035, 10 y 15% en el aire de entrada, donde se detectó un aumento desde el inicio del cultivo hasta la fase de desaceleración y luego disminuyó hasta el final del experimento. En este caso se puede indicar que, el contenido de clorofila 'a' aumentó durante la fase exponencial y después disminuyó; por otra parte, la concentración de clorofila 'b' se incrementó durante el transcurso de todo el cultivo; este hecho podría justificar la variación observada en la relación $\text{CHL}_a/\text{CHL}_b$.

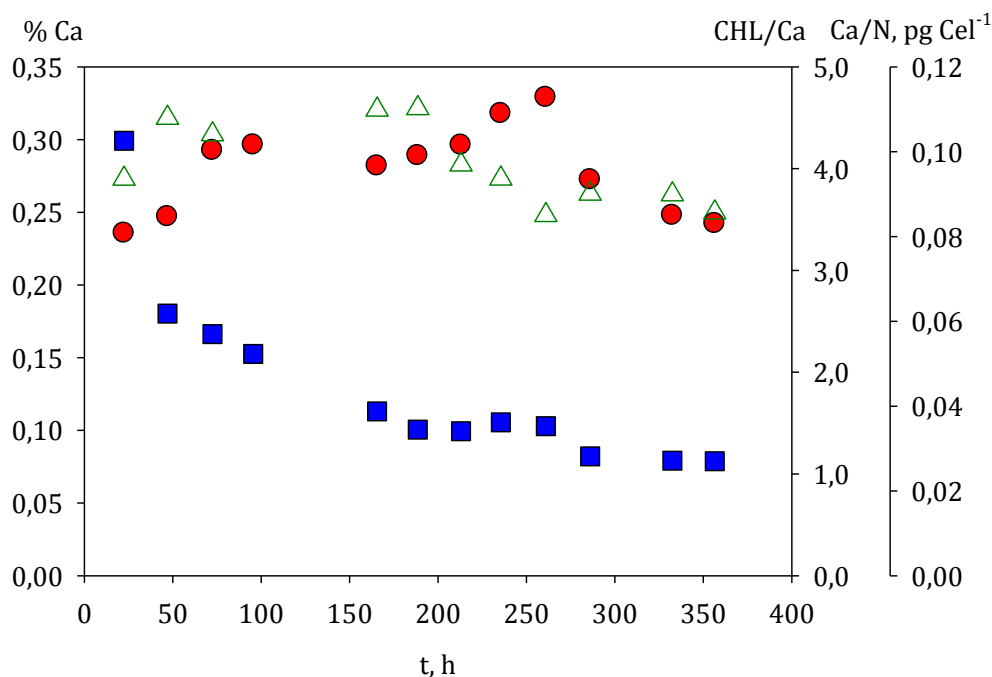


Figura 5.70 Variación del porcentaje de carotenoides totales (●), relación entre los contenidos de clorofilas y carotenoides totales (△), y de carotenoides por célula (■) en *C. pyrenoidosa* con el tiempo, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas al 50% con 10% CO₂ en la fase gas, Exp. 7 ALFC.

En general, a la vista de los resultados obtenidos para los diferentes parámetros la relación entre concentración neta de clorofilas y carotenoides totales con la concentración de biomasa neta producida, a partir del inicio del experimento hasta el final (o bien en tiempos próximos al final) de la fase de desaceleración aumentó, y luego en algunos experimentos disminuyó hasta al final del cultivo. El ajuste de $(\text{CHL}-\text{CHL}_0)$ vs $(x-x_0)$ y $(\text{Ca}-\text{Ca}_0)$ vs $(x-x_0)$ producida es aceptable, y por ello se puede confirmar que formación de pigmentos está asociada a la formación de biomasa al menos en la fase exponencial de crecimiento y parte de la zona de desaceleración, Figura. 5.71. Por tanto, mediante el ajuste realizado se ha podido a determinar los coeficientes estequiométricos, α_{CHL} o α_{Ca} , para el cultivo.

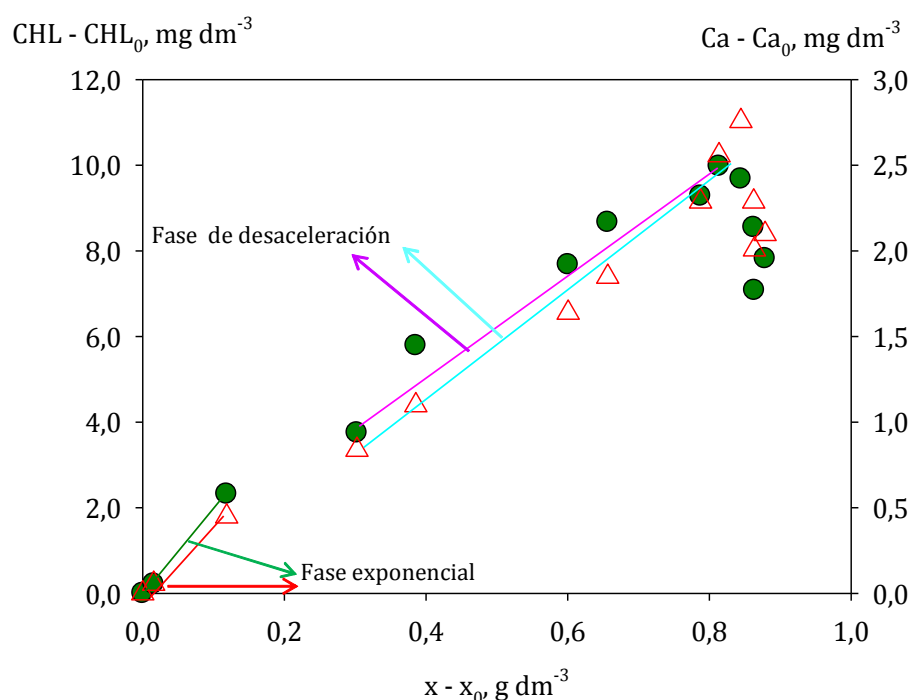


Figura 5.71 Relación entre la concentración neta de clorofilas totales (●) y carotenoides totales (△) vs concentración de biomasa neta obtenida de *C. pyrenoidosa* en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas al 50% con 10% CO₂, Exp. 1 ALFC.

Para las concentraciones de CO₂ ensayadas, y partir de representaciones similares a la de la Figura 5.76, se ha podido determinar los valores de la velocidad específica máxima y productividad volumétrica en clorofilas totales y carotenoides totales, Tabla 5.36. En este punto, se puede indicar que las concentraciones de CO₂ pueden afectar a la producción y composición bioquímica en las microalgas.

Tabla 5.36. Velocidades específicas máximas y productividades volumétricas en formación de clorofilas y carotenoides, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas al 50% con diferentes % de CO₂

CO ₂ (%)	$q_{\text{CHL}} 10$ (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	$P_{\text{CHL}} 10^2$ (mg dm ⁻³ h ⁻¹)	$q_{\text{Ca}} 10^2$ (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	$P_{\text{Ca}} 10^2$ (mg dm ⁻³ h ⁻¹)
0,035	6,82 ± 0,05	4,17 ± 0,03	13,7 ± 0,4	0,836 ± 0,02
1	4,91 ± 0,54	5,80 ± 0,26	9,08 ± 0,29	1,85 ± 0,26
2	5,19 ± 0,52	1,96 ± 0,35	8,60 ± 0,61	0,78 ± 0,06
5	7,15 ± 0,29	2,95 ± 0,11	12,1 ± 0,31	0,88 ± 0,00
10	5,49 ± 0,88	3,57 ± 0,02	10,9 ± 0,19	1,06 ± 0,08
15	4,94 ± 0,01	3,66 ± 0,00	9,71 ± 0,69	1,38 ± 0,07

La mayor velocidad específica de formación de clorofilas, 0,715 mg g⁻¹ h⁻¹, se alcanza cuando en la fase gas el %CO₂ es del 5%, que no coincide con la concentración de dióxido de carbono que da lugar a la mayor velocidad específica de formación de carotenoides, 0,137 mg g⁻¹ h⁻¹, obtenida cuando el %CO₂ en la fase gas es mínimo (0,035%). Sin embargo, las productividades volumétricas de ambos pigmentos están sincronizadas, presentando el máximo valor para el mismo porcentaje de CO₂ en la fase gas (1,0% CO₂).

b) Proteínas

A partir de los resultados obtenidos para todas las concentraciones de CO_2 , se observó que los parámetros %P y P/N disminuían en el transcurso de todos los experimentos. Al final de los cultivos, se realizó un análisis elemental de la biomasa de *C. pyrenoidosa*, y considerando el %N se determinó el contenido de proteínas crudas, Figura 5.72.

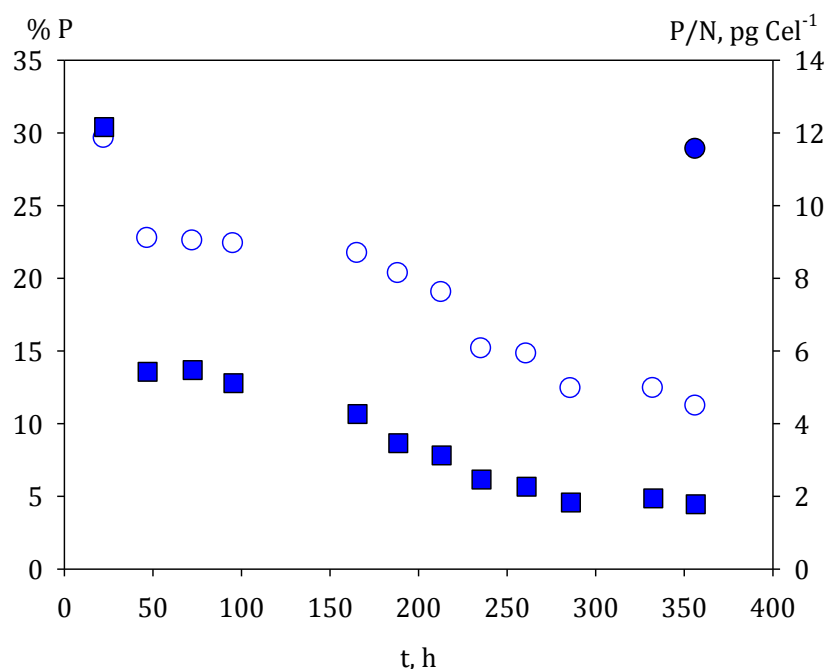


Figura 5.72 Variación del porcentaje de proteínas (○), y contenido de proteínas por célula (■) con el tiempo en *C. pyrenoidosa*, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas al 50% con 10% CO_2 . Contenido de proteínas crudas al final del cultivo (●), Exp. 7 ALFC.

Los ajustes obtenidos en las representaciones de $(P-P_0)$ vs $(x-x_0)$ han sido aceptable en todos los cultivos, considerando por separado las fases exponencial y de desaceleración, y ello ha permitido determinar los coeficientes estequiométricos, α_p , en ambas fases. En esta serie de experimentos en los que se ha usado como medio de cultivo aguas de lavado de aceitunas al 50% con % de CO_2 de 0,035-15%, esta apreciación sobre α_p permite justificar que la formación de proteínas está asociada al crecimiento al menos en la fase exponencial, Figura 5.73. A partir de estos valores de α_p se ha podido calcular las velocidades específicas máximas y productividades volumétricas de formación de proteínas, en la fase exponencial de crecimiento y en parte de la fase de desaceleración (concretamente en los experimentos realizados con 10 y 15% de CO_2).

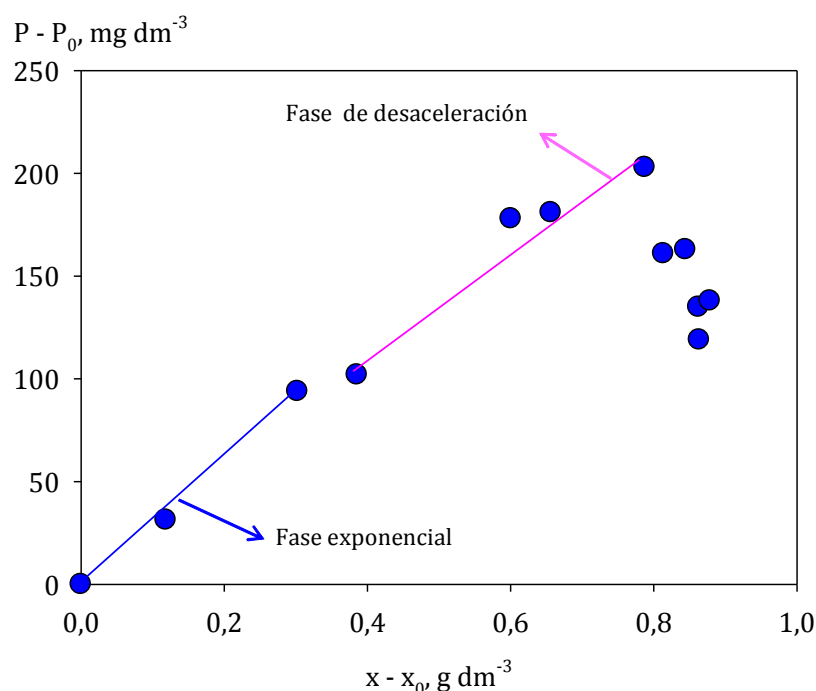


Figura 5.73 Relación entre la concentración neta de proteínas (●) y la concentración de biomasa neta producida usando *C. pyrenoidosa* en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas al 50% con 10% CO₂, Exp. 7 ALFC. .

En general, Se observó que los valores q_p y P_p son mínimos en presencia de altas concentraciones de dióxido de carbono. Por ello, esto permite justificar que, la concentración de CO₂ tiene influencia directa sobre la formación de proteínas, Tabla 5.37.

Tabla 5.37. Velocidades específicas máximas y productividades volumétricas en proteínas en cultivos de *C. pyrenoidosa* realizados usando aguas de lavado de aceitunas al 50% con diferentes % de CO₂

CO ₂ (%)	q_p (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	P_p 10 (mg dm ⁻³ h ⁻¹)
0,035	14,9 ± 0,2	4,80 ± 0,23
1	10,7 ± 0,4	8,37 ± 0,29
2	11,2 ± 0,4	6,00 ± 0,61
5	13,2 ± 0,1	5,83 ± 0,92
10	11,1 ± 0,6	6,85 ± 0,33
15	9,02 ± 0,7	2,53 ± 0,25

También los valores medios de proteínas crudas determinada al final del cultivo, %P_{Cruda}, junto con la desviación estándar correspondiente se ha calculado para las concentraciones de CO₂ ensayadas. Se ha observado una tendencia definida cuando se modificó el porcentaje de CO₂ en el medio de cultivo, Tabla 5.38, disminuyendo cuando se aumenta el % de CO₂ en el aire de entrada al fotobiorreactor. Los valores de %P_{Cruda} están en un amplio rango, 44,4-28,2%.

Tabla 5.38. Porcentajes en proteínas crudas, en cultivos de *C. pyrenoidosa* realizados usando aguas de lavado de aceitunas al 50% con diferentes % de CO₂

CO ₂ (%)	0,035	1	2	5	10	15
P _{Cruda} (%)	44,4 ± 0,5	44,1 ± 0,1	43,9 ± 0,1	31,1 ± 0,0	28,9 ± 0,1	28,2 ± 0,2

c) Lípidos totales y ácidos grasos

Al final de los experimentos de esta serie, la biomasa fue separada y se calculó el contenido de lípidos totales. A partir de la fracción lipídica de la biomasa se ha determinado su composición en ácidos grasos. Estos ácidos grasos han sido agrupados en saturados, monoinsaturados, poliinsaturados, esenciales, y ácidos grasos superiores poliinsaturados n-3; también, se ha calculado la relación n3/n6.

En términos de contenido total de lípidos, la biomasa de *C. pyrenoidosa* alcanzó un 47,4% con 10% de CO₂, Figura 5.74. Se ha observado que no existen diferencias apreciables cuando se compara el contenido de lípidos totales máximo con aquellos obtenidos en cultivos que utilizan en la fase gas otros porcentajes de CO₂. El contenido de lípidos totales fue mayor que el reportado para *C. pyrenoidosa* por Tang *et al.* (2011), en medio de cultivo sintéticos, concentración de CO₂ 10% y temperatura 25°C.

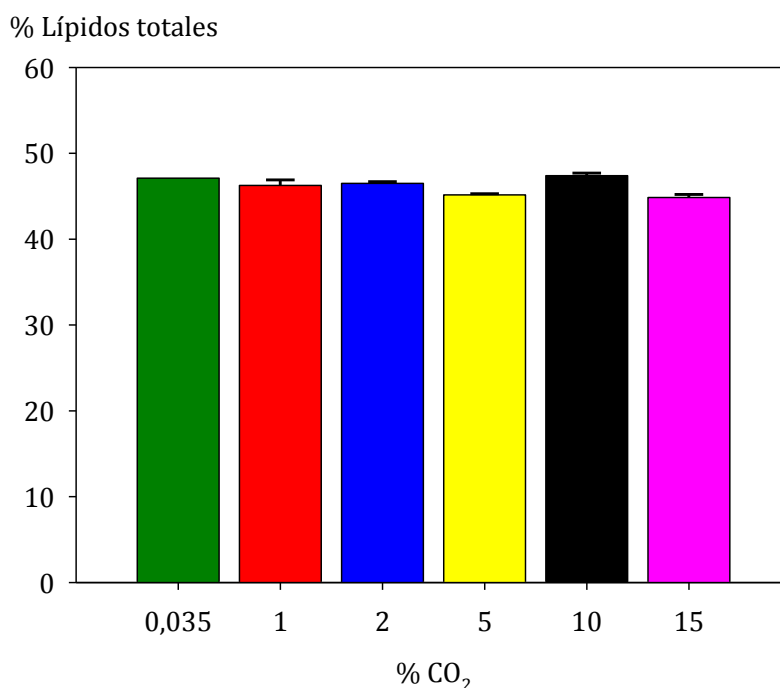


Figura 5.74 Contenido de lípidos totales al final de cada experimento, con *C. pyrenoidosa* en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas al 50% con diferentes % CO₂. 0,035% (■), 1% (■), 2% (■), 5% (■), 10% (■) y 15%(■).

El perfil de ácidos grasos de la fracción lipídica de la biomasa se determinó al final del experimento en todos los cultivos, expresándose como porcentaje respecto al total de ácidos grasos. A partir de los cromatogramas obtenidos, se han calculado, los porcentajes de cada una de las fracciones de ácidos grasos.

En general, en todos los experimentos de esta serie el ácido graso más abundante fue el 18:1, con 28,3% en el medio con concentración 15% de CO₂, excepto cuando se ha utilizado el porcentaje 0,035 de CO₂ donde el ácido mayoritario fue 18:3n3. Los valores de la fracción de saturados que se observaron, disminuyó cuando aumentó el % de CO₂. El mayor porcentaje se registró en la fracción de poliinsaturados siendo el valor medio más alto detectado de poliinsaturados 41,7%, obtenido en el cultivo con 0,035% de CO₂, Tabla 5.39. Por otra parte, los valores de la fracción de esenciales son próximos a los observados para la fracción POL. Los principales ácidos grasos poliinsaturados identificados fueron: 18:2n3, 18:2n6, 18:3n3, 18:4n3, 20:2n6, 20:5n3 y 22:5n3, Tablas D.97 a D.126 (Anexo D). El valor más alto de la relación

n3/n6 fue 1,52 a concentración 2% de CO₂; este valor está próximo al rango donde se considera que la biomasa tiene cierto valor nutricional. En este sentido, la bibliografía indica que la biomasa producida en el cultivo puede tener una aceptable calidad nutricional si la relación n3/n6 está en el rango 2-5, Webb y Chu (1982).

Cabe indicar que los resultados obtenidos son consistentes con la idea expresada por Hoshida *et al.* (2005), que indica que la concentración de CO₂ tiene un efecto esencial en la formación de los ácidos grasos.

Tabla 5.39. Composición en ácidos grasos de la fracción lipídica de *C. pyrenoidosa* en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas al 50%, a diferentes concentraciones de CO₂.

CO ₂ (%)	SAT	MON	POL	ESE	AGSP	n3/n6
0,035	28,5 ± 0,2	14,3 ± 0,1	41,7 ± 0,1	34,7 ± 0,1	0,447 ± 0,0	1,23 ± 0,01
1	28,2 ± 0,3	27,9 ± 0,7	37,5 ± 0,7	31,2 ± 0,9	1,37 ± 0,21	1,29 ± 0,08
2	27,1 ± 0,5	25,9 ± 0,9	40,0 ± 0,2	35,3 ± 0,0	0,670 ± 0,081	1,52 ± 0,01
5	26,4 ± 0,1	27,1 ± 0,1	39,1 ± 0,1	35,1 ± 0,2	0,749 ± 0,029	1,47 ± 0,00
10	23,7 ± 0,2	30,1 ± 0,2	39,5 ± 0,4	34,5 ± 0,4	0,510 ± 0,013	1,46 ± 0,02
15	22,5 ± 0,1	30,3 ± 0,2	40,2 ± 0,7	34,2 ± 0,8	0,883 ± 0,007	1,31 ± 0,02

d) Composición elemental de la biomasa

Cabe señalar que en todos los cultivos se registraron diferencias en la composición elemental de la biomasa separada. Este hecho se puede justificar considerando que el porcentaje de CO₂ tiene un efecto positivo en la composición elemental de la biomasa. Se ha observado que los contenidos del 'N' y 'O' disminuyeron cuando aumentó el % de CO₂. El porcentaje más alto en la biomasa de *C. pyrenoidosa* correspondió al 'C', mientras que el 'S' fue el de menor contenido, Figura 5.75. Se observó diferencias apreciables en el contenido de nitrógeno entre las biombras obtenidas utilizando distintos medios de cultivos, y este hecho ha conducido a que la relación C/N estuviese en el rango 4,5-7,1.

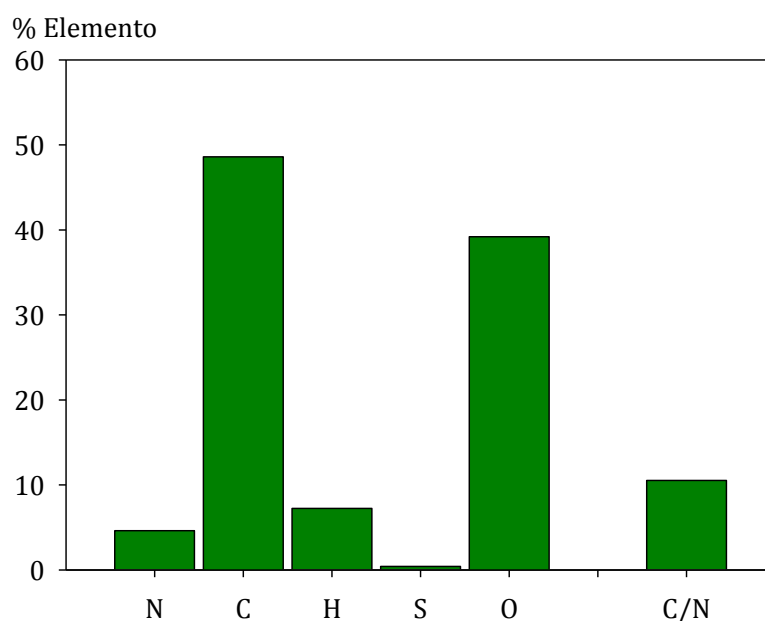


Figura 5.75 Composición elemental de la biomasa de *C. pyrenoidosa* determinada al final de los cultivos, en experimentos realizados usando aguas de lavado de aceitunas al 50% con 10% CO₂, Exp. 7 ALFC.

5.4.4.2 Cultivos realizados con aguas de lavado de aceites

A. Producción de biomasa

A través de los resultados experimentales, se calcularon los valores de concentración de biomasa (x), y los datos utilizados para la representación gráfica frente al tiempo t (h), que permitieron obtener las curvas de crecimiento y establecer la duración de la fase exponencial, tal como se indica a título de ejemplo para tres cultivos de esta serie en la Figura 5.76.

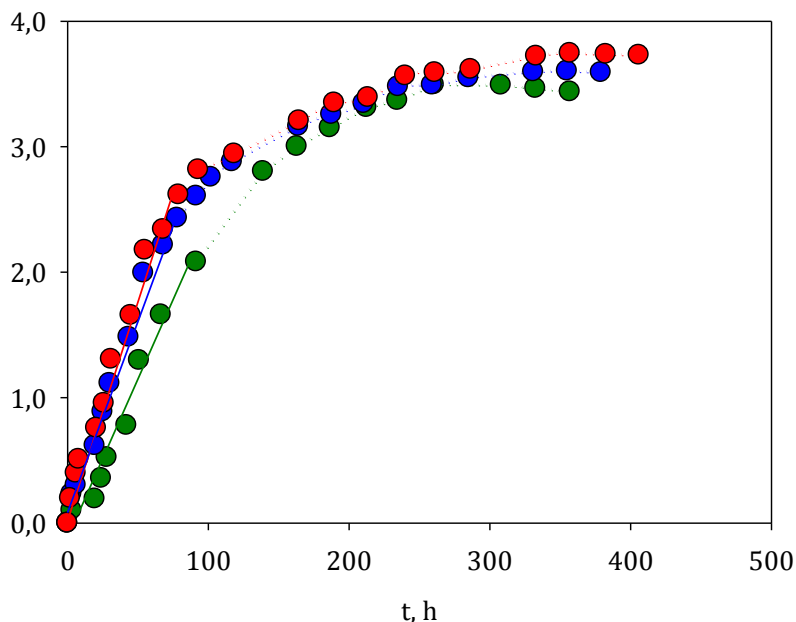


Figura 5.76 Curvas de crecimiento de *C. pyrenoidosa*, en cultivos realizados con aguas de lavado de aceites al 30% con diferentes % de CO_2 en la fase gas, 1% (●), 10% (●), 15% (●). Se operó a 25°C y a un nivel de aeración de 1 v/v/min, en los experimentos 2 ALAC, 8 ALAC y 10 ALAC.

En general, en los cultivos de esta serie no se ha observado fase de adaptación. Por otra parte, el valor más alto de la concentración de biomasa fue $1,60 \text{ g dm}^{-3}$ usando 30% de aguas lavado de aceites como medio de cultivo con adición de 10% CO_2 en la fase gas, Tabla 5.40. Como se mencionó anteriormente, con respecto a los experimentos 7 ALA y 8 ALA, debe tenerse en cuenta que el medio de cultivo que se ha usado fue 30% de aguas de lavado de aceites con una concentración 0,035% de CO_2 , siendo diferente en todas las especificaciones físico-químicas de las aguas usadas en esta serie experimental, Tablas 5.3 y 5.4, ya que corresponden a lotes diferentes, tal como se puede apreciar en estas tablas.

Tabla 5.40. Concentraciones de biomasa más elevadas, velocidades específicas máximas de crecimiento y productividades de biomasa, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites y adición de dióxido de carbono en la fase gas de entrada al fotobiorreactor

EXP	CO ₂ (%)	$x_{\max}$ (g dm ⁻³)	μ_m (h ⁻¹)	$P_b 10^3$ (g dm ⁻³ h ⁻¹)
<u>7 ALA</u> <u>8 ALA</u>	0,035	0,218 ± 0,013	0,0275 ± 0,00	1,40 ± 0,30
<u>1 ALAC</u> <u>2 ALAC</u>	1	0,283 ± 0,018	0,0277 ± 0,004	3,55 ± 0,10
<u>3 ALAC</u> <u>4 ALAC</u>	2	0,425 ± 0,010	0,0289 ± 0,004	4,20 ± 0,10
<u>5 ALAC</u> <u>6 ALAC</u>	5	0,697 ± 0,00	0,0299 ± 0,005	4,50 ± 0,00
<u>7 ALAC</u> <u>8 ALAC</u>	10	1,60 ± 0,120	0,0331 ± 0,006	5,70 ± 0,00
<u>9 ALAC</u> <u>10 ALAC</u>	15	1,36 ± 0,020	0,0309 ± 0,003	3,30 ± 0,00

A partir de los resultados obtenidos, los valores de la velocidad específica máxima de crecimiento y la productividad aumentan con el porcentaje de dióxido de carbón, de 1 a 10%, y posteriormente disminuyó, Figura 5.77.

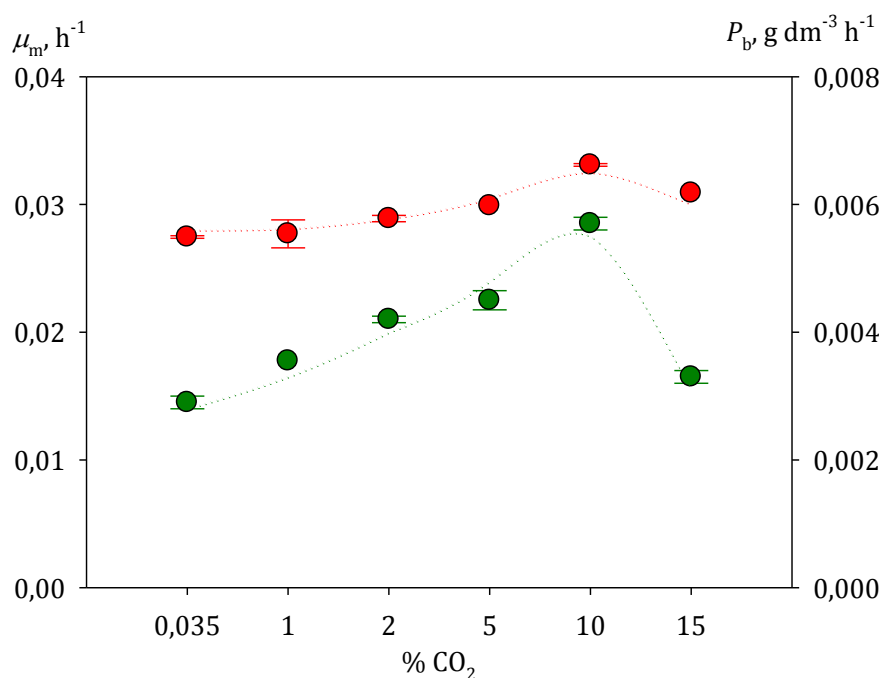


Figura 5.77 Velocidades específicas máxima de crecimiento, μ_m , h⁻¹ (●), y productividades volumétricas en biomasa, P_b , g dm⁻³ h⁻¹ (●). Influencia de la concentración en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites al 30% con diferentes % de CO₂.

Se ha observado que el crecimiento fue más alto cuando se utilizó 10% de CO₂. Este efecto, probablemente, se debió a una mayor disponibilidad de dióxido de carbono disuelto por parte de la microalga, Gonçalves *et al.* (2016). A altas concentraciones de CO₂ en el medio de cultivo, se produce un efecto acidificante (una caída en el pH), lo que afecta el crecimiento de las microalgas, Zeiler *et al.* (1995).

B. Composición bioquímica de la biomasa

a) Pigmentos

A partir de los resultados obtenidos, se observó que los valores de %CHL, $\text{CHL}_a/\text{CHL}_b$, CHL/N , %Ca, CHL/Ca , y Ca/N con concentración 1% de CO_2 son casi similares a los obtenidos con 0,035% de CO_2 .

Generalmente, a partir de concentraciones de CO_2 en la fase gas en el rango 2-15%, se observó que los valores de %CHL y CHL/N disminuyeron durante el transcurso, Figura 5.78. Por otra parte los valores de %Ca, CHL/Ca y Ca/N , aumentaron en la fase exponencial y luego comenzaron a disminuir en la fase de desaceleración del crecimiento hasta el final del experimento, Figura 5.79. Cabe señalar que los valores de %CHL presenta una variabilidad diferente para cada concentración de CO_2 . En este sentido, cabe indicar que el % de CO_2 tiene un papel clave en la formación de los pigmentos.

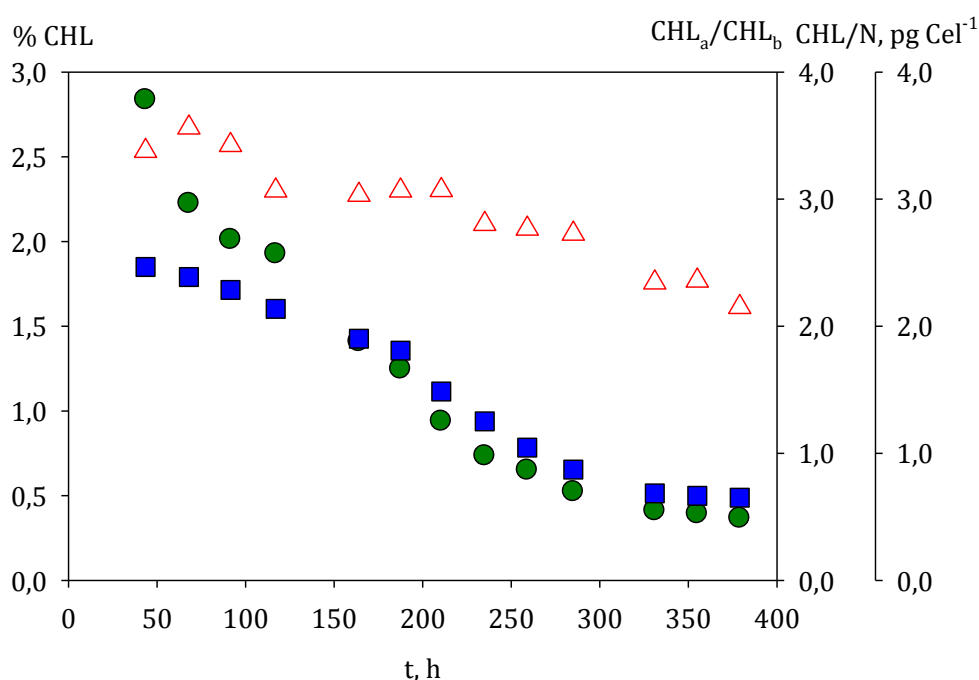


Figura 5.78 Variación del porcentaje de clorofilas totales (●), relación entre los contenidos de clorofilas 'a' y 'b' (△), y contenido de clorofilas totales por célula (■) en *C. pyrenoidosa* con el tiempo, en cultivos usando aguas de lavado de aceites al 30% y 10% CO_2 en la fase gas, Exp. 8 ALFA.

Por otro parte, se determinó que los contenidos de clorofila 'b' son más elevados que los de clorofila 'a'. Así mismo, se ha detectado que la relación CHL/Ca , en todos los cultivos aumentó durante la fase exponencial y luego disminuyó hasta el final del experimento.

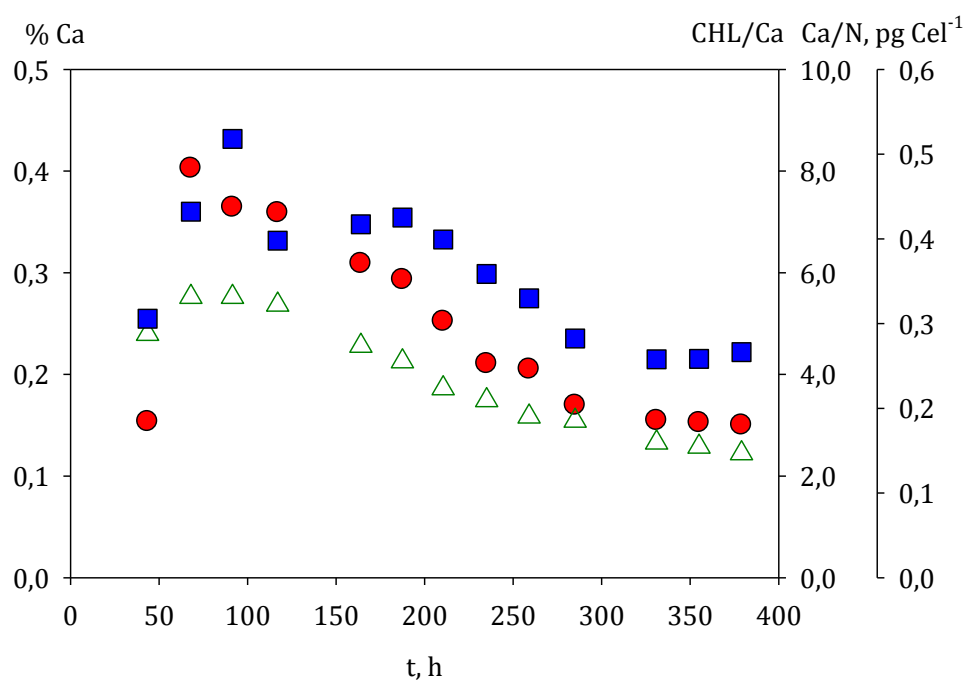


Figura 5.79 Variación del porcentaje de carotenoides totales (●), relación entre los contenidos de clorofilas y carotenoides totales (△), y de carotenoides por célula (■) en *C. pyrenoidosa* con el tiempo, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites al 30% y 10% CO₂ en la fase gas, Exp. 8 ALAC.

En general, se observa que la relación entre concentración neta de clorofilas y carotenoides totales con la concentración de biomasa neta producida aumenta desde el inicio del experimento hasta la fase de desaceleración y luego disminuye hasta al final del cultivo. El ajuste de $(CHL-CHL_0)$ vs $(x-x_0)$ y $(Ca-C_0)$ vs $(x-x_0)$ en estos periodos de tiempo es aceptable, y por ello se puede indicar que la formación de pigmentos está asociada a la generación de biomasa al menos en la fase exponencial de crecimiento y parte de la zona de desaceleración, Figura. 5.80. Por tanto, mediante el ajuste realizado se ha podido determinar los coeficientes estequiométricos, α_{CHL} o α_{Ca} , para el cultivo.

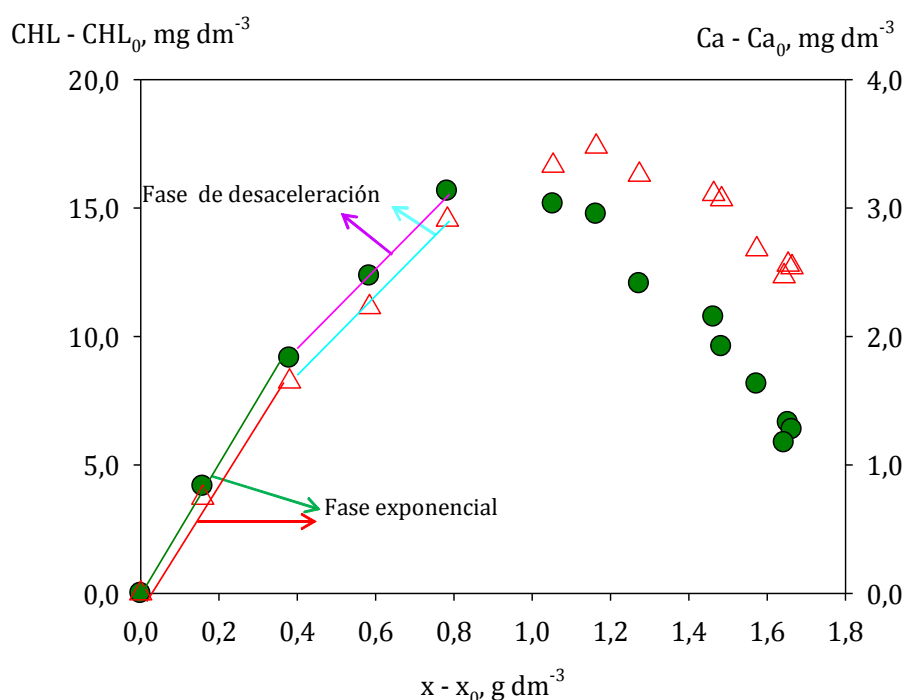


Figura 5.80 Relación entre la concentración neta de clorofilas totales (●) y carotenoides totales (Δ) vs concentración de biomasa neta obtenida de *C. pyrenoidosa* en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites al 30% con 10% CO₂, Exp. 8 ALAC.

Para las concentraciones de CO₂ usadas, y partir de representaciones similares a la Figura 5.86, se ha calculado las velocidades específicas máxima y productividades volumétricas de los pigmentos, Tabla 5.41.

Tabla 5.41. Velocidades específicas máximas y productividades volumétricas en formación de clorofilas y carotenoides, en cultivos con aguas de lavado de aceites al 30% y diferentes % de CO₂

CO ₂ (%)	$q_{\text{CHL}} 10$ (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	$P_{\text{CHL}} 10^2$ (mg dm ⁻³ h ⁻¹)	$q_{\text{Ca}} 10^2$ (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	$P_{\text{Ca}} 10^2$ (mg dm ⁻³ h ⁻¹)
0,035	4,13 ± 0,66	2,07 ± 0,33	10,6 ± 0,14	0,532 ± 0,070
1	3,60 ± 0,41	3,59 ± 0,11	9,14 ± 0,83	0,994 ± 0,00
2	4,97 ± 0,30	3,63 ± 0,23	9,54 ± 0,48	1,39 ± 0,084
5	5,01 ± 0,12	4,66 ± 0,25	10,0 ± 0,15	1,60 ± 0,11
10	7,33 ± 0,61	7,18 ± 0,20	12,7 ± 0,15	2,19 ± 0,88
15	5,19 ± 0,11	3,14 ± 0,17	9,42 ± 0,16	1,57 ± 0,83

Se observó que las velocidades específicas máximas y productividades volumétricas de ambos pigmentos están sincronizadas, presentando el máximo valor para el mismo % CO₂ en la fase gas (10%). Sin embargo, los valores de P_{CHL} y P_{Ca} aumentaron con el %CO₂ en el rango 0,035-10%, y luego disminuyeron. En este caso, se puede indicar que las concentraciones de CO₂ pueden afectar a la producción y composición bioquímica en las microalgas.

b) Proteínas

En los resultados obtenidos para todas las concentraciones de CO₂, se observó que los parámetros %P y P/N disminuían en el transcurso de todos los experimentos. Al final de los cultivos, se analizó la biomasa de *C. pyrenoidosa*, y a partir del %N se determinó el contenido de proteínas crudas, Figura 5.81.

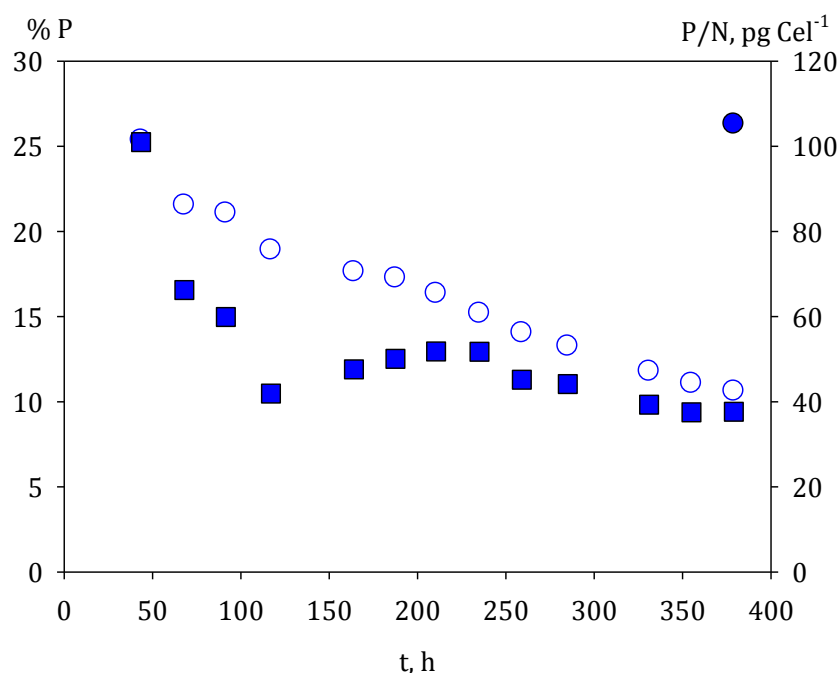


Figura 5.81 Variación del porcentaje de proteínas (○), y contenido de proteínas por célula (■) con el tiempo en *C. pyrenoidosa*, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites al 30% y 10% CO₂. Contenido de proteínas crudas al final del cultivo (●), Exp. 8 ALAC.

Se ha observado, que al final del cultivo, el porcentaje de proteínas es menor que el obtenido en otras series experimentales. Los medios de cultivos fueron pobres en nitrógeno, y ello ha afectado a la producción en proteínas. La limitación de nitrógeno conllevará una disminución de la fotosíntesis y de la formación de proteínas, Li *et al.* (2013).

Los ajustes obtenidos en las representaciones de (P-Po) vs (x-xo) han sido aceptable en todos los cultivos, considerando por separado las fases exponencial y de desaceleración, y ello ha permitido determinar los coeficientes estequiométricos, α_p , en ambas fases. En esta serie de experimentos, en los que se ha usado como medio de cultivo aguas de lavado de aceites al 30% con porcentajes de CO₂ en el rango 0,035-15%, esta apreciación sobre α_p permite justificar que la formación de proteínas está asociada al crecimiento al menos en la fase exponencial, Figura 5.82. A partir de estos valores de α_p se ha podido calcular las velocidades específicas máximas y productividades volumétricas de formación de proteínas, en la fase exponencial y en parte de la fase de desaceleración (concretamente en los experimentos con 10 y 15% de CO₂).

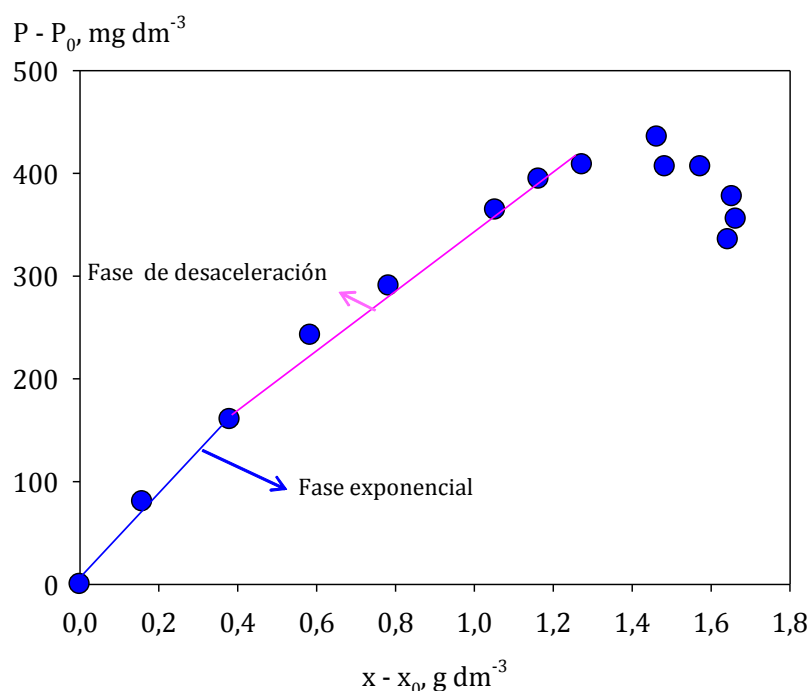


Figura 5.82 Relación entre la concentración neta de proteínas (●) y la concentración de biomasa neta producida usando *C. pyrenoidosa* en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites al 30% y 10% CO₂, Exp. 8 ALAC. .

En general, se observó que el valor de q_p aumentó con el %CO₂ en la fase gas, por otra parte el valor P_p se incrementó en el rango 0,035-10% de CO₂ y luego disminuyó. Este hecho permite justificar que, la concentración de CO₂ tiene influencia directa sobre la formación de proteínas, Tabla 5.42.

Tabla 5.42. Velocidades específicas máximas y productividades volumétricas en proteínas en cultivos de *C. pyrenoidosa* realizados usando aguas de lavado de aceites al 30% y diferentes %CO₂

CO ₂ (%)	q_p (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	P_p 10 (mg dm ⁻³ h ⁻¹)
0,035	10,2 ± 0,1	3,61 ± 0,12
1	12,0 ± 0,6	9,92 ± 0,71
2	-	10,8 ± 0,12
5	12,2 ± 0,5	11,0 ± 0,70
10	13,4 ± 0,4	15,4 ± 0,89
15	13,7 ± 0,7	8,12 ± 0,31

También los valores medios de proteína cruda determinada al final del cultivo, %P_{Cruda}, junto con la desviación estándar, se ha calculado para todas las concentraciones de CO₂ ensayadas, Tabla 5.43. El valor más alto fue 44,4% para 0,035% de CO₂. Estos porcentajes de proteínas obtenidos están dentro del rango general indicado (0-55%) en algas unicelulares del género *Chlorella*, Dubinsky *et al.* (1980).

Tabla 5.43. Porcentajes de proteínas crudas, en cultivos de *C. pyrenoidosa* realizados usando aguas de lavado de aceites al 30% y diferentes porcentajes de dióxido de carbono.

CO ₂ (%)	0,035	1	2	5	10	15
P _{Cruda} (%)	44,4 ± 0,2	27,4 ± 0,0	44,2 ± 0,4	41,9 ± 0,4	27,1 ± 0,8	24,4 ± 0,1

c) Lípidos totales y ácidos grasos

Al final de los experimentos, se analizó la biomasa de *C. pyrenoidosa* para determinar el porcentaje de lípidos totales. En todos los medios de cultivos con diferentes concentraciones de CO₂ en la fase gas, los porcentajes de lípidos totales estuvieron en el rango de 45,5-48,9%, Figura 5.83.

Los medios de cultivos fueron pobres en nitrógeno, y ello ha facilitado que *C. pyrenoidosa* incremente su la capacidad de producir lípidos. La limitación de nitrógeno o la inanición resultarán en un aumento de la síntesis de lípidos y carbohidratos, Simionato *et al.* (2013). Por otra parte, las concentraciones de CO₂ tiene un papel clave en el control del pH durante el transcurso del cultivo, y esto ha afectado a la producción de lípidos totales. Estos resultados son similares a los obtenidos por Deepti *et al.* (2019), que observaron que cuando las microalgas se han cultivado bajo un nivel de nutriente limitante, con diferentes concentraciones de CO₂ y con pH controlado, se facilita la síntesis de lípidos.

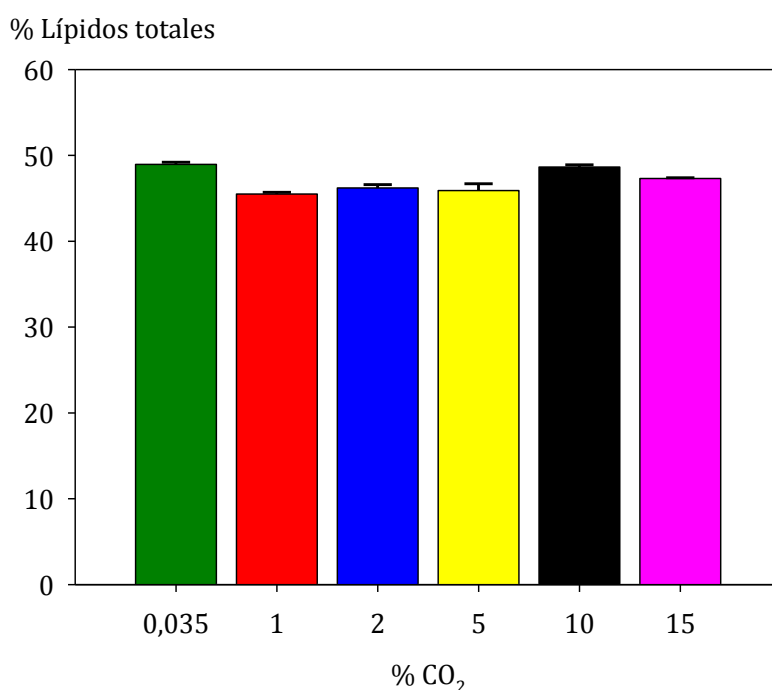


Figura 5.83 Contenido de lípidos totales al final de cada experimento, con *C. pyrenoidosa* en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites al 30% y diferentes % CO₂. 0,035% (■), 1% (■), 2% (■), 5% (■), 10% (■) y 15%(■).

El perfil de ácidos grasos de la fracción lipídica de la biomasa se determinó al final del experimento en todos los cultivos, expresándose como porcentaje respecto al total de ácidos grasos. A partir de los cromatogramas obtenidos, se han calculado, los porcentajes de cada una de las fracciones de ácidos grasos.

A partir de los resultados se observó que con las diferentes concentraciones de CO₂, el ácido graso más abundante fue el oleico, 18:1. Otros ácidos grasos poliinsaturados identificados fueron: 18:2n3, 18:3n3, 18:4n3, 20:2n6, 20:5n3 y 22:5n3 (Tablas D.127 a D.156, Anexo D).

Se detectó el valor más alto de SAT 28,4% en cultivos usando el 2% de CO₂. En general, se ha observado que la fracción de ácidos grasos MON aumentó con el %CO₂. Por otra parte, las fracciones de POL y ESE presentan los valores más altos de la fracción lipídica y concretamente para una concentración de 0,035% de CO₂. Al igual que con las anteriores fracciones, el porcentaje de AGSP no presenta una

tendencia definida con los porcentajes de CO₂ en la fase gas. El valor más alto de la relación n3/n6 fue 1,68 para concentración del 5% de CO₂; este valor está próximo al rango donde se considera que la biomasa tiene cierto valor nutricional, Tabla 5.44.

Tabla 5.44. Composición en ácidos grasos de la fracción lipídica de *C. pyrenoidosa* en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites al 30%, a diferentes concentraciones de CO₂.

CO ₂ (%)	SAT	MON	POL	ESE	AGSP	n3/n6
0,035	27,0 ± 0,3	11,7 ± 0,5	47,1 ± 0,7	41,9 ± 0,6	0,566 ± 0,076	1,56 ± 0,20
1	27,7 ± 0,2	28,4 ± 0,6	36,6 ± 0,0	32,0 ± 0,1	0,182 ± 0,000	1,18 ± 0,01
2	28,4 ± 0,0	27,7 ± 0,5	38,6 ± 0,3	34,0 ± 0,3	0,434 ± 0,018	1,61 ± 0,01
5	24,0 ± 0,3	30,2 ± 0,9	37,9 ± 0,2	32,9 ± 0,0	0,179 ± 0,018	1,68 ± 0,03
10	27,1 ± 0,2	32,0 ± 0,3	33,6 ± 0,1	29,0 ± 0,2	0,218 ± 0,019	1,31 ± 0,01
15	24,6 ± 0,3	30,5 ± 0,2	37,6 ± 0,2	32,7 ± 0,3	0,174 ± 0,074	1,27 ± 0,03

En general, los perfiles de ácidos grasos con altos porcentajes de CO₂ mostraron una disminución en la fracción de saturados y un aumento en la de monoinsaturados. Estos resultados son similares a los obtenidos por Zhilan *et al.* (2016), que observaron que *Chlorella sorokiniana*, en cultivo heterotrófico y con alta concentración de CO₂, los perfiles de ácidos grasos saturados disminuyeron, mientras que los de monoinsaturados aumentaron.

d) Composición elemental de la biomasa

El análisis de la composición elemental se realizó a la biomasa seca obtenida al final de cada cultivo. A partir de los resultados, la biomasa procedente de ensayo a un nivel de 2% CO₂ contenía el mayor porcentaje de nitrógeno y azufre, 7,1% y 0,47%, respectivamente. El contenido de carbono fue más alto en todas las concentraciones de CO₂, siendo el valor más elevado (50,1%) a 10% CO₂ y el mínimo (45,1%) a 5% CO₂. Por otra parte, la relación C/N más alta (12,8) se obtuvo con 15% CO₂, Figura 5.84.

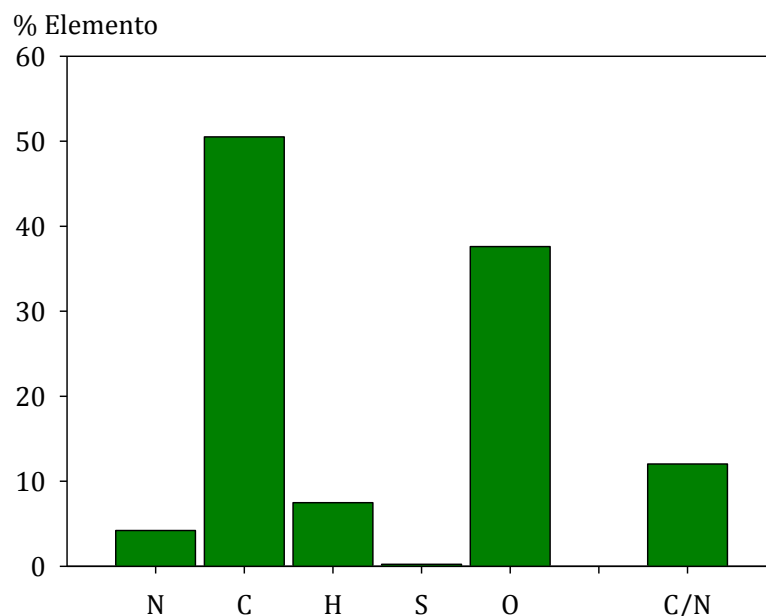


Figura 5.84 Composición elemental de la biomasa de *C. pyrenoidosa* determinada al final de los cultivos, en experimentos realizados usando aguas de lavado de aceites al 30% y 10% CO₂, Exp. 8 ALAC.

5.4.4.3 Cultivos realizados con aguas de almazaras y aguas residuales urbanas de tratamiento biológico

A. Producción de biomasa

Los resultados experimentales correspondientes al estudio del efecto de aguas de almazaras mezcladas con aguas residuales urbanas de tratamiento biológico y usando una concentración del 10% de CO₂, como medio de cultivo, se recogen en las Tablas D.157 a D.162 y sus representaciones gráficas en las Figuras D.53 a D.54 (Anexo D).

Inicialmente, se han obtenido las curvas de crecimiento para los experimentos realizados usando aguas de almazaras mezcladas con aguas residuales urbanas de tratamiento biológico y una concentración de 10% de CO₂, con un caudal volumétrico de fase gaseosa de 1 v/v/min y a 25°C en los fotobiorreactores. En los cultivos de esta serie no se detecta fase de adaptación, Figura 5.85.

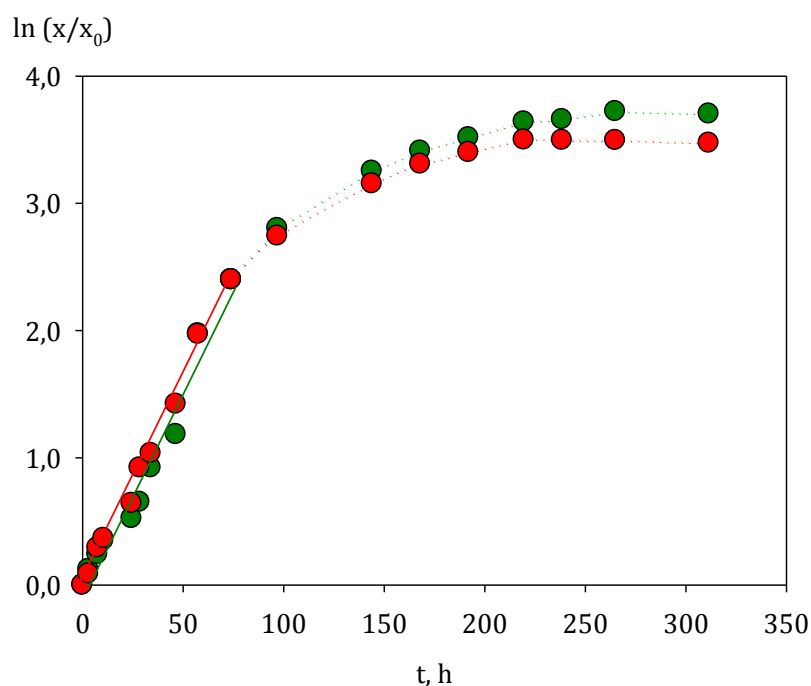


Figura 5.85 Curvas de crecimiento de *C. pyrenoidosa*, en cultivos realizados con 50% aguas de lavado de aceitunas, 30% aguas de lavado de aceites, aguas residuales urbanas de tratamiento biológico, y 10% de CO₂ en la fase gas, 1 ALFARUC (●) y 2 ALFARUC (●). Se operó a 25°C con un nivel de aeración de 1 v/v/min, en los experimentos 1 y 2 ALFARUC.

A partir de los datos primarios se han determinado los valores medios de la concentración de biomasa más elevada, la velocidad específica máxima de crecimiento y la productividad volumétrica en biomasa, junto con los valores de la desviación estándar, Tabla 5.45. Se ha observado que el valor de la concentración de biomasa fue 0,94 g dm⁻³ usando como medio de cultivo 50% de aguas de lavado de aceitunas, 30% de aguas lavado de aceites, y 20% aguas residuales urbanas de tratamiento biológico con adición de 10% CO₂ en la fase gas.

Tabla 5.45. Concentraciones de biomasa más elevadas, velocidades específicas máximas de crecimiento y productividades de biomasa, en cultivos realizados con aguas de almazaras y aguas residuales urbanas de tratamiento biológico, y 10% de CO₂ en la fase gas de entrada al fotobiorreactor

EXP	$x_{\max}$ (g dm ⁻³)	μ_m (h ⁻¹)	$P_b 10^3$ (g dm ⁻³ h ⁻¹)
<u>7 ALFC</u> <u>8 ALFC</u>	1,03 ± 0,01	0,0315 ± 0,0006	3,35 ± 0,03
<u>7 ALAC</u> <u>8 ALAC</u>	1,60 ± 0,12	0,0331 ± 0,0001	5,70 ± 0,00
<u>1 ALFARUC</u> <u>2 ALFARUC</u>	0,94 ± 0,11	0,0322 ± 0,0003	4,35 ± 0,02

Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Hodaifa *et al.* (2013), donde se observa que los valores más elevados de la concentración de biomasa, velocidad específica máxima de crecimiento y productividad volumétrica en biomasa se obtienen al utilizar la microalga *S. obliquus* en un cultivo formado por 25% de aguas de almazaras mezclada con aguas residuales urbanas de tratamiento biológico.

A partir de los resultados obtenidos y considerando un porcentaje constante de CO₂ (10%), los valores de las velocidades específicas máxima de crecimiento y las productividades volumétricas en biomasa se vieron afectadas al cambiar el medio de cultivo, Figura 5.86.

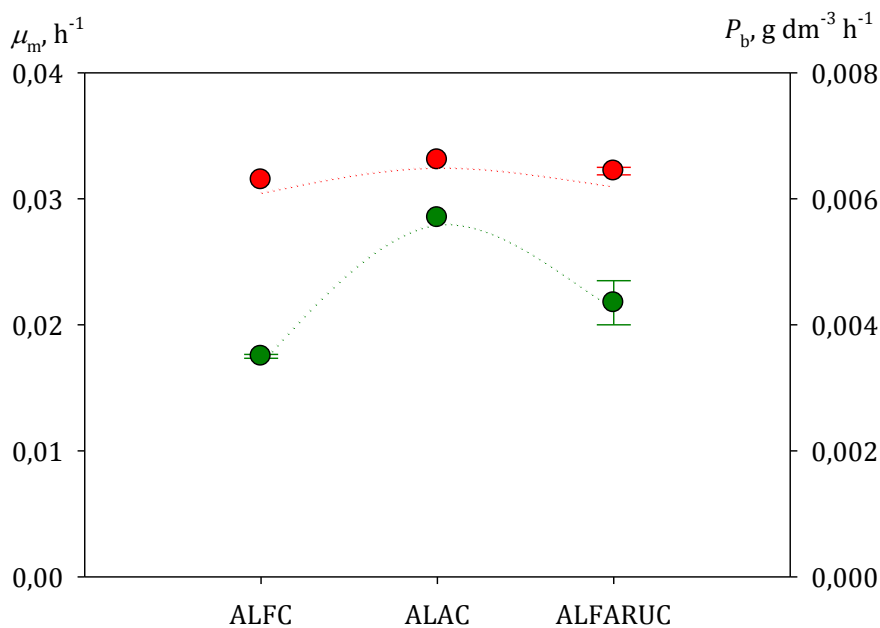


Figura 5.86 Velocidades específicas máxima de crecimiento, μ_m , h⁻¹ (●), y productividades volumétricas en biomasa, P_b , g dm⁻³ h⁻¹ (●) en cultivos realizados usando aguas de almazaras, aguas residuales urbanas de tratamiento biológico y 10% de CO₂.

En general, a través de los valores de μ_m y P_b , se observó que las aguas residuales urbanas no favorecen la formación de biomasa, ya que los valores de μ_m eran muy próximos, mientras que los valores de P_b eran más altos cuando se usaba aguas de lavado de aceites como medio de cultivo.

B. Composición bioquímica de la biomasa

a) Pigmentos

A través de los resultados obtenidos en los experimentos de esta serie, se ha observado que los valores de %CHL y %Ca, empezaron a disminuir durante el transcurso del cultivo hasta el final del mismo, en forma muy lenta. Por otra parte, también cabe destacar que los contenidos de clorofilas totales y carotenoides por célula a lo del experimento presentan una evolución diferente al %CHL y %Ca, ya que aumentaron con el tiempo de cultivo, Figuras 5.87 y 5.88.

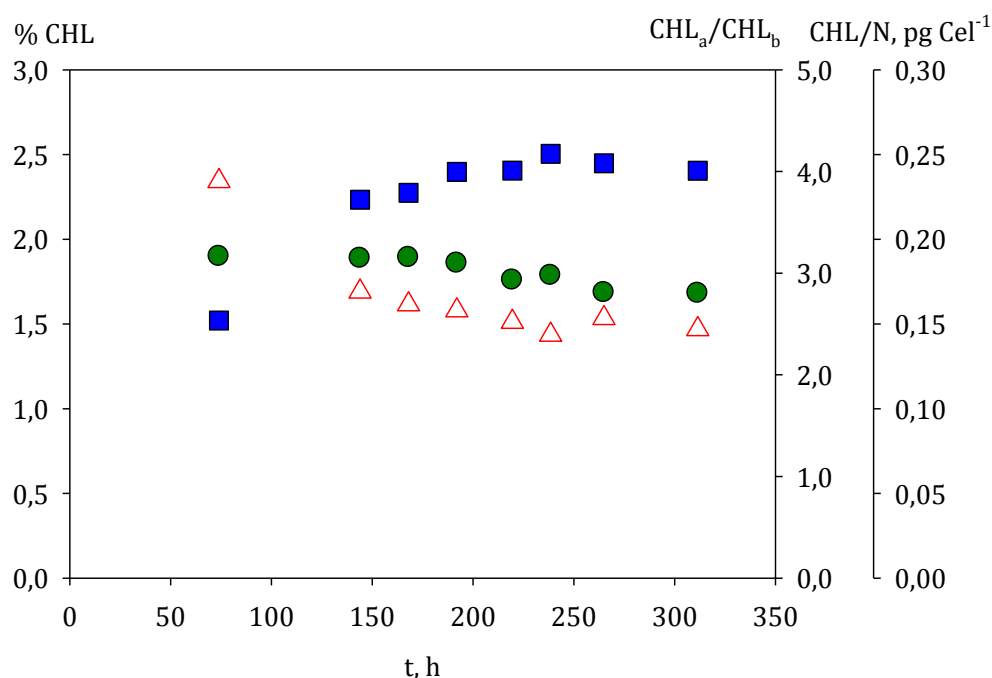


Figura 5.87 Variación del porcentaje de clorofilas totales (●), relación entre los contenidos de clorofilas 'a' y 'b' (△), y contenido de clorofilas totales por célula (■) en *C. pyrenoidosa* con el tiempo, en cultivos usando aguas de almazaras, aguas residuales urbanas de tratamiento biológico y 10% de CO₂ en la fase gas, Exp. 2 ALFARUC.

En lo referente a la relación CHL_a/CHL_b y CHL/Ca, se observó que ambos parámetros disminuían durante el transcurso del cultivo. El contenido de clorofila 'b' aumentó y la concentración de clorofila 'a' disminuyó, este hecho justifica la variación observada en la relación CHL_a/CHL_b.

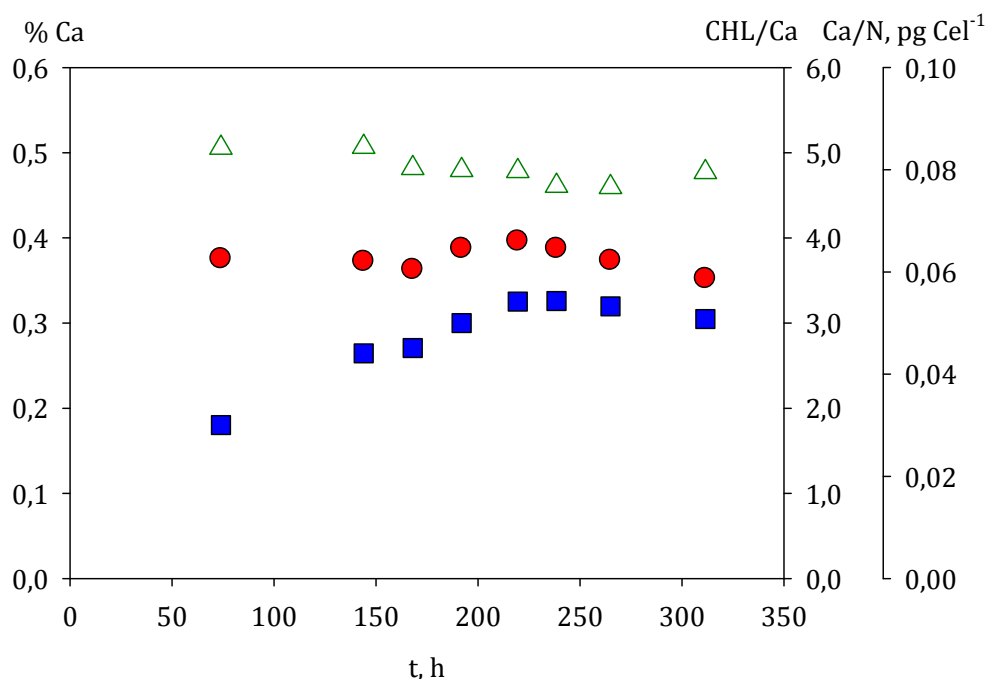


Figura 5.88 Variación del porcentaje de carotenoides totales (●), relación entre los contenidos de clorofilas y carotenoides totales (△), y de carotenoides por célula (■) en *C. pyrenoidosa* con el tiempo, en cultivos realizados usando aguas de almazaras, aguas residuales urbanas de tratamiento biológico y 10% de CO₂ en la fase gas, Exp. 2 ALFARUC.

Los contenidos de clorofilas totales determinados al final de los cultivos están en el rango 0,01 a 6,0%. En este punto, los resultados obtenidos están de acuerdo con lo indicado por Milner (1953), que señala que el porcentaje de clorofilas totales en *C. pyrenoidosa* se encuentra en el intervalo de 0,01 a 6,0%, dependiendo de las condiciones de cultivo.

En general, el ajuste de los datos de $(\text{CHL} - \text{CHL}_0)$ y $(\text{Ca} - \text{Ca}_0)$ vs $(x - x_0)$, ha sido posible en el transcurso de todo el experimento, Figura. 5.89. Por ello, se ha llevado a cabo un único ajuste que ha permitido determinar un solo coeficiente estequiométrico, α_{CHL} o α_{Ca} , para todo el cultivo. Este hecho sobre los coeficientes estequiométricos permite justificar que la formación de pigmentos está asociada al crecimiento en todo el cultivo.

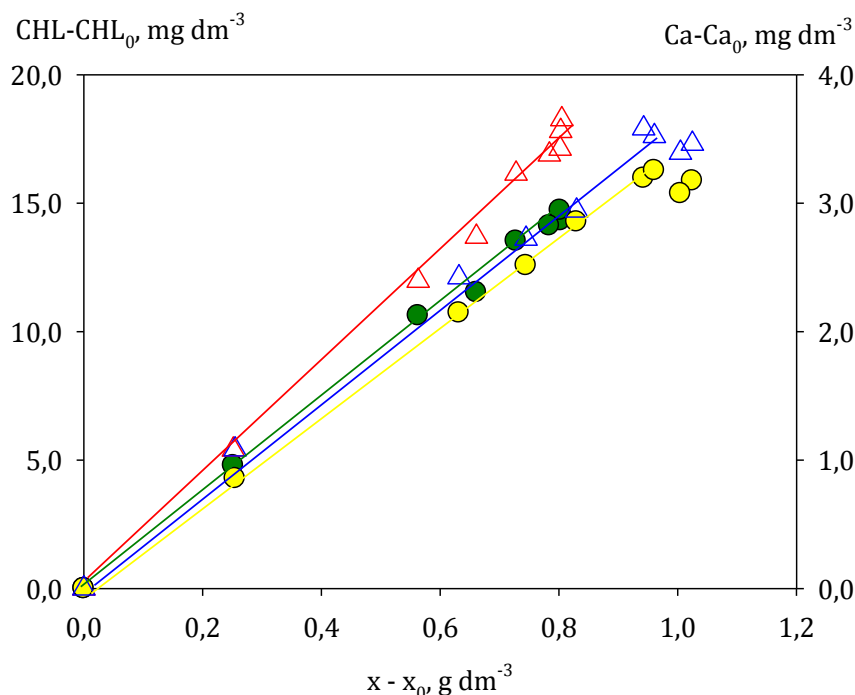


Figura 5.89 Relación entre la concentración neta de clorofilas totales (●), (○) y carotenoides totales (△), (△) vs concentración de biomasa neta obtenida de *C. pyrenoidosa* en cultivos realizados con aguas de almazaras, aguas residuales urbanas de tratamiento biológico y 10% de CO_2 , Exp. 1 y 2 ALFARUC.

A partir de estos valores de α_{CHL} o α_{Ca} se ha podido calcular las velocidades específicas máximas y productividades volumétricas de formación de clorofilas y carotenoides, Tabla 5.46. Se ha detectado que, las aguas residuales urbanas no aumentaron los valores de q_{CHL} , q_{Ca} y P_{Ca} , sólo se observó un ligero incremento en P_{CHL} . En general, cabe destacar que en el cultivo con 30% de ALA y 10% de CO_2 , se alcanzaron los valores más elevados de la velocidad específica máxima y productividad volumétrica en clorofilas y carotenoides totales, Tabla 5.46.

Tabla 5.46. Velocidades específicas máximas y productividades volumétricas en formación de clorofilas y carotenoides, en cultivos usando aguas de almazaras y aguas de almazaras mezcladas con aguas residuales urbanas de tratamiento biológico y 10% de CO_2

EXP	$q_{\text{CHL}} 10$ ($\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	$P_{\text{CHL}} 10^2$ ($\text{mg dm}^{-3} \text{h}^{-1}$)	$q_{\text{Ca}} 10^2$ ($\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	$P_{\text{Ca}} 10^2$ ($\text{mg dm}^{-3} \text{h}^{-1}$)
7 ALFC 8 ALFC	$5,49 \pm 0,88$	$3,57 \pm 0,02$	$10,9 \pm 0,19$	$1,06 \pm 0,08$
7 ALAC 8 ALAC	$7,33 \pm 0,61$	$7,18 \pm 0,20$	$12,7 \pm 0,15$	$2,19 \pm 0,88$
1 ALFARUC 2 ALFARUC	$5,41 \pm 0,39$	$7,31 \pm 0,52$	$11,8 \pm 0,48$	$1,59 \pm 0,07$

b) Proteínas

En esta serie, la composición de proteínas fue diferente al resto de las series experimentales. Se observó que, usando aguas de almazaras, aguas residuales urbanas de tratamiento biológico y 10% de CO₂ como medio de cultivo, el porcentaje de proteínas, %P, aumentaba hasta el final de la fase de desaceleración, y posteriormente comenzó a disminuir hasta el final del experimento, Figura 5.97. Por otra parte, se ha observado que el contenido de proteínas por célula disminuía durante el transcurso de todo el experimento; a partir del %N se determinó el contenido de proteínas crudas, Figura 5.90.

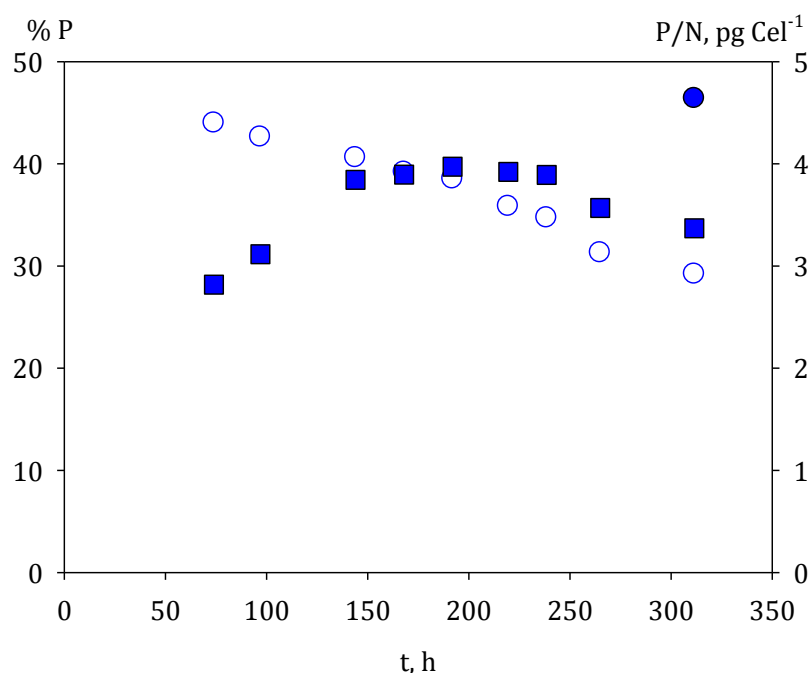


Figura 5.90 Variación de los porcentaje de proteínas (○), y contenido de proteínas por célula (■) con el tiempo en *C. pyrenoidosa*, en cultivos realizados usando aguas de almazaras, aguas residuales urbanas de tratamiento biológico y 10% CO₂. Contenido de proteínas crudas al final del cultivo (●), Exp. 2 ALFARUC.

Estos resultados pueden explicarse considerando que la síntesis de proteínas está relacionada con el contenido de N del medio de cultivo. Además, la fuente de nitrógeno es un indicador para determinar el parámetro %P. En este caso, se demuestra que las aguas residuales han afectado directamente la formación de proteínas al suministrar el nitrógeno en el medio de cultivo. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Weiguo *et al.* (2014), que indican que la concentración de nitrógeno en el medio puede afectar la composición bioquímica de las algas; cuando el cultivo se realiza en un medio con alta concentración en nitrógeno, el contenido de proteínas aumenta.

En general, el ajuste de $(P-P_0)$ vs $(x-x_0)$, ha sido posible en el transcurso de todo el experimento, a diferencia de lo observado en las otras series, Figura. 5.91. Por tanto, si se tiene un único ajuste se ha podido a determinar un solo coeficiente estequiométrico, α_p , para todo el cultivo. Este hecho indica que la formación de proteínas está asociada a la formación de biomasa en todo el cultivo.

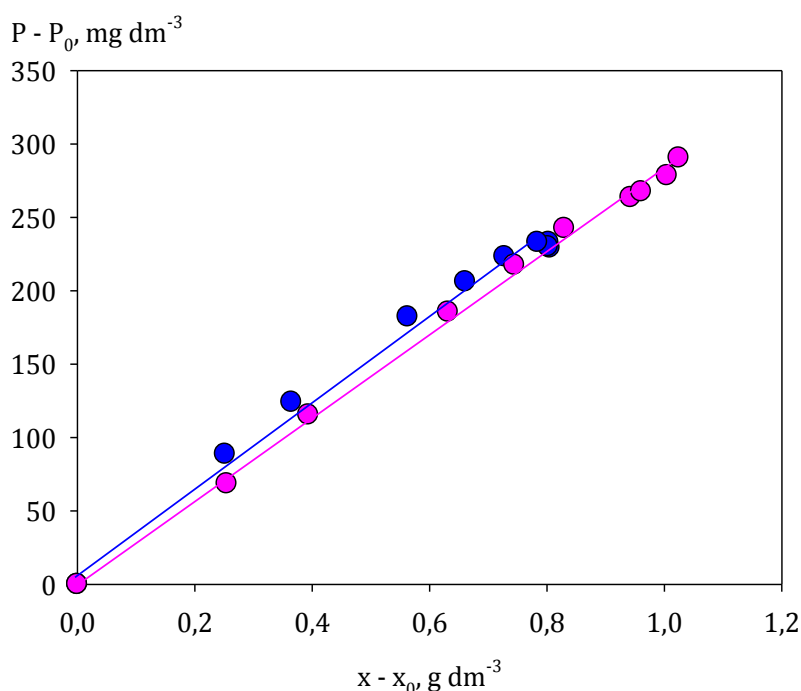


Figura 5.91 Relación entre la concentración neta de proteínas (●), (●) y la concentración de biomasa neta producida usando *C. pyrenoidosa* en cultivos realizados usando aguas de almazaras, aguas residuales urbanas de tratamiento biológico y 10% de CO₂, Exp. 1 y 2 ALFARUC.

A partir de este valor de α_p se ha podido calcular las velocidades específicas máximas y productividades volumétricas de formación de proteínas, Tabla 5.47. Cabe indicar que en el cultivo con 30% de ALA y 10% CO₂, se alcanzaron los valores más elevados de la velocidad específica máxima y productividad volumétrica en proteínas.

Tabla 5.47. Velocidades específicas máximas y productividades volumétricas en proteínas en cultivos de *C. pyrenoidosa* realizados usando aguas de almazaras, aguas residuales urbanas de tratamiento biológico y 10% de CO₂

EXP	q_p (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	P_p 10 (mg dm ⁻³ h ⁻¹)
<u>7 ALFC</u> <u>8 ALFC</u>	11,1 ± 0,6	6,85 ± 0,33
<u>7 ALAC</u> <u>8 ALAC</u>	13,4 ± 0,4	15,4 ± 0,9
<u>1 ALFARUC</u> <u>2 ALFARUC</u>	8,72 ± 0,3	11,8 ± 0,4

También los valores medios de proteínas crudas determinados al final del cultivo, %P_{Cruda}, junto con la desviación estándar correspondiente se ha calculado para cada uno de los experimentos. Se ha observado una tendencia definida, cuando se utilizó aguas residuales urbanas de tratamiento biológico en el medio de cultivo, se obtuvo el valor más alto de proteínas crudas. Tabla 5.48.

Tabla 5.48. Porcentajes de proteínas crudas, en cultivos de *C. pyrenoidosa* realizados usando aguas de almazaras, aguas residuales urbanas de tratamiento biológico y 10 % de CO₂

EXP	<u>7 ALFC</u> <u>8 ALFC</u>	<u>7 ALAC</u> <u>8 ALAC</u>	<u>1 ALFARUC</u> <u>2 ALFARUC</u>
P _{Cruda} (%)	28,9 ± 0,1	27,1 ± 0,8	46,3 ± 0,2

c) Lípidos totales y ácidos grasos

Al final de los experimentos, la biomasa fue recolectada y se determinó el contenido de lípidos. En términos de contenido total de lípidos, la biomasa de *C. pyrenoidosa* alcanzó un 49,0% en cultivo al 30% aguas de lavado de aceites y 10% CO₂, Figura 5.92. Cabe señalar que, el contenido del medio de cultivo tiene un efecto directo sobre la acumulación de lípidos totales. Se ha determinado que el medio de cultivo ALAC tiene una concentración muy pobre en nitrógeno; este hecho se considera un tipo de limitación, lo que tiene un efecto en el aumento de la síntesis de lípidos totales. Cuando las microalgas están bajo estrés o limitación de ciertos nutrientes, desvían sus vías metabólicas hacia la síntesis de lípidos, Vishal *et al.* (2019), y para superar el estrés, las microalgas canalizan sus rutas metabólicas hacia la síntesis de moléculas altamente reducidas, como los lípidos, Solovchenko (2012), y esto se evidencia en este trabajo.

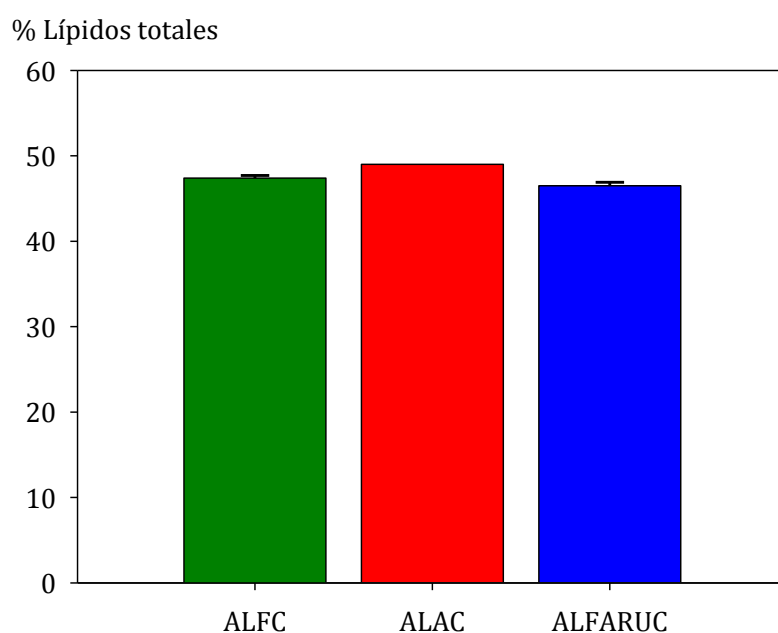


Figura 5.92 Contenido de lípidos totales al final de cada experimento, con *C. pyrenoidosa* en cultivos realizados usando al 50% aguas de lavado de aceitunas (■), 30% aguas de lavado de aceites (■), y aguas de almazaras y residuales urbanas de tratamiento biológico (■), al 10%CO₂.

El perfil de ácidos grasos de la fracción lipídica de la biomasa se determinó al final del experimento en todos los cultivos, expresándose como porcentaje respecto al total de ácidos grasos, y de los cromatogramas obtenidos, Figura 5.93, se han calculado, los porcentajes de cada una de las fracciones de ácidos grasos.

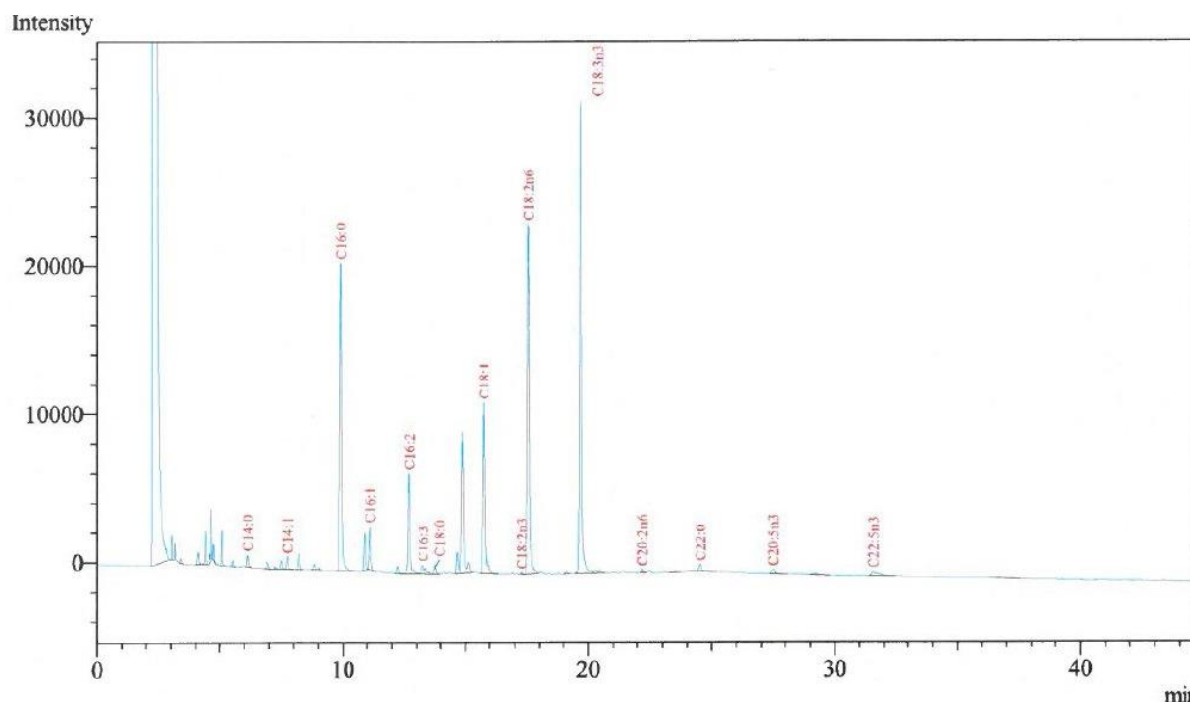


Figura 5.93 Cromatograma de la fracción lipídica de biomasa obtenida de *C. pyrenoidosa* en cultivo realizados usando al 50% aguas da lavado de aceitunas, 30% sguas de lavado de aceites, 20% aguas residuales urbanas de tratamiento biológico y 10% CO₂, Exp. 2ALFARUC.

A partir de los resultados se observó que el ácido graso más abundante fue el oleico, 18:1. Otros ácidos grasos poliinsaturados identificados fueron: 18:2n3, 18:3n3, 18:4n3, 20:2n6, 20:5n3 y 22:5n3 (Tablas D.157 a D.162, Anexo D).

Se detectó el valor más alto de SAT, 27,1%, en cultivos con 30% de ALA y 10% de CO₂. Se ha observado que la fracción de ácidos grasos MON aumentó cuando se utilizaba aguas residuales urbanas. Por otra parte, las fracciones de POL y ESE presentan los valores más altos de la fracción lipídica y concretamente para una concentración del 50% de ALF, 39,5 y 34,5%, respectivamente. Al igual que con las anteriores fracciones, el porcentaje de AGSP fue el menor y no presentó una tendencia definida. El valor más alto de la relación n3/n6 fue 1,46 para concentración del 30% de ALF; este valor está próximo al rango donde se considera que la biomasa tiene cierto valor nutricional, Tabla 5.49.

Tabla 5.49. Composición en ácidos grasos de la fracción lipídica de *C. pyrenoidosa* en cultivos realizados usando aguas de almazaras, aguas residuales urbanas de tratamiento biológico y 10% de CO₂

EXP	SAT	MON	POL	ESE	AGSP	n3/n6
<u>7 ALFC</u> <u>8 ALFC</u>	23,7 ± 0,2	30,1 ± 0,2	39,5 ± 0,4	34,5 ± 0,4	0,510 ± 0,013	1,46 ± 0,02
<u>7 ALAC</u> <u>8 ALAC</u>	27,1 ± 0,2	32,0 ± 0,3	33,6 ± 0,1	29,0 ± 0,2	0,218 ± 0,019	1,31 ± 0,01
<u>1 ALFARUC</u> <u>2 ALFARUC</u>	25,8 ± 0,4	33,2 ± 0,3	33,8 ± 0,1	26,5 ± 0,3	0,587 ± 0,006	0,975 ± 0,025

La composición del cultivo, temperatura, pH e intensidad de la luz son los principales factores que afectan a la composición de los ácidos grasos, Hu (2008). En este sentido, como el pH, la intensidad de la luz, temperatura y la concentración de CO₂, se mantuvieron constantes a lo largo de los cultivos, las diferencias observadas en la composición de los ácidos grasos deben atribuirse a las diferencias en la concentración de nutrientes. Por otra parte, con respecto a los nutrientes, la limitación de nitrógeno es el

principal elemento crítico que afecta el metabolismo de los lípidos y a la proporción entre los ácidos saturados e insaturados, Merzlyak *et al.* (2007).

d) Composición elemental de la biomasa

El análisis de la composición elemental se realizó a la biomasa seca obtenida al final de cada experimento. También, se ha determinado la relación C/N.

A partir a los resultados observados, en esta serie el contenido de carbono fue el valor más alto, 46,1%, el mayor contenido de nitrógeno 7,4%, mientras que el contenido de azufre fue 0,53%. Por otra parte, para la relación C/N se obtuvo el valor de 6,2, Figura 5.94.

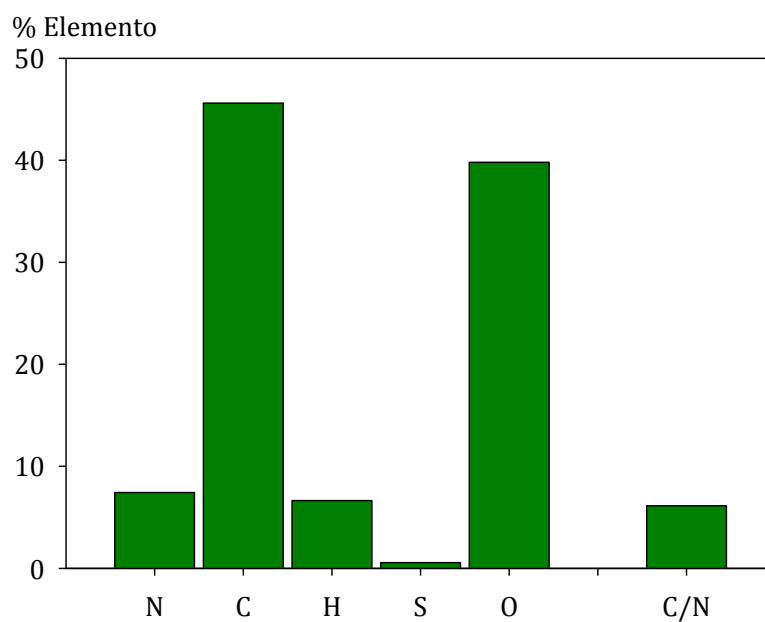


Figura 5.94 Composición elemental de la biomasa de *C. pyrenoidosa* determinada al final de los cultivos, en experimentos realizados usando aguas de almazaras, aguas residuales urbanas de tratamiento biológico y 10% de CO₂, Exp. 2 ALFARUC.

5.5 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL AGUA RESIDUAL DESPUÉS DEL BIOPROCESO

Al final de los cultivos y con el objetivo de calcular la reducción en la carga contaminante, se ha determinado: conductividad eléctrica (CE), sólidos totales (ST), amonio, nitratos, nitritos, nitrógeno total (N_{total}), sulfatos, magnesio, cobre, demanda química de oxígeno (DQO), oxígeno disuelto, fosfatos total (P_{total}), compuestos fenólicos totales (CFT) y cloruros del efluente líquido. Atendiendo a los medios de cultivos utilizados se han realizado tres caracterizaciones físico-químicas del agua residual después del proceso y una vez separada la biomasa final:

- En cultivos realizados con aguas de lavado de aceitunas.
- En ensayos llevados a cabo con aguas de lavado de aceites.
- En cultivos realizados con mezclas de aguas residuales.

5.5.1 En cultivos realizados con aguas de lavado de aceitunas

En todos los experimentos que utilizan aguas de lavado de aceitunas como medio de cultivo (Tablas E1-E12, Anexo E), y que han sido llevados a cabo en fotobiorreactores, se ha calculado el porcentaje de reducción del parámetro en el agua final del cultivo, Tabla 5.50.

Tabla 5.50. Porcentajes de reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en los cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas

% Eliminado/ EXP	<u>1 ALF</u> 2 ALF	<u>3 ALF</u> 4 ALF	<u>5 ALF</u> 6 ALF	<u>7 ALF</u> 8 ALF	<u>9 ALF</u> 10 ALF	<u>11 ALF</u> 12 ALF
CE	52,1 ± 0,1	45,9 ± 0,0	94,9 ± 0,4	47,6 ± 0,1	35,6 ± 0,1	30,8 ± 0,2
ST	99,7 ± 0,1	99,7 ± 0,1	99,6 ± 0,1	99,6 ± 0,1	99,5 ± 0,0	99,3 ± 0,1
DQO	90,7 ± 0,0	94,8 ± 0,5	84,6 ± 0,5	85,8 ± 0,1	72,6 ± 0,3	50,2 ± 0,9
(NH ₄ ⁺)*	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	(NH ₄ ⁺)*
NO ₃ ⁻	82,5 ± 0,0	81,9 ± 0,1	83,8 ± 0,2	64,7 ± 0,1	84,5 ± 0,4	25,2 ± 0,3
NO ₂ ⁻	92,0 ± 0,0	92,3 ± 0,8	49,2 ± 0,3	60,2 ± 0,1	83,4 ± 0,6	57,4 ± 0,3
N _{total}	66,5 ± 0,3	57,7 ± 0,3	52,8 ± 0,3	48,6 ± 0,5	48,1 ± 0,2	16,3 ± 0,6
P _{total}	93,3 ± 0,0	93,3 ± 0,0	93,3 ± 0	93,3 ± 0,0	93,3 ± 0,0	92,0 ± 0,3
SO ₄ ²⁻	82,9 ± 0,1	88,3 ± 0,1	86,7 ± 0,7	79,4 ± 0,1	79,3 ± 0,3	68,4 ± 0,7
Mg ²⁺	89,4 ± 0,1	88,8 ± 0,7	85,5 ± 0,2	60,2 ± 0,4	59,1 ± 0,4	32,3 ± 0,2
Cu ²⁺	97,4 ± 0,0	97,4 ± 0,0	97,4 ± 0,0	97,4 ± 0,0	97,4 ± 0,0	97,4 ± 0,0
CFT	87,5 ± 0,1	83,0 ± 0,7	78,3 ± 0,5	77,4 ± 0,5	78,6 ± 0,5	61,9 ± 0,7
Cl ⁻	57,8 ± 0,1	50,7 ± 0,3	43,6 ± 0,1	42,0 ± 0,1	47,8 ± 0,7	33,4 ± 0,2
O ₂ disuelto*	219 ± 2,0	185 ± 1,0	171 ± 1,5	159 ± 1,0	171 ± 2,5	141 ± 2,2

*No determinado

**Porcentaje de generación

Se ha observado una reducción en todos los parámetros. En general, se detectó más disminución en el contenido total de fósforo, en compuestos fenólicos y en compuestos de nitrógeno. Este hecho ilustra las necesidades de las algas por estos elementos, al tiempo que contribuye a la reducción de la concentración de otros elementos. Esta disminución en los parámetros y compuestos más importantes se muestra en la Figura 5.95.

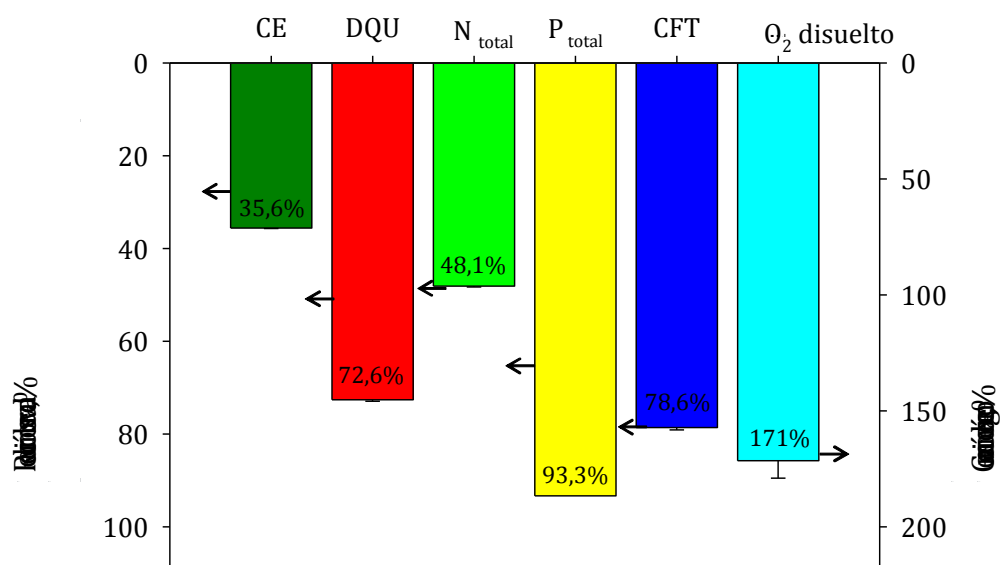


Figura 5.95 Disminución en la concentración de contaminantes, calculada en cultivos realizados con aguas de lavado de aceitunas, a temperatura de 25°C y nivel de aeración de 1 v/v/min, Exp. 9 y 10 ALF.

En experimentos realizados utilizando aguas de lavado de aceitunas al 50% y diferentes porcentajes de dióxido de carbono en el gas de entrada al fotobiorreactor, se observó una disminución mayor en el contenido de nitrógeno total del cultivo en relación con la serie ALF anteriormente descrita. Por otra parte, la generación de oxígeno también fue más eficiente, Tabla 5.51.

Tabla 5.51. Porcentajes de reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en los cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas y dióxido de carbono en la fase gas a 1, 2, 5, 10 y 15%

% Eliminado/ EXP	1 ALFC 2 ALFC	3 ALFC 4 ALFC	5 ALFC 6 ALFC	7 ALFC 8 ALFC	9 ALFC 10 ALFC
CE	15,7 ± 2,1	25,2 ± 3,3	52,3 ± 0,9	82,1 ± 0,2	63,6 ± 0,2
ST	99,9 ± 0,0	99,9 ± 0,0	99,9 ± 0,0	99,9 ± 0,0	99,8 ± 0,0
DQO	79,4 ± 0,3	79,7 ± 0,6	72,1 ± 0,7	74,0 ± 0,6	71,5 ± 0,5
(NH ₄ ⁺)*	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
NO ₃ ⁻	90,3 ± 0,1	88,5 ± 0,2	87,8 ± 0,7	92,2 ± 0,1	86,6 ± 0,6
NO ₂ ⁻	83,3 ± 0,4	50,7 ± 0,5	39,8 ± 0,7	48,4 ± 0,5	43,8 ± 0,7
N _{total}	92,7 ± 0,1	93,9 ± 0,2	97,0 ± 0,1	97,0 ± 0,2	79,5 ± 0,5
P _{total}	32,0 ± 0,5	39,7 ± 0,2	67,7 ± 0,5	68,0 ± 0,3	32,2 ± 0,4
SO ₄ ²⁻	78,3 ± 0,3	92,8 ± 0,4	93,2 ± 0,1	93,6 ± 0,1	93,3 ± 0,3
Mg ²⁺	80,9 ± 0,0	80,9 ± 0,0	80,9 ± 0,0	80,9 ± 0,0	80,9 ± 0,0
Cu ²⁺	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
CFT	45,6 ± 1,0	38,1 ± 0,4	48,1 ± 0,7	67,8 ± 0,7	65,0 ± 0,1
Cl ⁻	76,6 ± 0,6	79,0 ± 0,1	79,5 ± 0,2	87,0 ± 0,4	83,7 ± 0,5
O ₂ disuelto**	260 ± 1,3	258 ± 2,5	310 ± 2,3	303 ± 1,0	286 ± 1,5

*No determinado

**Porcentaje de generación

La presencia de dióxido de carbono ha aumentado la eficiencia del consumo de ión magnesio y esto es una indicación real del aumento en la formación de pigmentos. El efecto combinado del dióxido de carbono fue altamente eficiente en la eliminación de contaminantes en el agua, detectándose una alta generación de oxígeno, Figura 5.96.

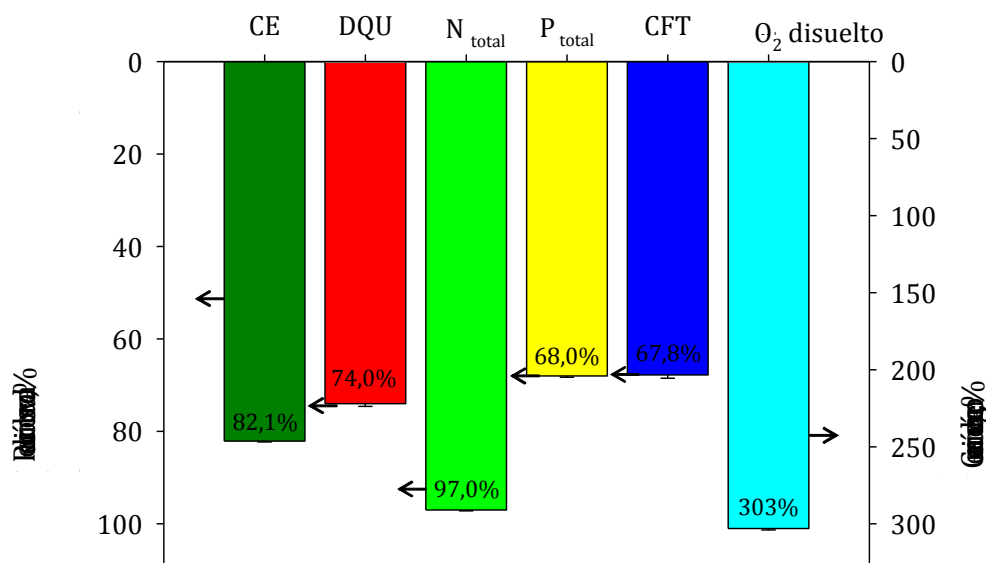


Figura 5.96 Disminución en la concentración de contaminantes, calculada en cultivos realizados con aguas de lavado de aceitunas y dióxido de carbono, a temperatura de 25°C y nivel de aeración de 1 v/v/min, Exp. 7 y 8 ALFC.

5.5.2 En ensayos llevados a cabo con aguas de lavado de aceites

A partir de los resultados de los ensayos que utilizan aguas de lavado de aceites como medio de cultivo (Tablas E13-E24, Anexo E), se ha determinado el porcentaje de reducción del parámetro o compuesto en el agua final del cultivo, Tabla 5.53.

Cabe indicar que en todos los experimentos, la reducción más alta se alcanzó en el contenido de CFT. Por otra parte, la generación de oxígeno más elevada tuvo lugar en los cultivos que usaron una concentración de 5% de ALA. La reducción de la DQO en el rango 79,3-84,0% puede considerarse convincente en función de su filtración antes del tratamiento.

Tabla 5.53. Porcentajes de reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en los cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites

% Eliminado/ EXP	1 ALA 2 ALA	3 ALA 4 ALA	5 ALA 6 ALA	7 ALA 8 ALA	9 ALA 10 ALA	11 ALA 12 ALA
CE	30,2 ± 2,0	22,5 ± 2,0	27,6 ± 0,4	25,6 ± 0,2	28,2 ± 0,4	20,9 ± 0,3
ST	99,3 ± 0,0	99,1 ± 0,0	99,2 ± 0,1	99,1 ± 0,1	98,9 ± 0,1	98,8 ± 0,0
DQO	88,3 ± 1,0	84,0 ± 0,6	83,0 ± 0,1	87,8 ± 0,1	79,6 ± 0,3	79,3 ± 0,4
(NH ₄ ⁺)*	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
NO ₃ ⁻	70,8 ± 0,1	68,4 ± 0,2	67,9 ± 0,2	64,6 ± 0,5	62,1 ± 0,6	49,8 ± 0,1
NO ₂ ⁻	60,1 ± 0,2	57,4 ± 0,4	58,5 ± 0,4	62,3 ± 0,1	60,3 ± 0,3	44,5 ± 0,4
N _{total}	59,4 ± 0,3	51,4 ± 0,3	54,7 ± 0,3	46,7 ± 0,1	39,2 ± 0,1	30,0 ± 0,7
P _{total}	96,9 ± 0,0	68,1 ± 0,6	63,8 ± 0,6	63,7 ± 0,4	60,5 ± 0,1	56,1 ± 0,3
SO ₄ ²⁻	73,6 ± 1,0	71,7 ± 0,7	69,4 ± 0,1	66,9 ± 0,5	65,8 ± 0,2	58,5 ± 0,1
Mg ²⁺	92,0 ± 0,0	91,2 ± 0,3	82,1 ± 0,3	81,0 ± 0,5	71,9 ± 0,4	48,6 ± 0,8
Cu ²⁺	61,9 ± 0,6	51,6 ± 0,7	67,9 ± 0,3	68,4 ± 0,4	53,2 ± 0,1	40,7 ± 0,7
CFT	94,6 ± 0,5	94,1 ± 0,3	95,0 ± 0,2	94,9 ± 0,3	92,0 ± 0,2	85,1 ± 0,6
Cl ⁻	70,7 ± 0,3	66,1 ± 0,4	57,3 ± 0,4	75,3 ± 0,2	56,7 ± 0,5	46,5 ± 0,3
O ₂ disuelto**	232 ± 1,5	179 ± 1,0	201 ± 0,4	191 ± 2,0	177 ± 2,0	211 ± 1,0

*No determinado

**Porcentaje de generación

En los cultivos realizados en aguas de lavado de aceites, y al final del experimento, los mayores porcentajes de reducción se detectan en la CE, en DQO, en fósforo total, nitrógeno total y CFT, Figura 5.97.

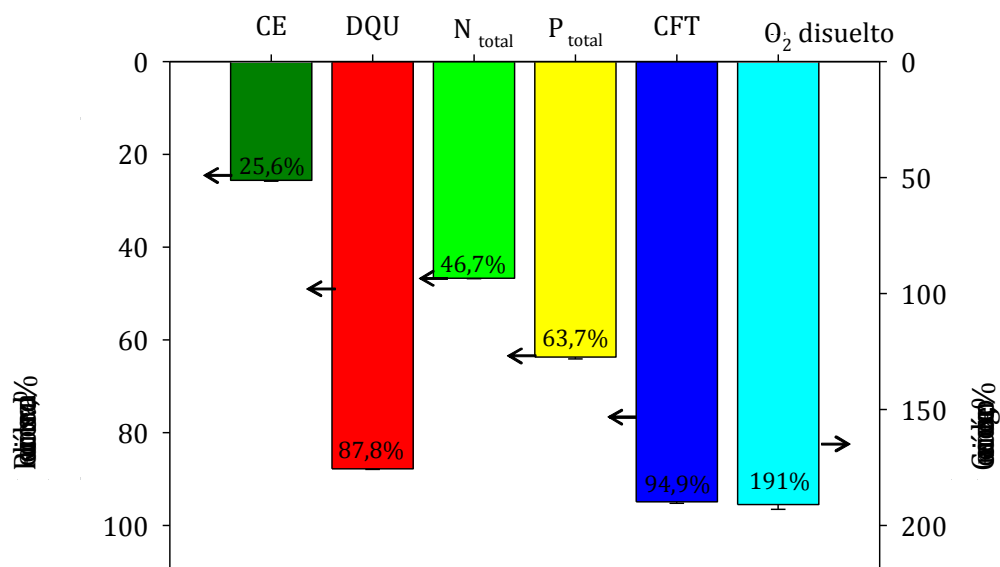


Figura 5.97 Disminución en la concentración de contaminantes, calculada en cultivos realizados con aguas de lavado de aceites, a temperatura de 25°C y nivel de aeración de 1 v/v/min, Exp. 7 y 8 ALA.

Los experimentos realizados con el 30% de aguas de lavado de aceites con aporte de dióxido de carbono a la fase gaseosa introducida en los fotobiorreactores, han sido donde se han obtenido los resultados más favorables, Tabla 5.54.

Tabla 5.54. Porcentajes de reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en los cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites y dióxido de carbono en la fase gas a 1, 2, 5, 10 y 15%

% Eliminado/EXP	<u>1 ALAC</u> <u>2 ALAC</u>	<u>3 ALAC</u> <u>4 ALAC</u>	<u>5 ALAC</u> <u>6 ALAC</u>	<u>7 ALAC</u> <u>8 ALAC</u>	<u>9 ALAC</u> <u>10 ALAC</u>
CE	49,0 ± 0,0	51,2 ± 0,4	34,3 ± 0,8	32,5 ± 0,6	49,0 ± 0,3
ST	97,5 ± 0,0	97,8 ± 0,0	97,6 ± 0,1	96,3 ± 0,1	95,2 ± 0,1
DQO	71,9 ± 0,5	86,3 ± 0,3	88,4 ± 0,3	89,4 ± 0,5	72,9 ± 0,5
(NH ₄ ⁺)*	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
NO ₃ ⁻	65,5 ± 0,9	81,2 ± 0,4	85,2 ± 0,2	91,9 ± 0,3	89,1 ± 0,5
NO ₂ ⁻	90,9 ± 0,2	93,0 ± 0,3	93,9 ± 0,7	93,1 ± 0,4	91,7 ± 0,8
N _{total}	78,15 ± 0,2	88,2 ± 0,3	94,1 ± 0,1	96,3 ± 0,1	81,9 ± 0,3
P _{total}	68,0 ± 0,2	72,1 ± 0,3	85,8 ± 0,3	92,1 ± 0,1	53,4 ± 0,9
SO ₄ ²⁻	57,9 ± 0,9	54,7 ± 0,7	56,9 ± 0,9	55,2 ± 0,9	47,1 ± 0,3
Mg ²⁺	74,3 ± 0,3	73,7 ± 0,1	72,6 ± 0,8	72,0 ± 0,2	69,7 ± 0,1
Cu ²⁺	95,8 ± 0,0	95,8 ± 0,0	95,8 ± 0,0	95,8 ± 0,0	95,8 ± 0,0
CFT	90,1 ± 0,4	89,5 ± 0,8	93,7 ± 0,9	94,8 ± 0,5	93,7 ± 0,1
Cl ⁻	75,9 ± 0,4	85,5 ± 0,1	90,1 ± 0,2	91,2 ± 0,2	89,6 ± 0,6
O ₂ disuelto**	223 ± 0,5	242 ± 0,9	227 ± 0,5	217 ± 0,5	191 0,5

*No determinado

**Porcentaje de generación

Se ha observado que la presencia de dióxido de carbono ha aumentado la eficiencia del % eliminación de compuestos en el agua final del cultivo. Por otra parte, y en general, se observa que el 10% de CO₂ es más favorable para la reducción de contaminantes en el agua. Cabe indicar que, la reducción más alta se alcanzó en el contenido de N total, este hecho es muy importante en el crecimiento del microalgas. Los mayores porcentajes de reducción se detectan en la CE, en DQO, en fósforo total, nitrógeno total, y CFT, Figura 5.98.

Woertz *et al.* (2009) estudiaron la eliminación de nutrientes, producción de lípidos de microalgas, y producción de biocombustibles durante el tratamiento de aguas residuales municipales y lácteas suplementadas con CO₂. En su estudio, se utilizó el inóculo de microalgas que contiene una amplia mezcla de algas verdes y diatomeas recolectadas de estanques locales que tratan aguas residuales municipales. Los resultados de ambos tipos de aguas residuales sugieren que los cultivos de algas suplementados con CO₂ pueden eliminar simultáneamente nitrógeno disuelto, fósforo y generar una fracción lipídica potencialmente útil para la producción de biocombustibles líquidos.

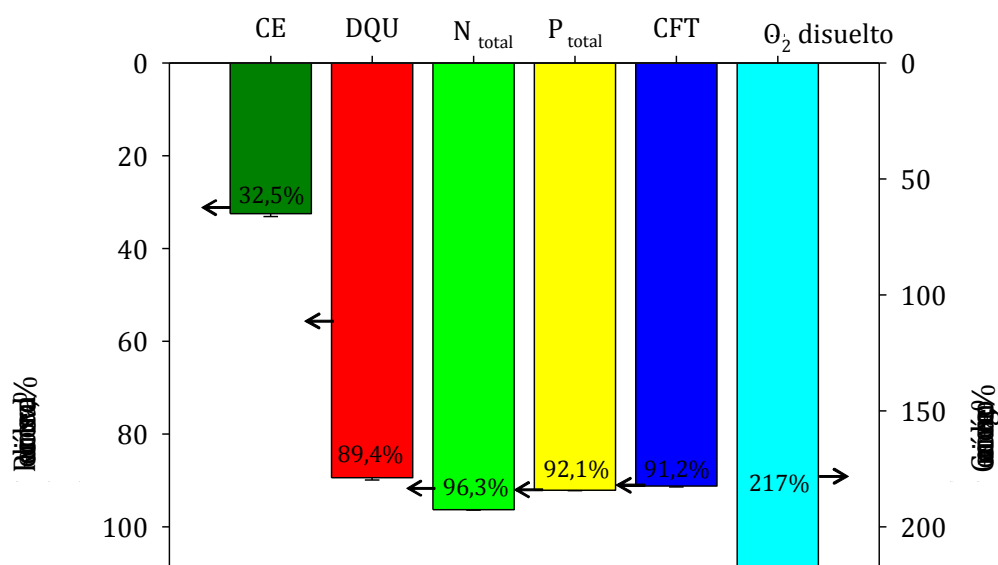


Figura 5.98 Disminución en la concentración de contaminantes, calculada en cultivos realizados con aguas de lavado de aceites y dióxido de carbono, a temperatura de 25°C y nivel de aeración de 1 v/v/min, Exp. 7 y 8 ALAC.

5.5.3 En cultivos realizados con mezclas de aguas residuales

A través de la disminución en el contenido de contaminantes en el agua tratada, es posible considerar las aguas residuales de almazaras mezcladas con aguas residuales urbanas como un medio nutriente para el crecimiento de algas unicelulares. Gran cantidad de estudios han indicado la idoneidad de las aguas residuales como un medio para el crecimiento de algas, Oswald *et al.* (1978), Govindan (1984). En este estudio experimental, los porcentajes de reducción determinados en los parámetros físico-químicos, del agua tratada final, ha originado valores significativos de cierta relevancia desde un punto de vista industrial, fundamentalmente en aquellos compuestos disueltos en las aguas residuales de partida, Tabla 5.55.

Tabla 5.55. Porcentajes de reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en los cultivos realizados usando aguas de almazaras mezcladas con aguas residuales urbanas de tratamiento secundario

% Eliminado/ EXP	1 ALFRU 2 ALFRU	1 ALARU 2 ALARU	1 ALFARU 2 ALFARU	3 ALFARU 4 ALFARU
CE	32,1 ± 0,2	38,2 ± 0,6	14,4 ± 0,4	12,6 ± 0,8
ST	97,3 ± 0,1	97,6 ± 0,1	99,8 ± 0,0	99,8 ± 0,0
DQO	79,1 ± 0,5	83,3 ± 0,8	63,7 ± 0,9	66,2 ± 0,4
NH ₄ ⁺	28,9 ± 0,7	35,2 ± 0,5	54,0 ± 0,1	54,1 ± 0,9
NO ₃ ⁻	72,1 ± 0,2	83,0 ± 0,8	53,8 ± 0,8	56,5 ± 0,4
NO ₂ ⁻	75,0 ± 0,1	82,6 ± 1,0	29,4 ± 0,9	35,1 ± 0,8
N _{total}	68,1 ± 0,3	76,0 ± 0,3	51,6 ± 0,8	54,1 ± 0,4
P _{total}	54,1 ± 0,2	55,5 ± 0,3	32,6 ± 0,4	56,0 ± 0,5
SO ₄ ²⁻	74,4 ± 0,7	73,0 ± 0,4	74,8 ± 0,2	81,3 ± 0,3
Mg ²⁺	77,6 ± 0,5	55,5 ± 0,9	36,2 ± 0,7	45,9 ± 0,9
(Cu ²⁺)*	N.D	87,4 ± 0,0	62,3 ± 0,6	50,6 ± 0,5
CFT	65,1 ± 0,7	78,1 ± 0,2	76,5 ± 0,5	76,6 ± 0,2
Cl ⁻	80,2 ± 0,5	74,8 ± 0,6	72,2 ± 0,2	69,0 ± 0,3
O ₂ disuelto**	322 ± 0,5	105 ± 0,8	241 ± 0,6	197 ± 0,8

*No determinado

**Porcentaje de generación

Se ha observado que, con un aumento en la concentración de aguas de almazaras mezcladas con aguas residuales urbanas, disminuye la cantidad de contaminantes y los valores de los parámetros físico-químicos, y esto puede ser debido a una mayor carga de compuestos orgánicos en el medio nutriente inicial. Por otra parte, también cabe destacar que, la reducción de la DQO, en el rango 63,7-83,3%, puede considerarse convincente en función de su filtración antes del tratamiento. La generación de oxígeno más elevada tuvo lugar cuando se ha utilizado al 50% de ALF mezclada con RU. Esta disminución en los parámetros y compuestos más importantes se muestra en la Figura 5.99.

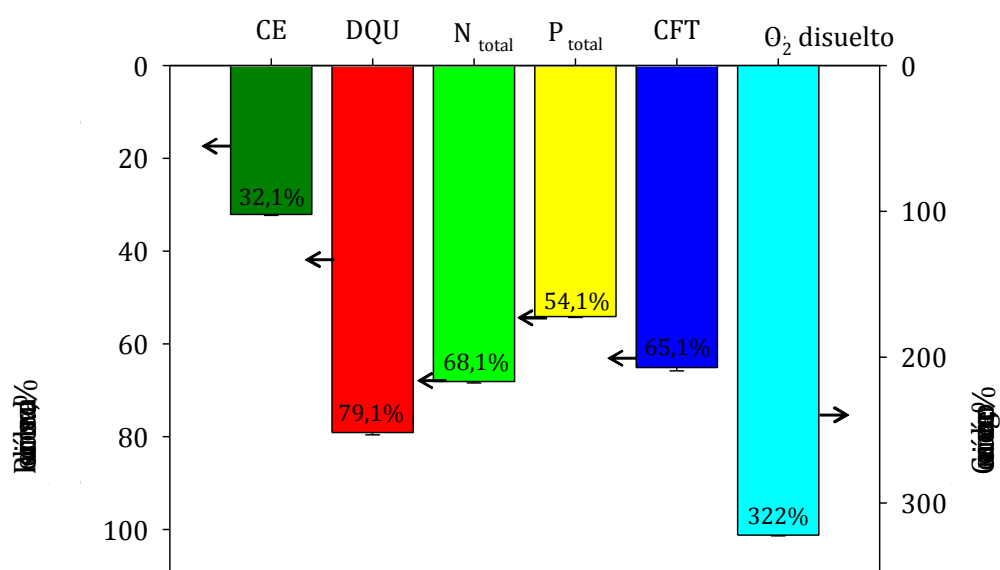


Figura 5.99 Disminución en la concentración de contaminantes, calculada en cultivos realizados con aguas de almazaras mezcladas con aguas residuales urbanas de tratamiento secundario, a temperatura de 25°C y nivel de aeración de 1 v/v/min, Exp. 1 y 2 ALFRU.

Finalmente, en otra serie experimental, se ha estudiado la reducción de los parámetros físico-químicos en las aguas que resultan al final de los bioprocesos que han usado como medio nutriente de *C. pyrenoidosa*, aguas de almazaras mezcladas con aguas residuales urbanas (de tratamiento secundario) y dióxido de carbono. Los resultados experimentales correspondientes a este estudio, se recogen en las Tablas E.53 a E.54 (Anexo E); a partir de estos resultados primarios se ha calculado el porcentaje de reducción de cada uno de los parámetros en el agua final del cultivo una vez separada la biomasa microalgal, Tabla 5.55.

Cabe destacar que se ha determinado una disminución del contenido en nitratos del 72,0%; este resultado es próximo al calculado por otros autores, Sydney *et al.* (2011), para otra microalga cloroficea *B. braunii*, empleando agua residual urbana procedente del tratamiento secundario como medio de cultivo. También, cabe indicar que el % eliminado en iones amonio y nitrito, al final del cultivo, fueron 99,4 y 96,4%, respectivamente. Sin embargo, se observó una reducción en el contenido de fosfato de sólo el 64,3%, cuando se usó 10,0% de dióxido de carbono adicionado a la fase gas; este porcentaje de disminución es menor que el obtenido sin mezclar aguas de almazaras con aguas residuales urbanas.

Tabla 5.55. Porcentajes de reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en los cultivos realizados usando aguas de almazaras mezcladas con aguas residuales urbanas de tratamiento secundario y dióxido de carbono en la fase gas a 10%

% Eliminado/ EXP	1 ALFARUC
	2 ALFARUC
CE	27,6 ± 0,5
ST	99,7 ± 0,1
DQO	89,0 ± 0,2
NH ₄ ⁺	96,4 ± 0,0
NO ₃ ⁻	72,0 ± 0,4
NO ₂ ⁻	99,4 ± 0,0
N total	97,2 ± 0,1
P total	64,3 ± 0,4
SO ₄ ²⁻	38,2 ± 0,7
Mg ²⁺	83,2 ± 0,0
Cu ²⁺	89,5 ± 0,0
CFT	90,1 ± 0,5
Cl ⁻	90,8 ± 0,2
O ₂ disuelto*	98,0 ± 0,9

*Porcentaje de generación

Por otra parte, la presencia de dióxido de carbono ha aumentado la eficiencia del consumo de ión magnesio y esto es una indicación real del aumento en la proceso de fotosíntesis. En relación a la disminución en los parámetros más importantes, se detecta una eliminación prácticamente total de la concentración de nitrógeno total, y una generación de oxígeno molecular próxima al 100%, Figura 5.100.

Coincidiendo con lo observado en esta Tesis Doctoral, varios autores determinan disminuciones considerables en la carga contaminante de distintas aguas residuales, que fueron utilizadas como medios de cultivos. En una investigación realizada por Ruiz-Marín *et al.* (2010), se compararon dos especies de microalgas *S. obliquus* y *C. vulgaris* que crecen como células inmovilizadas y libres para evaluar su capacidad para eliminar N y P en cultivos discontinuos de aguas residuales urbanas. *S. obliquus* mostró una mayor velocidad de consumo de compuestos de N y P, en aguas residuales urbanas, que *C. vulgaris*, alcanzando porcentajes próximos de eliminación de nitrógeno, en condiciones de operación similares a las empleadas en esta Tesis Doctoral.

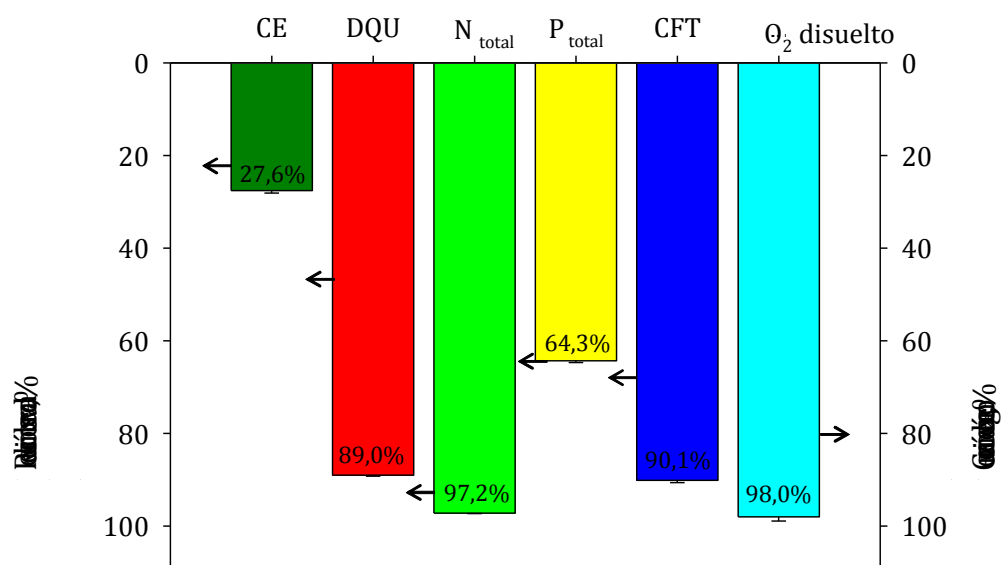


Figura 5.100 Disminución en la concentración de contaminantes, calculada en cultivos realizados con aguas de almazaras mezcladas con aguas residuales urbanas (de tratamiento secundario) y dióxido de carbono, a temperatura de 25°C y nivel de aeración de 1 v/v/min, Exp. 1 y 2 ALFARUC.

5.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd El Baky H.H., El-Baroty G.S., Bauaid A., Martinez M., Aracil J. (2012). "Enhancement of lipid accumulation in *Scenedesmus obliquus* by optimizing CO₂ and Fe³⁺ levels for biodiesel production". *Bioresource Technol.* **119**, 429–442.
- Abhishek G., Faiz A., Ansari P.S., Faizal B. (2017). "Heterotrophic cultivation of microalgae using aquaculture wastewater: A biorefinery concept for biomass production and nutrient remediation". *Ecol. Eng.* **99**, 47–53.
- Arakaki A., Matsumoto T., Tateishi T., Matsumoto M., Nojima D., Tomoko Y., Tanaka T. (2017). "UV-C irradiation accelerates neutral lipid synthesis in the marine oleaginous diatom *Fistulifera solaris*". *Bioresource Technol.* **245**, 1520–1526.
- Aslan S., Kapdan I.K. (2006). "Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae". *Ecol. Eng.* **28**, 64–70.
- Becker E.W. (1994). Chemical composition. En: "Microalgae. Biotechnology and Microbiology", E.W. Becker (Ed.), Cambridge University Press, Nueva York, pp. 177–195.
- Ben-Amotz A., Tornabene T.G., Thomas W.H. (1985). "Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids". *J. Phycol.* **21**, 72–81.
- Beuckels A., Smolders E., Muylaert K. (2015). "Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment". *Water Res.* **77**, 98–106.
- Boersma M. (2000). "The nutritional quality of P-limited algae for *Daphnia*". *Limnol Oceanogr.* **45**, 1157–1161.
- Camacho F., Martínez M. E., Sánchez S. (1988). "Influencia de la temperatura en el crecimiento heterotrófico de *Chlorella pyrenoidosa*". *An Quim.* **84** (3), 374–378.
- Chatzisyseon E., Xekoukoulotakis N.P., Diamadopoulos E., Katsaounis A., Mantzavinos D. (2009). "Boron-doped diamond anodic treatment of olive mill wastewaters: statistical analysis, kinetic modeling and biodegradability". *Water Res.* **43**, 3999–4009.
- Chen M., Tang H., Ma H., Holland T.C., Ng K.Y.S., Salley S.O. (2011). "Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*". *Bioresource Technol.* **102**, 649–1655.
- Chen J., Fan Y., E J.Q., Cao W., Zhang F., Gong J., Liu G., Xu W. (2019). "Effects analysis on the gasification kinetic characteristics of food waste in supercritical water". *Fuel.* **241**, 94–104.
- Choi K., Nakhost Z., Barzana E., Karel M. (1987). "Lipid content and fatty acid composition of green algae *Scenedesmus obliquus* in a constant cell density apparatus". *Food Biotechnol.* **1** (1), 117–128.
- Converti A., Casazza A.A., Ortiz E.Y., Perego P., Del B.M. (2009). "Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production". *Chem. Eng. Process.* **6**, 1146–1151.
- Damiani M.C., Popovich C.A., Constenla D., Leonardi P.I. (2010). "Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock". *Bioresource Technol.* **101**, 3801–3807.
- Davi M.L., Gnudi F. (1999). "Phenolic compounds in surface water". *Water Res.* **33**(14), 3213–3219.
- Deepti J., Supriya S.G., Tanmay T., Genevieve L.F., Larissa D.M., Samir R.D., Mamathaa S.S., Sanjay K., Vishal G. (2019). "CO₂ fixation and production of biodiesel by *Chlorella vulgaris* NIOCCV under mixotrophic cultivation". *Bioresource Technol.* **273**, 672–676.
- Dubinsky Z., Aaronson S., Berner T. (1980). "Some economic considerations in the mass culture of microalgae". En: "Algae Biomass: Production and Use", Shelef G., Soeder C.J. (Eds.), Elsevier/Nort

- Holland, Amsterdam, pp. 819-832.
- Fábregas J., Patiño M., Arredondo-Vega B.B, Tobar J.L., Otero A. (1995). "Renewal rate and nutrient concentration as tools to modify productivity and biochemical composition of cyclostat cultures of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta*". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 287-292.
- Fan J., Cui Y., Wan M., Wang W., Li Y. (2014). "Lipid accumulation and biosynthesis genes response of the oleaginous *Chlorella pyrenoidosa* under three nutrition stressors". *Biotechnol. Biofuels.* **1**, 7-17.
- Finkle J.B, Appleman D. (1953). "The effect of magnesium concentration on chlorophyll and catalase development in *Chlorella*". *Plant Physiol.* **28**(4), 652-663.
- Jaiswal K.K, Prasath R.A. (2016). "Integrated growth potential of *Chlorella pyrenoidosa* using hostel mess wastewater and its biochemical analysis". *Int. J. Environ. Sci.* **6**, (5), 592-599.
- Jeon J.Y., Kwon J.S., Kang S.T., Kim B.R., Jung Y., Han J.G., Park J.H., Hwang J.K. (2014). "Optimization of culture media for large-scale lutein production by heterotrophic *Chlorella vulgaris*". *Biotechnol. Progress.* **30**(3), 763-743.
- Johnson M.B., Wen Z.Y. (2009). "Development of an attached microalgal growth system for biodiesel production". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85** (3), 525-534.
- Hammouda O., Abdel-Raouf N., Shaaban M., Kamal M. (2015). "Treatment of mixed domestic-industrial wastewater using microalgae *Chlorella* sp.". *J. Am. Sci.* **11**(12), 303-315.
- He K., Lou T., Wang X., Zhao W. (2015). "Preparation of lignosulfonate acrylamidechitosan ternary graft copolymer and its flocculation performance". *Int. J. Biol. Macromol.* **81**, 1053-1058.
- Hodaifa G., Martínez M.E., Sánchez S. (2008). "Use of industrial wastewater from olive-oil extraction for biomass production of *Scenedesmus obliquus*". *Bioresource Technol.* **99**, 1111-1117.
- Hodaifa G., Martínez M.E., Sánchez S. (2009). "Daily doses of light in relation to the growth of *Scenedesmus obliquus* in diluted three-phase olive mill wastewater". *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **84**, 1550-1558.
- Hodaifa G., Martínez M.E., Órpez R., Sánchez S. (2010a). "Influence of hydrodynamic stress in the growth of *Scenedesmus obliquus* using a culture medium based on olive-mill wastewater". *Chem. Eng. Process.* **49**, 1161-1168.
- Hodaifa G., Martínez M.E., Sánchez S. (2010b). "Influence of temperature on growth of *Scenedesmus obliquus* in diluted olive mill wastewater as culture medium". *Eng. Life Sci.* **10**(3), 257-264.
- Hodaifa G., Martínez M.E., Órpez R., Sánchez S. (2012). "Inhibitory effects of industrial olive-oil mill wastewater on biomass production of *Scenedesmus obliquus*". *Ecol. Eng.* **42**, 30-34.
- Hodaifa G., Sánchez S., Martínez M.E., Órpez R. (2013). "Biomass production of *Scenedesmus obliquus* from mixtures of urban and olive-oil mill wastewaters used as culture medium". *Appl. Energy.* **104**, 345-352.
- Hu Q., Sommerfeld M., Jarvis E., Ghirardi M., Posewitz M., Seibert M., Darzins A. (2008). "Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances". *The Plant J.* **54**, 621-639.
- Gardner R., Peters P., Peyton B., Cooksey K.E. (2011). "Medium pH and nitrate concentration effects on accumulation of triacylglycerol in two members of the chlorophyte". *J. Appl. Phycol.* **23**(6), 1005-1016.
- Gonçalves A.L., Rodrigues C.M., Pires J.C.M., Simões M. (2016). "The effect of increasing CO₂ concentrations on its capture, biomass production and wastewater bioremediation by microalgae and cyanobacteria". *Algal Res.* **14**, 127-136.
- Gouveia L., Oliveira AC. (2009). "Microalgae as a raw material for biofuels production". *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 269-274.

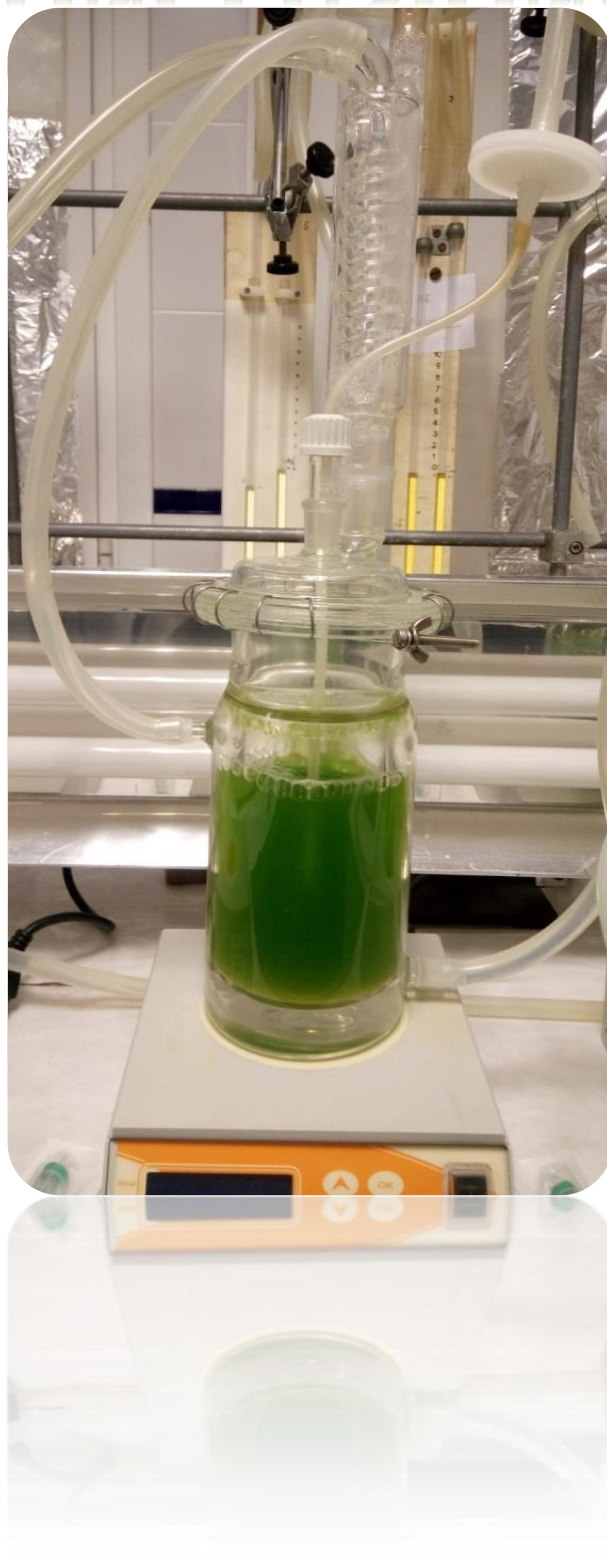
- Gouveia L., Oliveira A.C. (2009). "Microalgae as a raw material for biofuels production". *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 269-274.
- Govindan V.S. (1984). "Treatment of waters by stabilization pond method". *Asian Environ.* **1**, 7-12.
- Guldhe A., Ansari F. A., Singh P., Bux F. (2017). "Heterotrophic cultivation of microalgae using aquaculture wastewater: A biorefinery concept for biomass production and nutrient remediation". *Ecol. Eng.* **99**, 47-53.
- Guschina I.A., Harwood J.L. (2006). "Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae". *Prog. Lipid Res.* **2**, 160-186.
- Khalid A.A.H., Yaakob Z., Abdullah S.R.S., Takriff M.S. (2019). "Analysis of the elemental composition and uptake mechanism of *Chlorella sorokiniana* for nutrient removal in agricultural wastewater under optimized response surface methodology (RSM) conditions". *J. Clean. Prod.* **210**, 673-686.
- Lee Y.K., Tan H., Hew C. (1985). "The effect of growth temperature on the bioenergetics of photosynthetic algal cultures". *Biotechnol. Bioeng.* **27**, 555-561.
- Lee C.H., Chae H.S., Lee S.H., Kim H.S. (2015). "Growth characteristics and lipid content of three Korean isolates of *Botryococcus braunii* (Trebouxiophyceae)". *J. Ecol. Environ.* **38**(1), 67-74.
- Li C., Yang H., Li Y., Cheng L., Zhang M., Zhang L., Wang W. (2013). "Novel bioconversions of municipal effluent and CO₂ into protein riched *Chlorella vulgaris* biomass". *Bioresource Technol.* **132**, 171-177.
- Li L., Gao N., Deng Y., Yao J., Zhang K. (2012). "Characterization of intracellular and extracellular algae organic matters (AOM) of *Microcystis aeruginosa* and formation of AOM-associated disinfection byproducts and odor & taste compounds". *Water Res.* **46**(4), 1233-1240.
- Li Y., Horsman M., Wang B., Wu N., Lan C.Q. (2008a). "Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**, 629-636.
- Li Y., Horsman M., Wu N., Lan C.Q. (2008b). "Biofuels from microalgae". *Biotechnol. Prog.* **24**(4): 815-820.
- Lívanský K., Doucha J. (2012). "Production of high-density *Chlorella* culture grown in fermenters". *J. Appl. Phycol.* **24**(1), 35-43.
- Malvis A., Gassan Hodaifa G., Halioui M., Seyedsalehi M., Sánchez S. (2019). "Integrated process for olive oil mill wastewater treatment and its revalorization through the generation of high added value algal biomass". *Water Res.* **151**, 332-342.
- Martin S.K., Zhihong H.M., Sandy K.W. (2010). "Influence of nutrient loads, feeding frequency and inoculum source on growth of *Chlorella vulgaris* in digested piggery effluent culture medium". *Bioresource Technol.* **101**, 6012-6018.
- Melinda J.G., Robert P.V.H., Susan T.L. H. (2012). "Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions". *J. Appl. Phycol.* **24**, 989-1001.
- Merzlyak M.N., Chivkunova O.B., Gorelova O.A., Reshetnikova I.V., Solovchenko A.E., Khozin-Goldberg I., Cohen Z. (2007). "Effect of nitrogen starvation on optical properties, pigments, and arachidonic acid content of the unicellular green alga *Parietochloris incisa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta)". *J. Phycol.* **43**, 833-843.
- Milner H.W. (1953). "The chemical composition of algae". En: *Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant*, Burlew J.S. (Ed.) Carnegie Institution of Washington Publication 600, Washington, pp. 285-302.
- Moore T.A., Gust D., Moore A.L. (1989). "The function of carotenoid pigments in photosynthesis and their possible involvement in the evolution of higher plants". En: N.I. Krinsky, M.M. Mathews-Roth, R.F.

- Taylor (Eds.), *Carotenoids: Chemistry and Biology*, Springer, Boston, MA, pp. 223–228.
- Moser A. (1985). "Kinetic of batch fermentation". En: *Biotechnology*, Rehm H.J., Reed G. (Eds.), 1^a Ed. Vol. 2 *Fundamentals of Biochemical Engineering*, Brauer H. (Ed.), VCH Verlag, Weinheim, pp. 243-283.
- Obied H.K., Bedgood D., Mailer R., Prenzler P.D., Robards K. (2008). "Impact of cultivar, harvesting time, and seasonal variation on the content of biophenols in olive mill waste". *J. Agr. Food Chem.* **56**, 8851-8858.
- Órpez R. (2015). "Tratamiento terciario de aguas residuales urbanas y producción de hidrocarburos utilizando *Botryococcus braunii*". Tesis Doctoral, Universidad de Jaén, Facultad de Ciencias Experimentales, Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales. Jaén, España.
- Oswald W.J., Lee E.W., Adan B., Yao K.H. (1978). "New wastewater treatment method yields a harvest of sealable algae". *WHO Chron.* **32**, 348-350.
- Qiang L., Junda L. (2011). "Effects of nitrogen source and concentration on biomass and oil production of a *Scenedesmus rubescens* like microalga". *Bioresource Technol.* **102**, 615–1621.
- Pruvost J., Vooren G., Gouic B., Mossion A., Legrand J. (2011). "Systematic investigation of biomass and lipid productivity by microalgae in photobioreactors for biodiesel application". *Bioresource. Technol.* **102**, 150-158.
- Reitan K.I., Rainuzzo J.R., Olsen Y. (1994). "Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae". *J. Phycol.* **30**, 972–979.
- Rekha S., Gajendra P.S., Vijendra K.S. (2012). "Effects of culture conditions on growth and biochemical profile of *Chlorella vulgaris*". *J. Plant Pathol. Microb.* **3**, 1–6.
- Rhees G.Y. (1978). "Effects of N:P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition, and nitrate uptake". *Limnol. Oceanogr.* **23**, 10-25.
- Rodolfi L., Chini Zittelli G., Bassi N., Padovani G., Biondi N., Bonini G., Tredici M.R. (2009). "Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor". *Biotechnol. Bioeng.* **1**, 100–112.
- Rodríguez-López M.R. (1964). "Influence of the inoculum and the medium on the growth of *Chlorella pyrenoidosa*". *Nature.* **203**, 666-667.
- Rose A.H. (1977). Metabolismo productor de energía. En: "*Microbiología Química*", Alhambra, pp. 211- 281, Madrid.
- Ruiz-Marín A., Mendoza-Espinosa L.G., Stephenson T. (2010). "Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater". *Bioresource Technol.* **101**(1), 58-64.
- Sánchez S., Martínez M^a E., Molina E., De la Casa J.A., García F. (1993). The influence of culture media and aeration rate on the growth and fatty-acid content *Skeletonema costatum*. *Process Biochem.* **28**, 289-296.
- Sánchez S., Martínez M., Espejo M.T., Pacheco R., Espinola F., Hodaifa G. "Mixotrophic culture of *Chlorella pyrenoidosa* with olive-mill wastewater as nutrient medium". (2001). *J. Appl. Phcol.* **13**, 443-449.
- Simionato D., Block MA., La Rocca N., Jouhet J., Maréchal E., Finazzi G., Morosinotto T. (2013). "The response of *Nannochloropsis gaditana* to nitrogen starvation includes de novo biosynthesis of triacylglycerols, a decrease of chloroplast galactolipids, and reorganization of the photosynthetic apparatus". *Eukaryot Cell.* **12**(5), 665-676.
- Sharma R., Singh G.P., Sharma V.K. (2012). "Effects of culture conditions on growth and biochemical profile

- of *Chlorella vulgaris*". *J. Plant Pathol. Microbiol.* **3**(5), 1-6.
- Solovchenko A. (2012). "Physiological role of neutral lipid accumulation in eukaryotic microalgae under stresses". *Russ. J. Plant Physiol.* **59**, 167-176.
- Song-Fang H., Wenbiao J., Abd El-Fatah A., Xu Z., Renjie T., Chuan C., Hongyi C., Shu-hong G., Qilin W. (2019). "Enhancement of lipid production of *Scenedesmus obliquus* cultivated in municipal wastewater by plant growth regulator treatment". *Waste Biomass Valor.* **10**, 2479-2485.
- Sun Y., Chen Z., Wu G., Wu Q., Zhang F., Niu Z., Hu H.Y. (2016). "Characteristics of water quality of municipal wastewater treatment plants in China, implications for resources utilization and management". *J Cleaner Prod.* **131**, 1-9.
- Sun Z., Dou X., Wu J., He B., Wang Y., Chen Y.F. (2015). "Enhanced lipid accumulation of photoautotrophic microalgae by high-dose CO₂ mimics a heterotrophic characterization". *World J. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 1963-1966.
- Sydney E.B., da Silva T.E., Tokarski A., Novak a A.C., de Carvalho J.C., Woiciechowski A.L., Larroche C., Soccol C.R. (2011). "Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage". *Appl. Energ.* **88**, 3291-3294.
- Tang D., Han W., Li P., Miao X., Zhong J. (2011). "CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels". *Bioresource. Technol.* **102**, 3071-3076.
- Tanmay T., Deepti J., Nousin S.S., Mulla S.S.M., Samir R.D., Sreepada R.A., Sanjay K., Vishal G. (2019). "Improvement in biomass, lipid production and biodiesel properties of a euryhaline *Chlorella vulgaris* NIOCCV on mixotrophic cultivation in wastewater from a fish processing plant". *Renewable Energy.* **139**, 326-335.
- Thomas K.M., Aviraj D., Mukund D. P., Sreenath D., Archana T. (2019). "Biodiesel production through algal cultivation in urban wastewater using algal floway". *Bioresource Technol.* **280**, 222-228.
- Vishal A., Mrinal K., Kanchan S., Atreyee G., Bala K. (2019). "Salinity driven stress to enhance lipid production in *Scenedesmus vacuolatus*: A biodiesel trigger?" *Biomass Bioenergy.* **127**, 1-8.
- Ugwu C.U., Aoyagi H., Uchiyama H. (2007). "Influence of irradiance, dissolved oxygen concentration, and temperature on the growth of *Chlorella sorokiniana*". *Photosynthetica.* **45**(2), 309-311.
- Wang Y., Guo W., Yen H.W., Ho S.H., Lo Y.C., Cheng C.L., Ren N., Chang J.S. (2015). "Cultivation of *Chlorella vulgaris* JSC-6 with swine wastewater for simultaneous nutrient/COD removal and carbohydrate production". *Bioresource Technol.* **198**, 619-625.
- Webb J.L., Chu F.L.E. "Phytoplankton as a food for bivalve larvae". (1982). En: "*Biochemical and Physiological Approadies to Shellfish Nutrition*". Pruder G.D., Langdon C.J., Conkilin D.E. (Eds), pp. 272-291. Lousiana State University Press, Baton Rouge, LA.
- Weiguo Z., Peiliang Z., Hao S., Maozhen C., Shan L., Pengfu L. (2014). "Effects of various organic carbon sources on the growth and biochemical composition of *Chlorella pyrenoidosa*". *Bioresource Technol.* **173**, 52-58.
- Woertz I., Feffer A., Lundquist T., Nelson Y. (2009). "Algae grown on dairy and municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and lipid production for biofuel feedstock". *J. Environ. Eng.-ASCE*, **135**(11), 1115-1122.
- Wu H., Miao X. (2014). "Biodiesel quality and biochemical changes of microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* in response to nitrate levels". *Bioresource Technol.* **170**, 421-427.

- Yao L., Shi J., Miao X. (2015). "Mixed wastewater coupled with CO₂ for microalgae culturing and nutrient removal". *PLoS. One* **10**, 1-16.
- Yu Z., Pei H., Jiang L., Hou Q., Nie C., Zhang L. (2018). "Phytohormone addition coupled with nitrogen depletion almost tripled the lipid productivities in two algae". *Bioresource Technol.* **247**, 904–914.
- Zeiler K.G., Heacox D.A., Toon S.T., Kadam K.L., Brown L.M. (1995). "The use of microalgae for assimilation and utilization of carbon dioxide from fossil fuel-fired power plant flue gas". *Energy Convers. Manag.* **36**, 707–712.
- Zhilan S., Xiao D., Jun W., Bing H., Yuancong W., Yi F.C. (2016). "Enhanced lipid accumulation of photoautotrophic microalgae by high-dose CO₂ mimics a heterotrophic characterization". *World J. Microbiol Biotechnol.* **32**, 1963-1966.

6. CONCLUSIONES



A partir de los resultados experimentales obtenidos y de la discusión realizada se han deducido las siguientes conclusiones:

1. Se ha determinado una composición físico-química muy diferente entre los dos tipos de aguas de almazaras: aguas de lavado de aceitunas y de aceites. A su vez las aguas residuales urbanas procedentes de tratamiento secundario presentaron una composición totalmente distinta y complementaria a las determinadas para las aguas residuales de lavado de aceitunas y aceites. Los mayores valores de DQO lo presentaron las aguas de lavado de aceites ($1006 - 1370 \text{ mg O}_2 \text{ dm}^{-3}$), seguido por las aguas de lavado de aceitunas ($530 - 1810 \text{ mg O}_2 \text{ dm}^{-3}$), mientras que en las residuales urbanas procedentes de tratamiento secundario se detectó el menor nivel de contaminación orgánica (con valor próximo a $250 \text{ mg O}_2 \text{ dm}^{-3}$).

En relación a los sólidos totales, los mayores porcentajes se determinaron en las aguas de lavado de aceitunas (0,29 – 0,32%) como era lógico de esperar, mientras que las aguas de lavado de aceites (0,08 – 0,13%) y las aguas de tratamiento secundario (0,13%) presentaron valores muy similares.

En cuanto a los compuestos de nitrógeno y fósforo, cabe destacar que las aguas residuales de almazaras son pobres en N y P en comparación con las aguas residuales urbana de tratamiento secundario. En aguas de lavado de aceites los porcentajes de nitrógeno total y fosfato estaban en los rangos $1,4 - 5,4 \text{ mg dm}^{-3}$, y $0,7 - 1,6 \text{ mg dm}^{-3}$, respectivamente; en aguas de lavado de aceitunas estos porcentajes fueron $3,4 - 12,5 \text{ mg dm}^{-3}$, y $0,3 - 0,8 \text{ mg dm}^{-3}$, mientras que en aguas residuales urbanas de tratamiento secundario los valores fueron elevadamente superiores, 265 mg dm^{-3} para N_{total} y 17 mg dm^{-3} para el ion PO_4^{3-} .

2. La selección de la microalga fue realizada utilizando como medio de cultivo los dos tipos de aguas residuales de almazaras. Esta selección se ha llevado a cabo entre las algas *Chlorella pyrenoidosa* y *Scenedesmus quadricauda*, usando como medios de cultivos: 50% del agua de lavado de aceitunas en un primer ensayo, y 30% de agua de lavado de aceites en un segundo ensayo. Se determinó que, en los dos tipos de aguas de almazaras, *C. pyrenoidosa* presentaba valores de velocidad específica máxima de crecimiento (ALF $0,013 \text{ h}^{-1}$, ALA $0,020 \text{ h}^{-1}$) y productividad volumétrica de biomasa (ALF $2,2 \text{ mg dm}^{-3}\text{h}^{-1}$, ALA $3,5 \text{ mg dm}^{-3}\text{h}^{-1}$) más altos que los correspondientes a *S. quadricauda*, en μ_m (ALF $0,012 \text{ h}^{-1}$, ALA $0,017 \text{ h}^{-1}$) y P_b (ALF $2,2 \text{ mg dm}^{-3}\text{h}^{-1}$, ALA $2,1 \text{ mg dm}^{-3}\text{h}^{-1}$).

También, en la composición bioquímica de la biomasa, *C. pyrenoidosa* fue más adecuada para el objetivo principal propuesto de producción de biodiesel; el porcentaje de lípidos totales alcanzados en la biomasa de *C. pyrenoidosa* fue superior (ALF 47,2%, ALA 50,6%) a los obtenidos con *S. quadricauda* (ALF 35,8%, ALA 37,7%).

3. El uso del medio de cultivo sintético de Rodríguez-López en el crecimiento de *C. pyrenoidosa*, modificando la temperatura de operación y el nivel de aeración en el fotobiorreactor, ha conducido a unos valores máximos de la velocidad específica máxima y de la productividad volumétrica en biomasa, próximos a $0,05 \text{ h}^{-1}$ y $6,7 \text{ mg dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

3.1 La influencia de la temperatura sobre el crecimiento de *C. pyrenoidosa*, se ha analizado en el intervalo de 15 a 30°C , encontrándose que fuera de este rango la formación neta de biomasa es baja. Los valores de la velocidad específica máxima de crecimiento vs temperatura se han

ajustado a la ecuación de Moser (1985), lo que ha permitido determinar las energías aparentes de activación (E_a) y de muerte celular (E_d):

$$E_a = 40 \text{ kJ mol}^{-1}$$

$$E_d = 323,3 \text{ kJ mol}^{-1}$$

A partir de estos datos se ha podido calcular la temperatura óptima, $T_{\text{óptima}} = 26,9^\circ\text{C}$, y la velocidad específica máxima de crecimiento correspondiente al máximo, $0,049 \text{ h}^{-1}$.

La productividad en biomasa presenta una variación con la temperatura similar a la observada con la velocidad específica máxima de crecimiento, siendo el máximo valor $6,65 \pm 0,00 \text{ mg dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ a 25°C .

- 3.2. Cuando se modifica la velocidad específica de suministro de aire, se observa cierta influencia sobre las velocidades específicas máxima de crecimiento, productividad volumétrica y la composición bioquímica de la biomasa. El valor de μ_m aumentó cuando el nivel de aeración se modificó de 0,0 a 1,5 v/v/min. También, P_b se incrementó cuando Q se aumentó de 0,0 a 1,0 v/v/min, aunque posteriormente disminuyó. Los valores más altos se alcanzaron a nivel de aeración de 1,0 v/v/min, $\mu_m = 0,047 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$ y $P_b = 6,65 \pm 0,00 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. La variación de la velocidad específica máxima de crecimiento con la velocidad específica de suministro de aire, Q , se ha ajustado a una ecuación tipo polinómica:

$$\mu_m = a + bQ + cQ^2$$

El ajuste se ha realizado mediante regresión no lineal, obteniendo los siguientes resultados para los distintos parámetros:

$$a = 0,0181 \text{ h}^{-1}$$

$$b = 0,0272 \text{ h}^{-1} (\text{v/v/min})^{-1}$$

$$c = -0,40 \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1} (\text{v/v/min})^{-2}$$

A partir de estos resultados se ha podido evaluar la velocidad específica máxima de crecimiento correspondiente al máximo, $0,047 \text{ h}^{-1}$, y el valor de la velocidad específica de suministro de aire que origina el valor máximo de μ_m , $Q_{\text{máx}}$:

$$(\mu_m)_{\text{máx}} = 0,0494 \text{ h}^{-1} \quad Q_{\text{máx}} = 1,46 \text{ v/v/min}$$

En la composición bioquímica de la biomasa, se determina que el porcentaje más alto de lípidos totales, $48,8 \pm 0,8\%$, se alcanza a la temperatura de 25°C y a una velocidad específica de suministro de aire de 1 v/v/min.

4. Se ha demostrado que la utilización de las aguas residuales de lavado de aceitunas, lavado de aceites y el uso conjunto de estos tipos de efluentes líquidos de almazaras con las aguas residuales urbanas procedentes de tratamiento secundario, constituyen un medio nutriente adecuado para el crecimiento de la microalga *C. pyrenoidosa*. En estos medios de cultivos se han alcanzado valores de la velocidad específica máxima de crecimiento y de la productividad volumétrica en biomasa muy próximos a los alcanzados en el medio sintético de Rodríguez-López cuando se utilizan las mismas condiciones de operación.

- 4.1 La utilización de aguas de lavado de aceitunas de almazaras (ALF), como medio nutriente para la formación de biomasa de *C. pyrenoidosa*, ha conducido a unos valores máximos de $\mu_m = 0,036 \pm 0,008 \text{ h}^{-1}$ y $P_b = 2,22 \pm 0,00 \text{ mg dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ cuando la concentración inicial de ALF en el medio de cultivo fue 50%, la temperatura 25°C y la velocidad específica de suministro de aire 1 v/v/min. En estas condiciones de operación el porcentaje de lípidos totales fue $47,4 \pm 0,0\%$, aunque el mayor contenido en lípidos se obtuvo cuando se usó como medio cultivo una concentración del 100% de ALF.

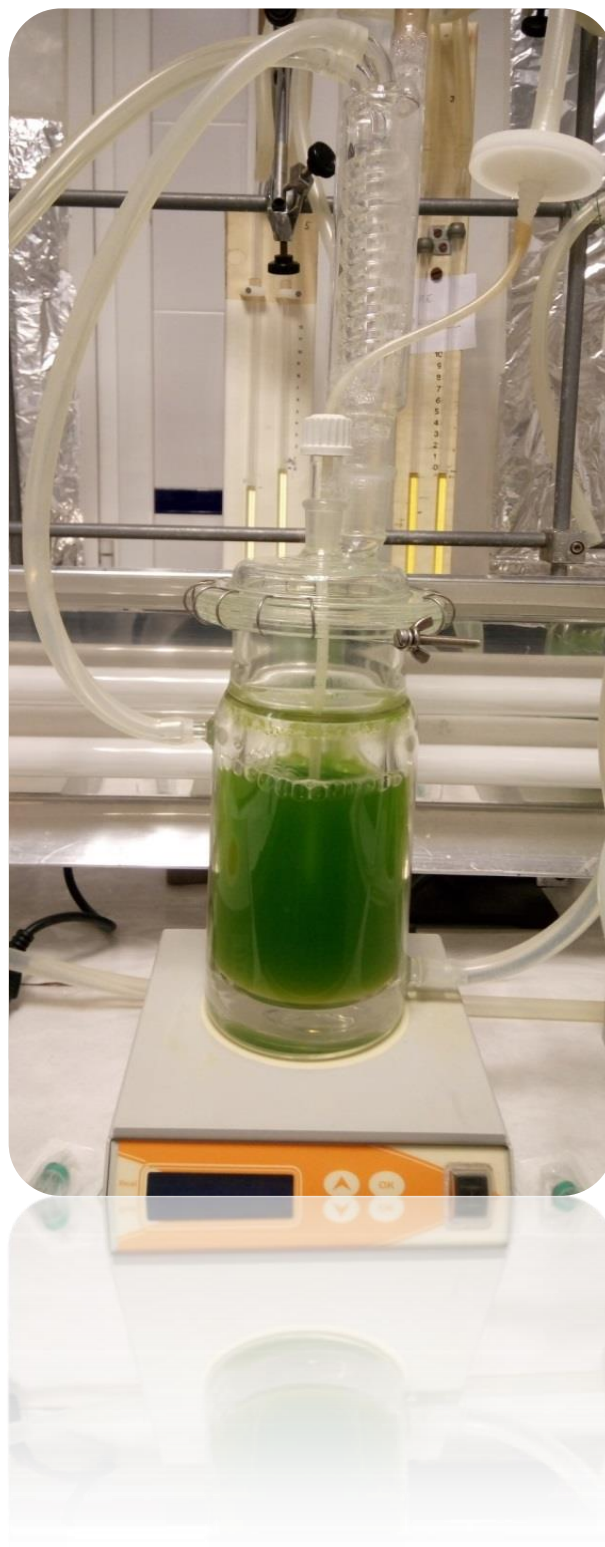
- 4.2 Cuando se utilizan aguas de lavado de aceites, los valores de las velocidades específicas máxima de crecimiento y las productividades volumétricas de biomasa fueron menores en relación a cuando el medio nutriente fue aguas de lavado de aceitunas. Los valores más elevados de $\mu_m = 0,028 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$ y $P_b = 1,40 \pm 0,30 \text{ mg dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ se alcanzan con una concentración inicial de ALA del 30%, temperatura de 25°C y a una velocidad específica de suministro de aire de 1 v/v/min. Estos menores valores de μ_m y P_b se pueden justificar considerando que en este medio de cultivo existe mayor inhibición por sustrato, ya que el contenido de compuesto fenólicos en estas aguas residuales es mayor. Cabe destacar que en estas condiciones de operación el porcentaje de lípidos totales en la biomasa producida fue 49%, superior al obtenido en el medio sintético de Rodríguez-López; en la fracción lipídica, los mayores porcentajes correspondieron a las fracciones de ácidos grasos poliinsaturados (47,1%) y esenciales (41,9%). También, en este medio de cultivo, se determina que los contenidos totales de clorofilas y carotenoides por célula aumentaron durante el transcurso del experimento.
- 4.3 En la utilización conjunta de aguas de almazaras y aguas residuales urbanas procedentes de tratamiento secundario, se obtiene unos valores de los parámetros cinéticos elevados y una concentración de biomasa mayor que cuando se emplea las aguas de almazaras por separados. Los mayores valores de la velocidad específica de crecimiento ($0,035 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$) y productividad en biomasa ($3,05 \pm 0,00 \text{ mg dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$), se han alcanzado en el cultivo realizado con el 50% de ALF y el resto agua residual urbana procedente de tratamiento secundario, manteniendo la temperatura a 25°C y una velocidad específica de suministro de aire de 1 v/v/min; en estas condiciones se alcanzó la máxima concentración de biomasa, $0,996 \pm 0,034 \text{ g dm}^{-3}$; sin embargo, el contenido en lípidos totales fue más bajo, $41,3 \pm 0,4\%$. Este hecho se justifica considerando que las aguas residuales urbanas de tratamiento secundario contienen mayor contenido en compuestos de nitrógeno, lo que implica mayor formación de proteínas y con ello una disminución en el contenido de lípidos.
- 4.4 Cuando se modifica la concentración de dióxido de carbono en la fases gas de entrada al fotobiorreactor, usando medios con 50% de aguas de lavado de aceitunas, medios con 30% de aguas de lavado de aceites y medios con los tres tipos de aguas (50% ALF, 30% ALA y 20% de aguas procedentes de tratamiento secundario), se observa que los valores más elevados de la concentración de biomasa, velocidad específica máxima de crecimiento y productividad volumétrica en biomasa se alcanzan cuando se emplea una concentración de CO_2 del 10%, temperatura de 25°C y a una velocidad específica de suministro de aire de 1 v/v/min. En estas condiciones, *C. pyrenoidosa* presentaba valores más elevados de la velocidad específica máxima de crecimiento ($0,0331 \pm 0,0001 \text{ h}^{-1}$) y productividad volumétrica en biomasa ($5,70 \pm 0,00 \text{ mg dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$) cuando el medio de cultivo estaba constituido solo por agua de lavado de aceites a una concentración del 30%. Sin embargo, en términos de contenido total de lípidos, la biomasa de *C. pyrenoidosa* alcanzó un $49,0 \pm 0,0\%$ en el cultivo con el 50% aguas de lavado de aceitunas mezcladas y 10% de CO_2 . Estos resultados indican que la mezcla entre los tres efluentes, en las proporciones indicadas, aunque permiten un aporte muy adecuado de nutrientes, no conducen de forma simultánea a unos valores más elevados de los parámetros cinéticos y de la concentración de lípidos en la biomasa.

En todos los cultivos realizados utilizando aguas residuales de almazaras y aguas urbanas de tratamiento secundario, de forma separada o conjuntamente, con adición o no de CO₂ en la fase gas de entrada al fotobiorreactor, se ha demostrado cuantitativamente que la formación de pigmentos (clorofilas y carotenoides) y la síntesis de proteínas está ligado a la formación de biomasa.

5. Generalmente, en todos los cultivos, se han determinado una reducción en los parámetros físico-químicos en el agua final del cultivo, una vez separada la biomasa microalgal. El dióxido de carbono contribuyó a mejorar la capacidad de *C. pyrenoidosa* para eliminar los contaminantes de las aguas residuales. Cabe destacar que, cuando se ha utilizado conjuntamente los tres tipos de aguas (50% ALF, 30% ALA y 20% de aguas procedentes de tratamiento secundario) y 10% dióxido de carbón en la fase gas de entrada al fotobiorreactor, se ha determinado una disminución del contenido en nitratos del 72,0±0,4%; también, cabe indicar que el % eliminado en compuestos fenólicos, iones amonio y nitrito, al final del cultivo, fueron 90,1±0,5, 96,4±0,0 y 99,4±0,0%, respectivamente. Sin embargo, se observó una reducción en el contenido de fosfato de sólo el 64,3±0,4%, cuando se usó 10,0% de dióxido de carbono adicionado a la fase gas; este porcentaje de disminución es menor que el obtenido sin mezclar aguas de almazaras con aguas residuales urbanas. Por otra parte, la máxima generación de oxígeno, 322%, tuvo lugar en los cultivos que usaron una concentración de 50% de aguas residuales de lavado de aceitunas y 50% de aguas de tratamiento secundario.
6. Finalmente, considerando la hipótesis de partida y los objetivos planteados, se ha comprobado que las aguas residuales de almazaras y las aguas urbanas procedentes de tratamiento secundario, de forma separada o bien conjuntamente, pueden constituir un buen medio de cultivo para el crecimiento eficiente de la microalga *C. pyrenoidosa*, que conduce a obtener altos valores de la velocidad específica máxima de crecimiento, de la productividad volumétrica, y del contenido en lípidos en la biomasa producida. La adición de dióxido de carbono, en la fase gas de entrada al fotobiorreactor, mejora aun más los parámetros cinéticos, manteniendo un porcentaje elevado de lípidos totales en la biomasa obtenida y paralelamente incrementado los porcentajes de reducción de los contaminantes en el agua final, una vez separada la biomasa algal.

Globalmente, la utilización de un medio de cultivo constituido por 50% de aguas de lavado de aceitunas, 30% de aguas de lavado de aceites, 20% de aguas urbanas de tratamiento secundario, y 10% de CO₂ en la fase gas de entrada al fotobiorreactor, usando una temperatura de 25°C y una velocidad específica de suministro de fase gas de 1 v/v/min, conduce a las condiciones de operación más favorables para alcanzar los objetivos iniciales planteados. En estas condiciones de operación se han determinado una velocidad específica máxima de crecimiento de 0,032±0,000 h⁻¹, una productividad volumétrica en biomasa de 4,35±0,02 mg dm⁻³ h⁻¹, y se ha alcanzado un contenido en lípidos totales en la biomasa producida de 46,5±0,4 %, con un perfil de ácidos grasos mayoritarios de 28,4±0,1% en oleico, 16,2±0,3% en palmítico, 13,3±0,4% en linoleico y 12,5±0,0% en linolénico. Este perfil de ácidos es muy apropiado para la producción de biodiesel.

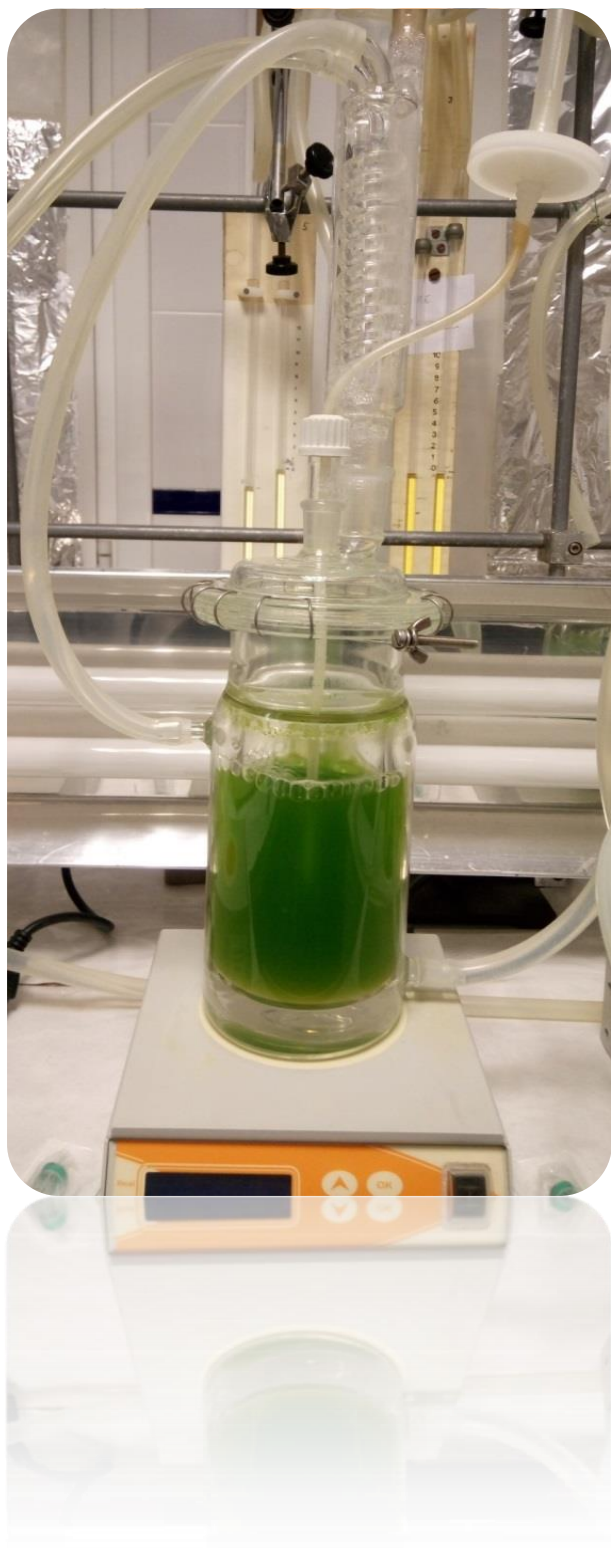
7. NOMENCLATURA



ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
A ₆₀₀	Absorbancia a 600 nm
A ₆₆₄	Absorbancia a 664 nm
A ₆₄₇	Absorbancia a 600 nm
A ₄₈₀	Absorbancia a 600 nm
A ₅₉₅	Absorbancia a 600 nm
AGP	ácidos grasos superiores poliinsaturados
ALA	Agua de lavado aceite (procedente del proceso continuo con decánter de dos salidas)
ALAC	Agua de lavado de aceites y dióxido carbono
ALARU	Agua de lavado aceite y agua residuales urbanas (tratamiento secundario)
ALF	Agua de lavado aceitunas
ALFARU	Agua de lavado de aceitunas, agua de lavado de aceites y agua residual urbana
ALFARUC	Agua de lavado de aceites, agua de lavado de aceitunas, agua residual urbana y dióxido carbono
ALFC	Agua de lavado de aceitunas y dióxido carbono
ALFRU	Agua de lavado aceitunas y agua residuales urbanas (tratamiento secundario)
Ca	Concentración de carotenoides totales, $\mu\text{g cm}^{-3}$
%Ca	Porcentaje de carotenoides totales referido a la biomasa seca, g g^{-1}
CFT	Compuestos fenólicos totales, mg dm^{-3}
CHL	Concentración total de clorofilas, $\mu\text{g cm}^{-3}$
CHL _a	Concentración de clorofila a, $\mu\text{g cm}^{-3}$
CHL _b	Concentración de clorofila b, $\mu\text{g cm}^{-3}$
CHL _a /CHL _b	Relación entre el contenido de clorofilas a y b
CHL/N	Contenido de clorofilas por células, g cel^{-1}
CHL _t	Concentración de clorofila totales, $\mu\text{g cm}^{-3}$
%CHL _t	Porcentaje de clorofilas totales referido a la biomasa seca, g g^{-1}
ChSA	Cultivo con <i>C. pyrenoidosa</i> en aguas de lavado de aceites, usando el agitador orbital
ChSF	Cultivo con <i>C. pyrenoidosa</i> en aguas de lavado de aceitunas, usando el agitador orbital
DBO ₅	Demanda bioquímica de oxígeno
DHA	Ácido docosahexaenoico, 22:6(n-3)
DQO	Demanda química de oxígeno
EPA	Ácido eicosapentaenoico, 20:5(n-3)
E _a	Energía aparente de activación de crecimiento, kJ mol^{-1}
E _d	Energía aparente de activación de muerte, kJ mol^{-1}
ESE	Esenciales ácidos grasos
L, %	El porcentaje de lípidos totales
Δh	Diferencia de altura manométrica, cm
I ₀	Intensidad inicial de iluminación, $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$
I _i	Intensidad iluminación promediada a cada nivel del fotobiorreactor, $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$
I _f	Intensidad de iluminación fin del experimento, $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
M	Medio del cultivo
MNO	Monoinsaturados ácidos grasos
N ^o	Número de células por unidad de volumen, Cel dm^{-3}
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
P	Concentración de proteínas, $\mu\text{g cm}^{-3}$
P/N	Cantidad de proteínas por célula, g cel^{-1}
%P	Porcentaje de proteínas referido a la biomasa seca, g g^{-1}
P _b	La productividad volumétrica de biomasa, $\text{g dm}^{-3} \text{h}^{-1}$
P _{Ca}	La productividad volumétrica de carotenoides, $\text{g dm}^{-3} \text{h}^{-1}$
P _{CHL}	La productividad volumétrica de clorofilas, $\text{g dm}^{-3} \text{h}^{-1}$
P _{cruda}	Proteínas crudas referido a la biomasa calculadas mediante la multiplicación del porcentaje de nitrógeno por el factor 6,25, %
P _p	La productividad volumétrica de proteínas, $\text{g dm}^{-3} \text{h}^{-1}$
POL	Poliinsaturados ácidos grasos
Q	Velocidad específica de suministro del aire, v/v/min y caudal volumétrico de la fase gaseosa, L min^{-1}
Q ₁₀	Coeficiente de temperatura definido en la ecuación [5.8]
q _{Ca}	Velocidades específica máxima de formación de carotenoide referido a la biomasa

	seca $\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$
q_{CHL}	Velocidades específica máxima de formación de clorofila referido a la biomasa seca $\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$
q_{p}	Velocidades específica máxima de formación de proteína referido a la biomasa seca $\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$
R-L	Media Rodríguez-López
RU	Agua residuales urbanas
SAT	Saturados ácidos grasos
ScSA	Cultivo con <i>S. quadricauda</i> en aguas de lavado de aceites, usando el agitador orbital
ScSF	Cultivo con <i>S. quadricauda</i> en aguas de lavado de aceitunas, usando el agitador orbital
r^2	Coefficiente de regresión lineal
T	Temperatura de operación, °C
UP	Agua ultrapura
x	Concentración de biomas de microalga, g dm^{-3}
$Y_{\text{X/S}}$	Rendimiento en biomasa, g g^{-1}
$Y_{\text{P/S}}$	Rendimiento en producto, g g^{-1}
α_{Ca}	El coeficiente estequiométrico para la formación de carotenoides, $\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$
α_{CHL}	El coeficiente estequiométrico para la formación de clorofilas, $\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$
α_{p}	El coeficiente estequiométrico para la formación de proteínas, $\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$
μ_{m}	Velocidad específica de crecimiento, h^{-1}
$\mu_{\text{m máx}}$	Velocidad específica de crecimiento correspondiente al máximo, h^{-1}

8. ANEXOS



ÍNDICE

8. ANEXOS

A. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS AGUAS RESIDUALES UTILIZADAS EN LA FORMACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS.....	211
B. ELECCIÓN DE LA MICROALGA.....	214
B.1. Cultivos de <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	214
B.2. Cultivos de <i>Scenedesmus quadricauda</i>	218
C. CULTIVOS DE <i>Chlorella pyrenoidosa</i> EN EL MEDIO SINTÉTICO MINERAL DE RODRÍGUEZ -LÓPEZ.....	222
D. CULTIVOS DE <i>Chlorella pyrenoidosa</i> EN AGUAS RESIDUALES.....	254
E. CARACTERIZACIÓN DEL AGUA RESIDUAL DESPUÉS DEL PROCESO.....	363

En esta investigación, se han llevado a cabo cultivos de microalgas en medio sintético y en medios reales formados con aguas residuales. Para el desarrollo de estos cultivos se ha diseñado el siguiente plan de trabajo. En primer lugar, se ha realizado una revisión bibliográfica para elegir las microalgas a utilizar, optando por *Scenedemus quadricauda* y *Chlorella pyrenoidosa* debido a su alta velocidad específica de crecimiento, alto contenido registrado en lípidos y sus altas resistencias de crecer en condiciones ambientales extremas y en medios de composición compleja en presencia de compuestos inhibidores del crecimiento (en especial, los compuestos fenólicos).

La elección de la microalga a utilizar en los medios de cultivos con aguas residuales reales, se ha llevado a cabo mediante el desarrollo de dos cultivos con cada microalga. En estos dos cultivos, se han utilizado dos medios de cultivos diferentes formados a base de aguas de lavado de aceite (30% de aguas de lavado de aceite (ALA)/agua ultra pura (UP), v/v) y aguas de lavado de aceitunas (50% de aguas de lavado de aceitunas (ALF)/agua ultra pura (UP), v/v)). Estos experimentos, se han llevado a cabo en el agitador orbital.

Una vez seleccionada la microalga *Chlorella pyrenoidosa* y como medios de control, se han llevado a cabo dos series experimentales en el medio mineral sintético de Rodríguez-López (1964). En la primera serie experimental, se ha estudiado la influencia de la velocidad de suministro de aire (0-1,5 v/v/min) y en la segunda serie experimental, se ha estudiado el efecto de la temperatura de operación (15-30°C).

Finalizados los cultivos de control con la microalga seleccionada, se ha procedido a realizar seis diferentes series experimentales con aguas residuales industriales procedentes de almazaras y aguas residuales urbanas procedentes del tratamiento secundario. Las series experimentales realizadas se indican a continuación:

- Agua de lavado de aceitunas y agua residual urbana (tratamiento secundario), ALFRU.
- Agua de lavado de aceites. Proceso de centrifugación de dos salidas, ALA.
- Agua de lavado de aceitunas. Proceso de centrifugación de dos salidas, ALF.
- Agua de lavado de aceitunas, agua de lavado de aceites y agua residual urbana, ALFARU.
- Agua de lavado de aceitunas y dióxido carbono, ALFC.
- Agua de lavado de aceites y dióxido carbono, ALAC.

Los resultados experimentales obtenidos se han presentado en forma de Tablas y en Figuras. En cada Tabla se incluye, para cada tiempo, t (en horas):

- 1- La concentración en biomasa, x (g dm^{-3}).
- 2- El número de células por unidad de volumen, N (Cel dm^{-3}).
- 3- La concentración de clorofilas totales, CH (g dm^{-3}).
- 4- La concentración de carotenoides totales, Ca (g dm^{-3}).
- 5- La concentración de proteínas, P (g dm^{-3}).
- 6- La concentración de lípidos totales, L (%).

Las condiciones de operación empleadas en cada experimento con medio Rodríguez-López han sido:

- 1- Microalga utilizada *Chlorella pyrenoidosa* y *Scenedesmus quadricauda*.
- 2- Concentración inicial de inculó 10 %.
- 3- pH = 8,0.
- 4- Periodo luz-oscura 12:12 h.

En todas las series experimentales, las condiciones de operación utilizadas han sido:

- 1- Concentración inicial de inculó 10 %.
- 2- Velocidad específica de suministro de aire 1 v/v/min.
- 3- Temperatura 25°C.
- 4- PH = 8,0.
- 5- Periodo luz-oscura 12:12 h.

A. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS AGUAS RESIDUALES UTILIZADAS EN LA FORMACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS

Tabla A.1. Caracterización físico-química de las aguas de lavado de aceitunas (ALF) utilizadas en los medios de cultivo

PARÁMETRO / FECHA	ALF	
	07/02/2017	03/01/2018
pH	7,42	7,48
CE (mS/cm)	2,70	1,69
Turbidez (FTU)	1585	1722
O disuelto (mg dm ⁻³)	2,65	1,50
ST (%)	0,32	0,291
Materia grasa (%)	0,0452	0,0328
CFT (mg dm ⁻³)	3,38	0,915
Materia orgánica volátil (%)	0,086	0,0327
DBO ₅ (mg O ₂ dm ⁻³)	491	422
DQO (mg O ₂ dm ⁻³)	535	632
Cenizas (%)	0,234	0,259
N total (mg dm ⁻³)	3,40	12,5
NO ₂ ⁻ (mg dm ⁻³)	1,30	0,209
NO ₃ ⁻ (mg dm ⁻³)	0,801	1,55
NH ₄ ⁺ (mg dm ⁻³)	< 4,0	< 4,0
P total (mg dm ⁻³)	0,750	0,325
SO ₄ ²⁻ (mg dm ⁻³)	414	273
Cu ²⁺ (mg dm ⁻³)	1,91	<0,05
Cl ⁻ (mg dm ⁻³)	649	458
Mg ²⁺ (mg dm ⁻³)	47,0	26,2

Tabla A.2. Caracterización físico-química de aguas de lavado de aceites (ALA) utilizadas en los medios de cultivo

PARÁMETRO / FECHA	ALA	
	13/01/2017	03/01/2018
pH	6,29	7,41
CE (mS/cm)	1,32	4,33
Turbidez (FTU)	190	218
O disuelto (mg dm⁻³)	2,01	2,05
ST (%)	0,127	0,0766
Materia grasa (%)	0,0892	0,0390
CFT (mg dm⁻³)	11,1	5,33
Materia orgánica volátil (%)	0,0892	0,0390
DBO₅ (mg O₂ dm⁻³)	1358	852
DQO (mg O₂ dm⁻³)	1362	1006
Cenizas (%)	0,0378	0,0376
N_{total} (mg dm⁻³)	5,40	1,36
NO₂⁻ (mg dm⁻³)	0,387	0,166
NO₃⁻ (mg dm⁻³)	1,95	0,625
NH₄⁺ (mg dm⁻³)	< 4,0	< 4,0
P_{total} (mg dm⁻³)	1,63	0,655
SO₄²⁻ (mg dm⁻³)	217	165
Cu²⁺ (mg dm⁻³)	1,60	1,19
Cl⁻ (mg dm⁻³)	172	62,5
Mg²⁺ (mg dm⁻³)	62,4	46,5

Tabla A.3. Caracterización físico-química de las aguas residuales urbanas utilizada en la formación del medio de cultivo

PARAMÉTRO / FECHA	
	08/05/2014
pH	7,08
CE (mS/cm)	5,47
Turbidez (FTU)	72
O disuelto (mg dm ⁻³)	3,70
ST (%)	0,131
Materia grasa (%)	0,0780
CFT (mg dm ⁻³)	0,07 < 0,1
Materia orgánica volátil (%)	0,018
DBO ₅ (mg O ₂ dm ⁻³)	132
DQO (mg O ₂ dm ⁻³)	252
Cenizas (%)	0,113
N _{total} (mg dm ⁻³)	265
NO ₂ ⁻ (mg dm ⁻³)	31,7
NO ₃ ⁻ (mg dm ⁻³)	34,5
NH ₄ ⁺ (mg dm ⁻³)	205
P _{total} (mg dm ⁻³)	17,1
SO ₄ ²⁻ (mg dm ⁻³)	162
Cu ²⁺ (mg dm ⁻³)	< 0,05
Cl ⁻ (mg dm ⁻³)	1200
Mg ²⁺ (mg dm ⁻³)	14,8

B. ELECCIÓN DE LA MICROALGA**B.1. Cultivos de *Chlorella pyrenoidosa***

Tabla B.1. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados a base de aguas de lavado de aceitunas

Expt: 1 ChSF

MEDIO = 50 % ALF + UP

<i>C. pyrenoidosa</i>			pH = 8,0		T = 25 °C	
t h	x 10 ³ g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %
0,0	0,407	0,360	0,217	0,0200	1,44	
15,0	0,495	0,560	0,494	0,0398	1,85	
38,5	0,588	0,840	0,924	0,197	2,33	
62,5	0,779	1,74	1,16	0,273	2,54	
88,0	1,03	3,20	1,56	0,355	2,18	
134,5	2,30	4,40	2,07	0,454	4,45	
159,0	2,89	7,00	2,74	0,562	5,50	
193,0	3,53	8,00	3,68	0,813	5,82	
217,0	4,02	9,40	4,91	0,987	3,82	
240,5	4,56	10,2	4,80	1,12	3,61	
265,5	4,70	11,8	4,47	1,21	3,41	
312,5	5,15	12,2	1,98	1,01	5,19	
336,5	5,59	11,6	1,78	0,971	4,98	
360,5	5,54	10,4	1,69	0,952	4,59	
386,5	5,44	8,80	1,24	0,822	4,35	
410,5	5,19	6,20	1,16	0,756	4,14	47,2

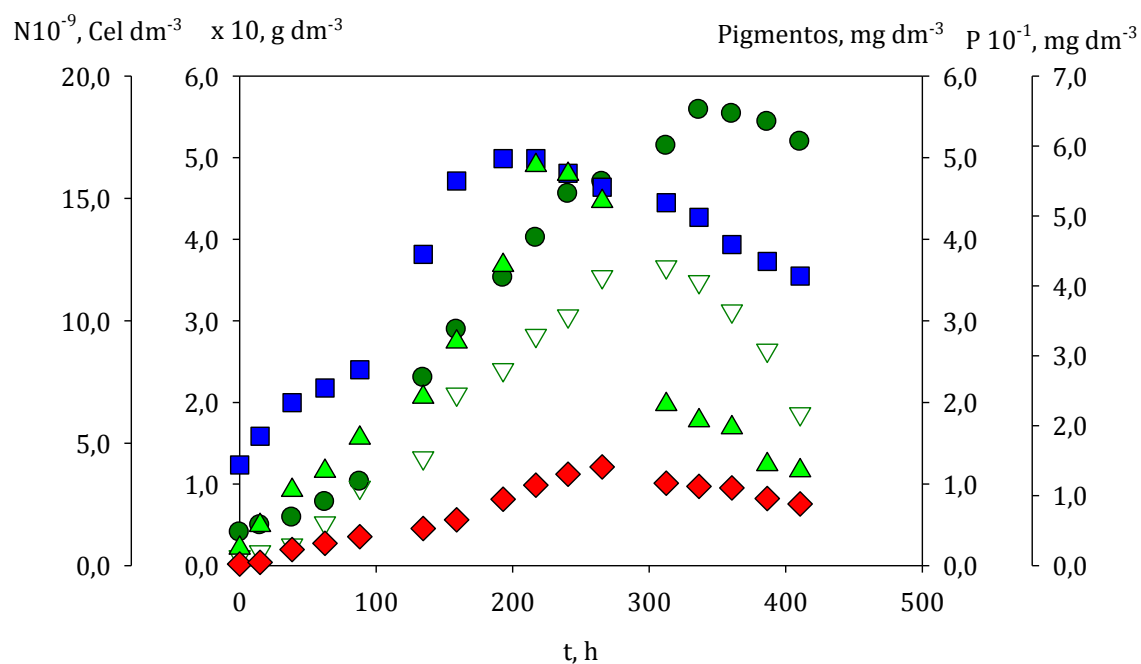


Figura B.1 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) frente al tiempo en el Exp. 1 ChSF.

Tabla B.2. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 1 ChSF

% N	% C	% H	% S	% O
2,48	45,7	6,18	0,550	45,1

Tabla B.3. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 1 ChSF

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,608	20:0	0,103
14:1	0,707	18:3n3	15,2
16:0	19,5	18:4n3	0,105
16:1	3,45	20:1n9	0,189
16:2	3,35	20:2n6	0,121
16:3	0,369	22:0	0,575
18:0	7,39	22:1n9	0,154
18:1	28,3	20:5n3	0,524
18:2n3	0,155	22:5n3	0,338
18:2n6	12,8	N.I.	6,1

Tabla B.4. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en los cultivos realizados usando aguas de lavado de aceite

Expt: 2 ChSA

MEDIO = 30 % ALA + UP

<i>C. pyrenoidosa</i>		pH = 8,0				T = 25 °C
t h	x 10 ³ g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %
0,0	0,387	1,460	0,0377	0,00800	2,12	
21,0	0,593	2,00	0,621	0,159	2,61	
45,5	0,911	3,42	0,615	0,157	3,82	
68,0	1,35	4,22	0,734	0,234	5,50	
93,5	2,60	11,8	1,39	0,424	10,6	
118,5	3,43	13,6	1,91	0,496	13,1	
165,0	4,80	19,0	4,52	1,16	13,1	
189,0	5,73	22,0	5,80	1,74	13,5	
213,0	6,91	24,4	6,65	1,91	16,3	
241,5	7,74	27,6	7,86	2,24	17,5	
261,5	8,53	29,0	9,52	2,47	19,2	
285,0	9,36	30,4	10,0	2,77	20,4	
309,0	10,1	31,8	10,3	2,43	21,7	
333,0	10,8	32,6	10,3	2,32	20,6	
357,0	11,5	33,2	9,3	2,08	19,4	
381,0	11,6	32,2	7,00	1,54	18,8	
405,0	11,4	31,6	6,62	1,13	17,5	50,6

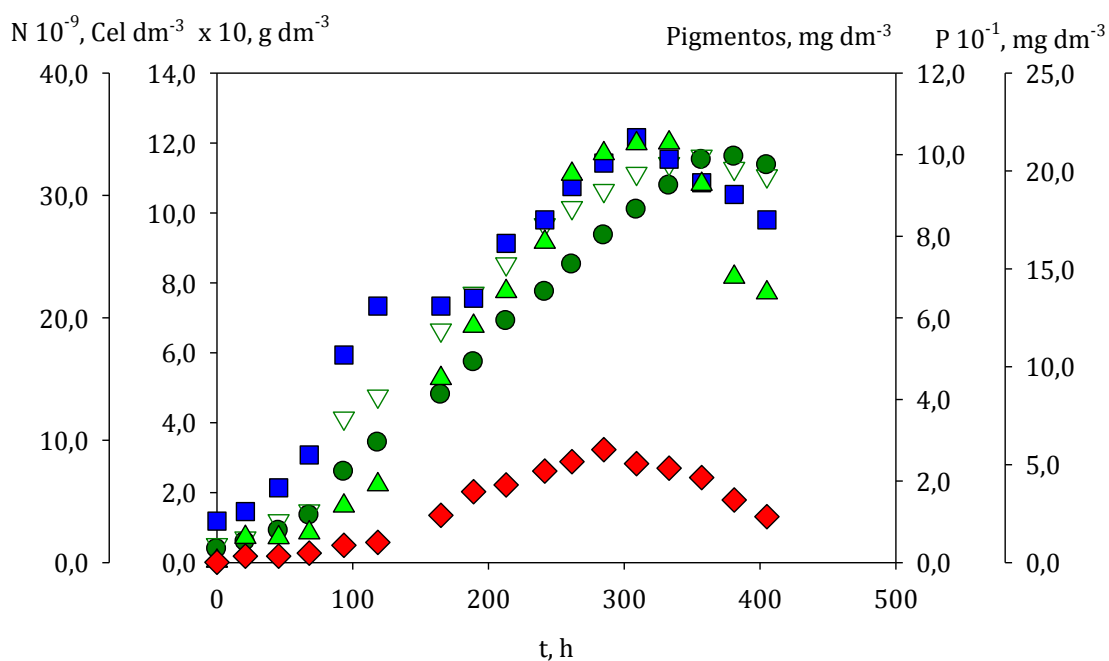


Figura B.2 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) frente al tiempo en el Exp. 2 ChSA.

Tabla B.5. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 2 ChSA

% N	% C	% H	% S	% O
6,70	48,4	6,09	0,702	38,1

Tabla B.6. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 2 ChSA

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,489	18:2n3	0,111
14:1	0,692	18:2n6	16,7
16:0	17,5	20:0	0,107
16:1	4,01	18:3n3	12,5
16:2	4,89	20:2n6	0,199
16:3	0,459	22:0	0,245
18:0	7,21	20:5n3	0,897
18:1	26,9	N.I.	7,1

B.2. Cultivos de *Scenedesmus quadricauda*

Tabla B.7. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados a base de aguas de lavado de aceitunas

Expt: 1 ScSF

MEDIO = 50 % ALF + UP

<i>S. quadricauda</i>		pH = 8,0				T = 25 °C
t h	x 10 ³ g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %
0,0	0,519	0,480	0,377	0,100	2,02	
15,0	0,691	0,760	0,590	0,139	2,88	
38,5	0,882	1,06	0,988	0,197	3,72	
62,5	1,07	2,36	1,16	0,312	4,14	
88,0	1,57	4,60	1,63	0,386	5,30	
134,5	2,55	6,20	2,13	0,492	5,50	
159,0	3,28	8,00	2,92	0,637	6,35	
193,0	3,97	8,80	4,04	0,923	8,34	
217,0	4,56	9,80	4,96	1,17	5,93	
240,5	5,10	10,8	4,97	1,19	5,93	
265,5	5,39	11,0	4,47	1,15	5,72	
312,5	5,49	11,2	1,98	0,841	5,51	
336,5	5,78	11,2	1,78	0,646	5,19	
360,5	5,54	10,0	1,69	0,572	4,98	
386,5	5,49	7,20	1,24	0,500	4,98	
410,5	5,39	6,60	1,01	0,402	4,88	35,8

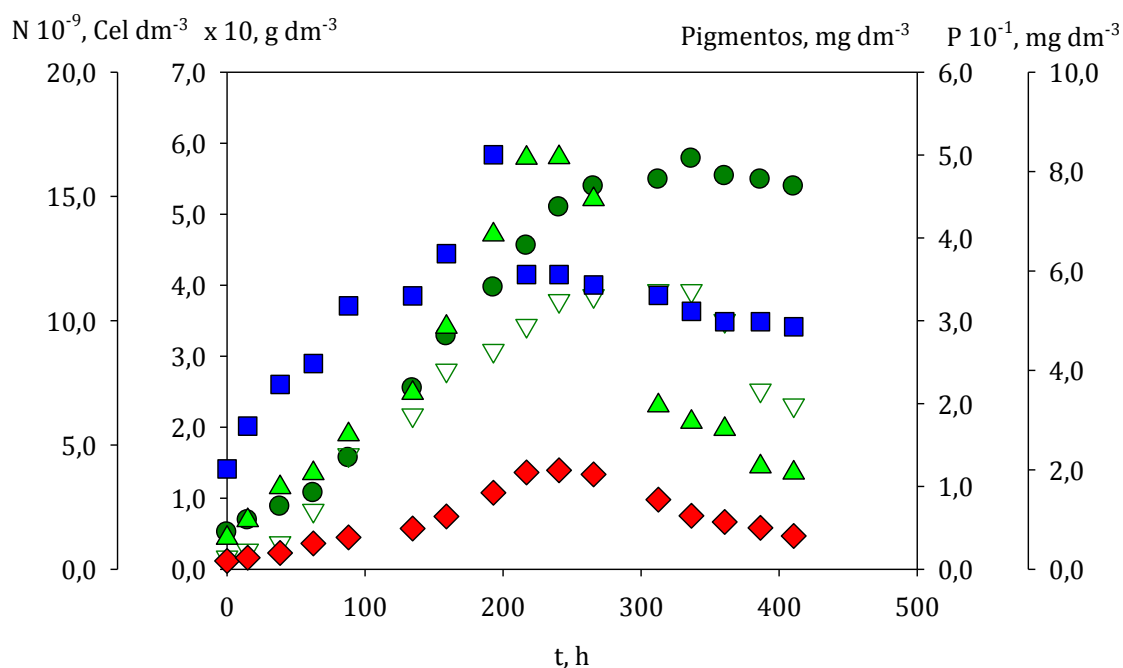


Figura B.3 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 1 ScSF.

Tabla B.8. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 1 ScSF

% N	% C	% H	% S	% O
1,71	50,6	6,86	0,561	40,2

Tabla B.9. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 1 ScSF

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,171	18:3n3	0,163
14:1	0,0270	20:1n9	0,452
16:0	0,0972	18:4n3	0,902
16:1	0,410	20:2n6	0,252
16:2	20,0	22:00	0,194
16:3	0,0663	22:1n9	0,268
18:0	0,338	20:5n3	0,00844
18:1	21,1	22:5n3	0,197
18:2n3	41,0	22:6n3	0,0235
18:2n6	2,87	N.I.	10,9
20:0	0,509		

Tabla B.10. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en los cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas

Expt: 2 ScSA

MEDIO = 30 % ALA + UP

<i>S. quadricauda</i>		pH = 8,0			T = 25 °C	
t h	x 10 ³ g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %
0,0	0,441	0,540	0,956	0,209	2,16	
13,0	0,544	0,720	0,966	0,219	2,62	
37,0	0,769	1,80	1,64	0,335	3,55	
63,0	1,22	1,98	2,23	0,468	5,30	
109,0	2,70	4,40	3,12	0,612	11,2	
133,0	3,09	5,60	3,38	0,682	11,9	
157,0	3,53	12,0	3,41	0,825	10,4	
181,5	3,92	13,2	3,43	0,928	9,07	
205,5	4,66	14,4	3,97	0,992	8,49	
232,0	5,24	15,8	4,83	1,24	8,07	
280,5	5,49	15,0	4,94	1,35	8,07	
305,0	5,73	14,0	3,63	1,51	5,72	
325,5	5,88	12,2	3,21	1,32	5,82	
345,5	5,98	12,2	2,87	0,885	5,81	
367,5	5,93	11,8	2,62	0,838	5,61	
393,0	5,49	11,0	1,92	0,672	4,56	
444,0	4,46	10,0	1,74	0,584	4,02	37,7

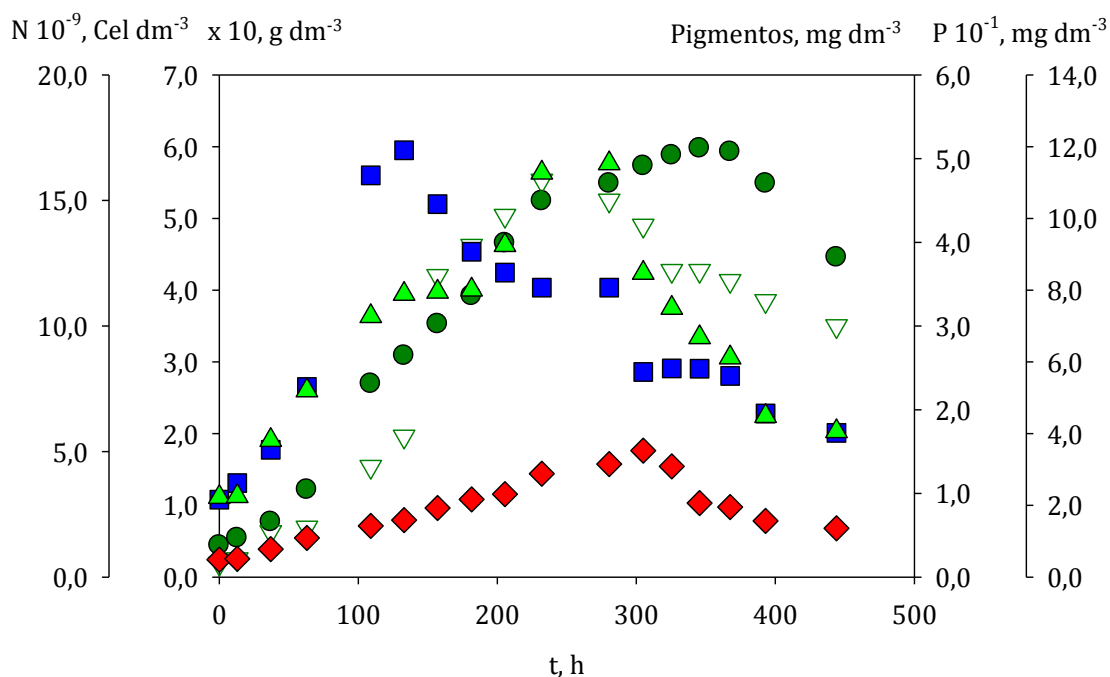


Figura B.4 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 2 ScSA

Tabla B.11. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 2 ScSA.

% N	% C	% H	% S	% O
8,25	47,6	7,90	0,876	35,4

Tabla B.12. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 2 ScSA

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,0225	18:3n3	0,127
14:1	0,0826	20:1n9	0,513
16:0	0,0393	18:4n3	0,557
16:1	2,09	20:2n6	0,442
16:2	25,4	22:0	0,317
16:3	0,245	22:1n9	0,996
18:0	0,695	20:5n3	0,439
18:1	22,46	22:5n3	0,271
18:2n3	37,1	22:6n3	0,0880
18:2n6	1,52	N.I.	6,31
20:0	0,289		

C. CULTIVOS DE *Chlorella pyrenoidosa* EN EL MEDIO SINTÉTICO MINERAL DE RODRÍGUEZ-LÓPEZ

➤ Efecto de la temperatura

Tabla C.1. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando el medio de Rodríguez-López

Expt: 1 RL

T = 15 °C

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		M = R-L	I₀ = 124,24 μE m⁻² s⁻¹	
t h	x 10 g dm⁻³	N 10⁻⁹ Cel dm⁻³	CHL 10³ g dm⁻³	Ca 10³ g dm⁻³	P 10² g dm⁻³	L %
0,0	0,0860	0,200				
3,0	0,0860	0,437				
6,0	0,0860	0,454				
9,0	0,0860	0,490				
22,0	0,0860	0,525				
27,0	0,0860	0,541				
30,0	0,0860	0,556				
33,0	0,0989	0,590				
46,0	0,0986	0,623				
51,0	0,106	0,656				
57,0	0,140	0,707				
73,0	0,185	0,774	0,0744	0,0276	0,667	
120,0	1,09	3,34	2,12	0,500	3,89	
130,0	1,21	5,38				
144,0	1,82	9,42	6,12	1,17	6,40	
154,0	2,74	13,7				
168,0	4,13	19,8	11,0	2,04	14,3	
178,0	5,21	22,6				
192,0	6,14	26,2	13,2	2,50	19,5	
202,0	7,10	28,7				
218,0	7,75	35,3	16,9	3,20	24,0	
241,0	10,2	38,8				
287,0	13,5	43,3	17,0	4,00	28,7	
312,0	15,4	43,3	16,6	4,30	31,2	
335,0	15,6	41,9	16,2	4,19	31,2	
359,0	15,6	40,6	13,8	4,00	30,9	
382,0	15,6	39,3	11,0	3,54	28,0	45,2
					I_F = 106,79 μE m⁻² s⁻¹	

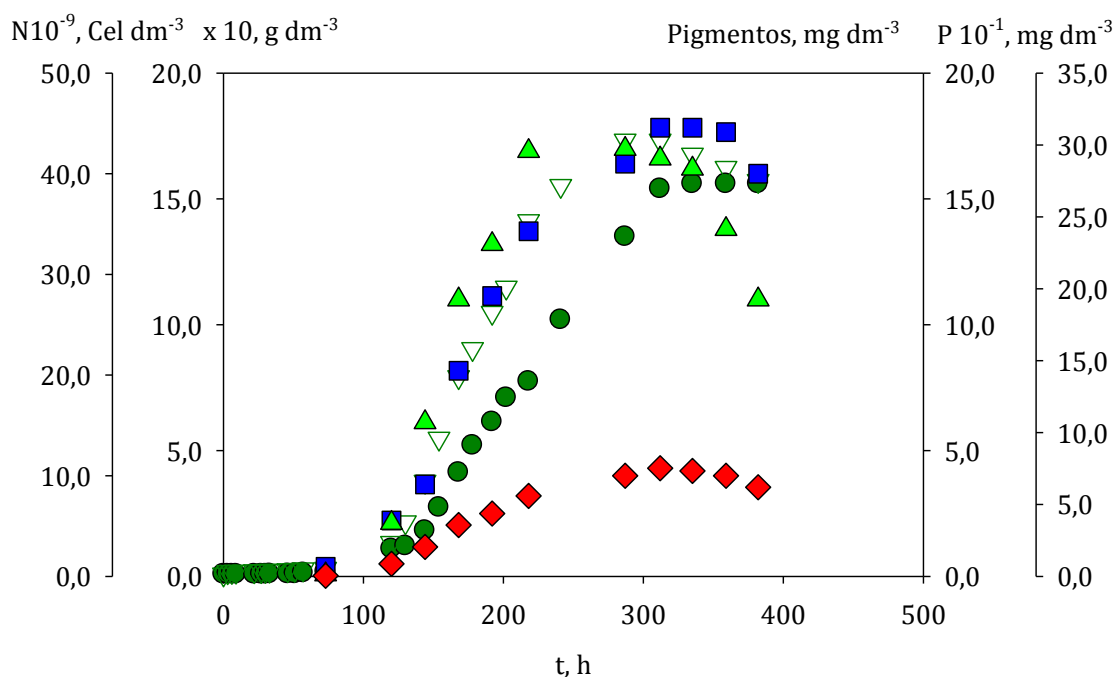


Figura C.1 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▼) en función del tiempo en el Exp. 1 RL.

Tabla C.2. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 1 RL

% N	% C	% H	% S	% O
3,86	52,7	8,72	0,322	34,4

Tabla C.3. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 1 RL

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,177	18:2n3	0,0356
14:1	0,150	18:2n6	10,8
16:0	18,0	20:0	0,054
16:1	1,01	18:3n3	17,8
16:2	2,62	18:4n3	0,0547
16:3	0,0974	20:2n6	0,143
18:0	5,52	20:5n3	0,0245
18:1	40,2	N.I.	3,31

Tabla C.4. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando el medio de Rodríguez-López

Expt: 2 RL

T = 15 °C

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		M = R-L		I ₀ = 139,63 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	
t h	x 10 ³ g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	0,0840	0,300					
3,0	0,0840	0,397					
6,0	0,0840	0,415					
9,0	0,0840	0,431					
22,0	0,0840	0,467					
27,0	0,0840	0,463					
30,0	0,0919	0,479					
33,0	0,102	0,495					
46,0	0,113	0,510					
51,0	0,116	0,525					
57,0	0,186	0,707					
73,0	0,237	0,756	0,191	0,0552	0,887		
120,0	1,26	4,42	2,31	0,547	4,50		
130,0	1,35	6,31					
144,0	2,24	11,8	5,48	1,10	7,68		
154,0	3,22	16,3					
168,0	4,51	27,1	11,1	2,04	14,9		
178,0	5,72	29,6					
192,0	6,65	34,0	15,4	2,80	20,8		
202,0	8,01	35,5					
218,0	8,69	40,3	17,2	3,74	22,8		
241,0	11,7	43,3					
287,0	14,6	45,2	17,4	4,34	30,5		
312,0	17,4	45,2	17,0	4,68	35,6		
335,0	17,6	44,0	16,6	4,41	34,7		
359,0	17,8	42,9	15,3	3,86	33,7		
382,0	17,7	41,3	13,2	3,61	29,1	45,0	
						I _F = 106,66 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	

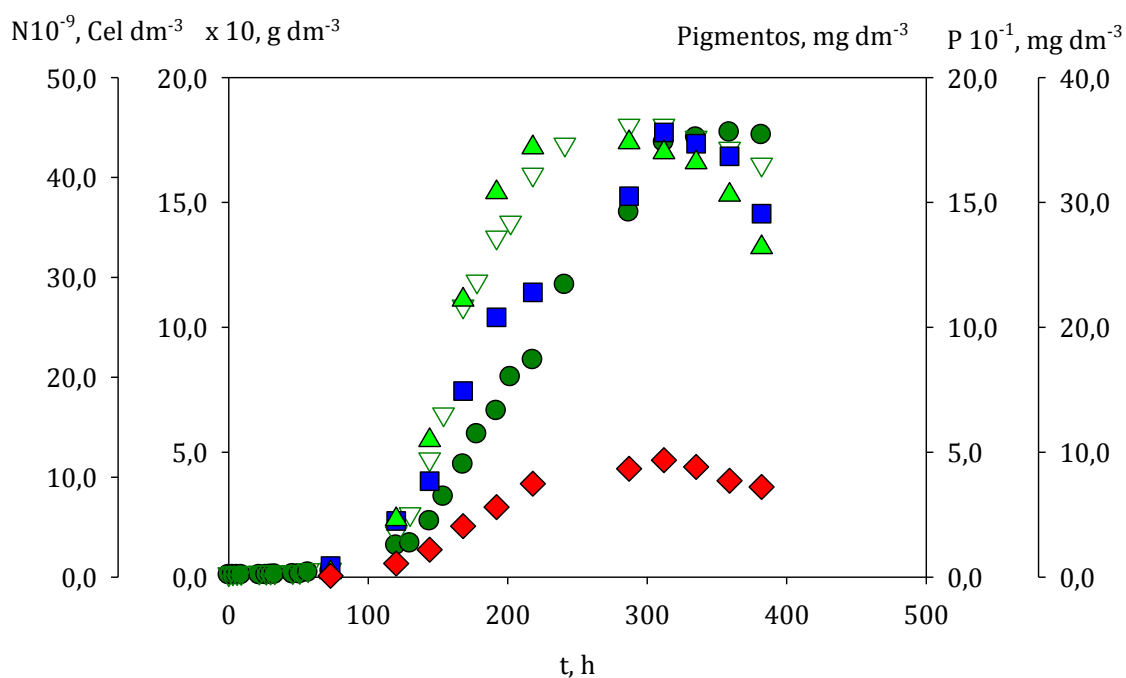


Figura C.2 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 2 RL.

Tabla C.5. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 2 RL

% N	% C	% H	% S	% O
3,86	52,9	8,55	0,289	34,4

Tabla C.6. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 2 RL

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,178	18:2n3	0,0378
14:1	0,155	18:2n6	10,7
16:0	17,9	20:0	0,053
16:1	1,00	18:3n3	16,9
16:2	2,60	18:4n3	0,0793
16:3	0,107	20:2n6	0,153
18:0	5,54	22:5n3	0,0358
18:1	39,9	N.I.	4,66

Tabla C.7. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando el medio de Rodríguez-López

Expt: 3 RL

T = 20 °C

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		M = R-L	I ₀ = 139,63 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ³ g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %
0,0	0,0710	0,340				
2,0	0,0710	0,358				
27,0	0,0710	0,432				
32,0	0,0710	0,526				
37,0	0,0710	0,542				
62,0	0,0807	0,577	0,0744	0,0158	0,383	
68,0	0,101	0,576				
74,0	0,105	0,590				
98,0	0,180	0,670	0,1826	0,0391	0,824	
109,0	0,314	0,674				
121,0	0,405	0,699	0,512	0,128	1,85	
133,0	0,916	2,81				
147,0	1,75	4,33				
194,0	4,21	16,1	8,18	1,68	17,4	
204,0	5,60	17,8				
218,0	6,64	21,4	8,50	1,86	23,6	
228,0	7,97	24,2				
242,0	8,96	27,5	9,00	2,10	23,0	
252,0	10,6	29,3				
266,0	11,0	31,4	10,8	2,37	24,6	
290,0	13,7	32,6	9,65	2,93	29,5	
315,0	14,8	36,5				
362,0	17,8	40,8	9,16	3,28	35,0	
386,0	18,9	39,9	8,89	4,36	36,8	
412,0	19,1	38,7				
440,0	19,0	38,2	8,27	3,16	36,6	44,3
						I _F = 106,77 μE m ⁻² s ⁻¹

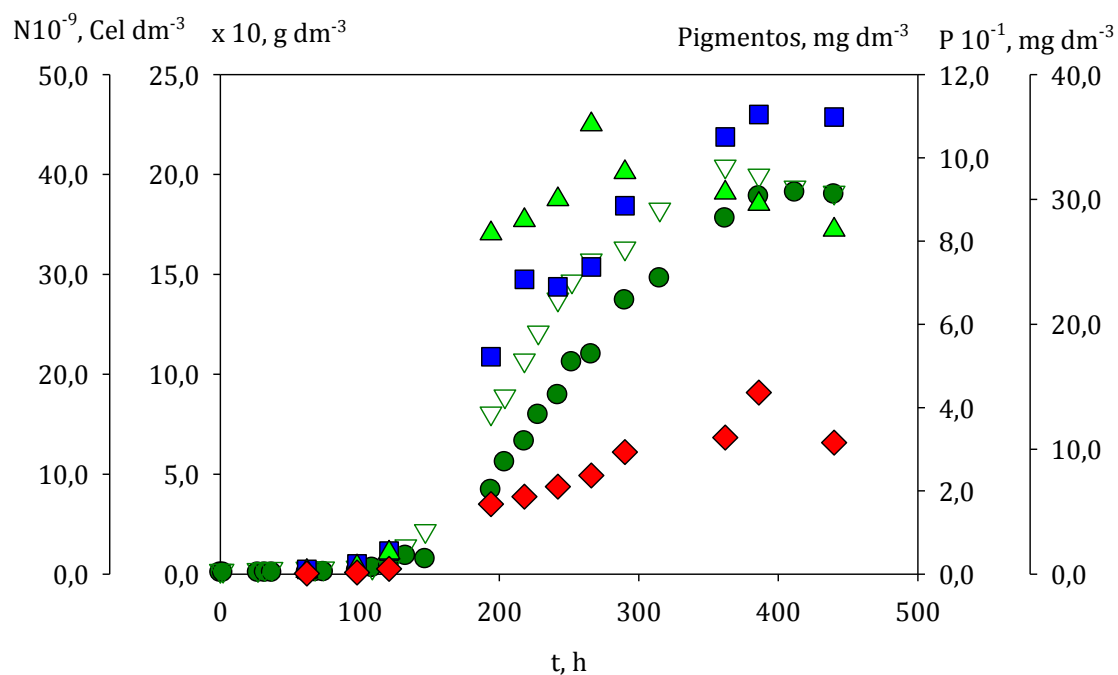


Figura C.3 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▼) en función del tiempo en el Exp. 3 RL.

Tabla C.8. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 3 RL

% N	% C	% H	% S	% O
3,86	52,5	8,55	0,412	34,7

Tabla C.9. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 3 RL

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,217	18:2n6	11,9
14:1	0,124	20:0	0,0484
16:0	17,6	18:3n3	15,7
16:1	0,858	20:1n9	0,0213
16:2	3,52	18:4n3	0,0750
16:3	0,100	20:2n6	0,177
18:0	3,54	22:0	0,0600
18:1	39,8	22:5n3	0,0902
18:2n3	0,0300	N.I.	4,14

Tabla C.10. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando el medio de Rodríguez-López

Expt: 4 RL

T = 20 °C

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		M = R-L		I ₀ = 141,73 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	
t	x 10	N 10 ⁻⁹	CHL 10 ³	Ca 10 ³	P 10 ²	L	
h	g dm ⁻³	Cel dm ⁻³	g dm ⁻³	g dm ⁻³	g dm ⁻³	%	
0,0	0,0606	0,300					
2,0	0,0747	0,338					
27,0	0,0744	0,511					
32,0	0,0848	0,527					
37,0	0,0882	0,581					
62,0	0,102	0,613	0,0864	0,0158	0,498		
68,0	0,109	0,615					
74,0	0,112	0,647					
98,0	0,156	0,658	0,171	0,0353	0,719		
109,0	0,325	0,673					
121,0	0,404	1,86	0,656	0,148	1,62		
133,0	1,04	2,43					
147,0	1,07	4,64					
194,0	5,05	16,3	10,7	2,05	18,7		
204,0	6,48	20,1					
218,0	7,84	23,7	11,6	2,05	20,0		
228,0	8,85	25,3					
242,0	10,1	27,2	12,5	2,10	24,9		
252,0	11,1	28,1					
266,0	11,9	31,6	14,8	2,62	26,8		
290,0	12,8	34,2	17,4	4,45	28,4		
315,0	14,1	37,3					
362,0	18,6	41,0	18,1	4,49	29,9		
386,0	19,6	40,3	19,6	4,66	32,6		
412,0	19,0	39,2					
440,0	19,0	38,7	19,0	4,06	35,6	46,9	
							I _F = 106,81 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

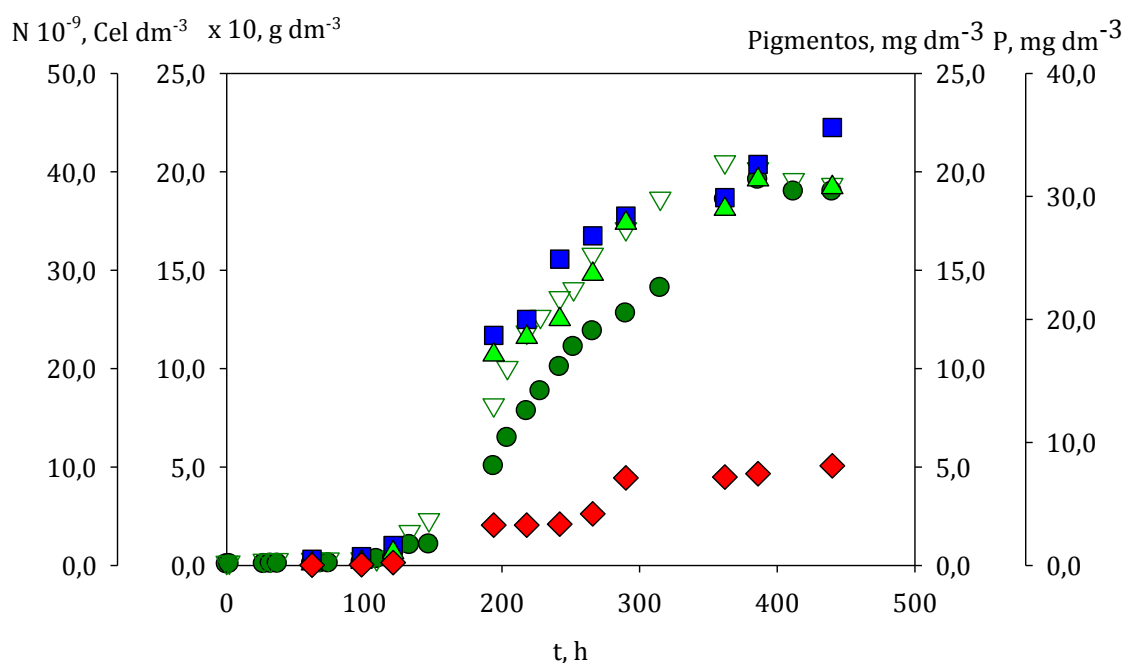


Figura C.4 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 4 RL.

Tabla C.11. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 4 RL

% N	% C	% H	% S	% O
3,88	52,3	8,56	0,435	34,8

Tabla C.12. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 4 RL

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,215	18:2n6	12,9
14:1	0,125	20:0	0,0637
16:0	17,4	18:3n3	16,7
16:1	0,858	20:2n6	0,146
16:2	3,45	22:0	0,0513
16:3	0,101	20:5n3	0,0427
18:0	3,42	22:5n3	0,0675
18:1	40,1	N.I.	4,33
18:2n3	0,0294		

Tabla C.13. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando el medio de Rodríguez-López

Expt: 5 RL

T = 25 °C

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		M = R-L	I ₀ = 140,57 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	
t h	x 10 g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %
0,0	0,175	0,540				
2,0	0,175	0,596				
5,0	0,175	0,632				
7,0	0,175	0,668				
21,0	0,175	1,07				
26,0	0,299	1,16	0,874	0,137	1,36	
31,0	0,353	1,21				
44,0	0,873	3,37	1,49	0,302	3,82	
55,0	1,09	6,54				
68,0	2,02	11,2	3,32	0,820	8,35	
79,0	2,93	17,5				
94,0	4,17	22,9	4,46	1,07	14,1	
140,0	4,80	35,5	7,76	1,89	14,4	
151,0	5,86	39,4				
177,0	7,18	50,0	7,48	1,96	15,7	
190,0	8,98	56,5	7,78	2,26	16,2	
214,0	9,32	61,9	7,73	2,30	17,8	
238,0	10,3	66,2	8,95	2,68	18,1	
261,0	11,4	71,4	12,7	3,32	18,5	
286,0	14,6	74,8	17,7	4,29	23,7	
310,0	14,8	77,9	18,3	4,21	23,4	
334,0	15,4	77,3	18,5	4,42	23,8	
358,0	15,5	74,5	15,8	3,80	23,2	
382,0	15,7	73,2	11,8	2,90	23,0	
430,0	17,0	69,6	9,11	2,51	22,6	
454,0	17,3	67,5	7,03	1,89	22,4	
459,0	17,6	66,1				
478,0	17,4	67,6	6,48	1,74	22,0	48,0
I _F = 128,49 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$						

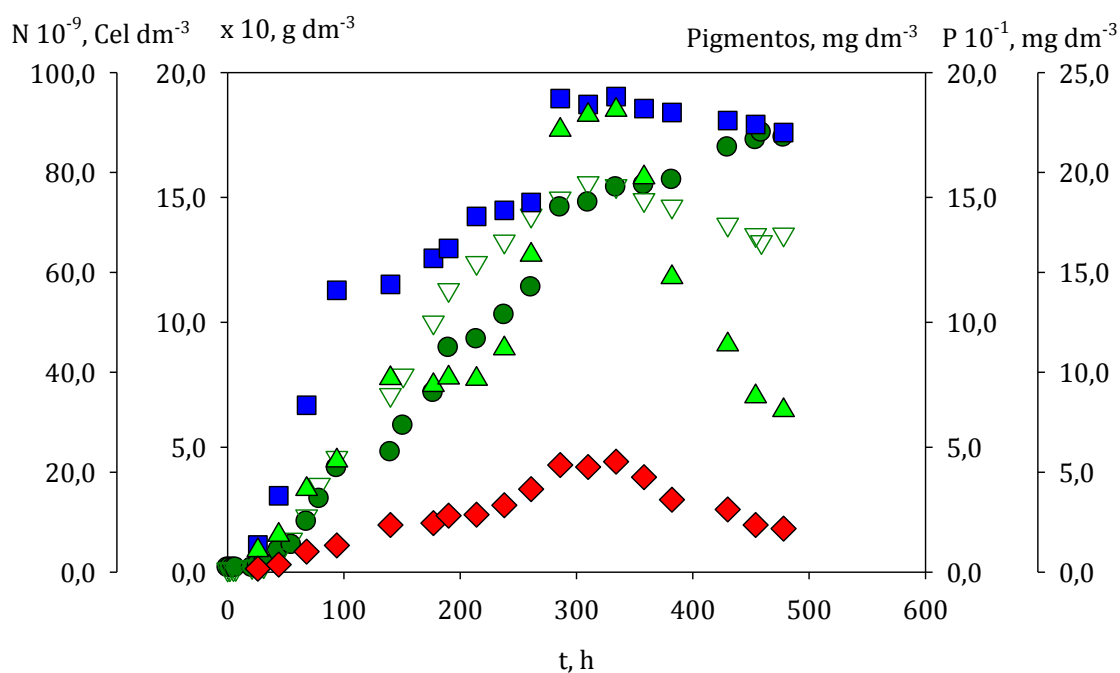


Figura C.5 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 5 RL.

Tabla C.14. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 5 RL

% N	% C	% H	% S	% O
7,14	49,3	6,87	0,520	36,2

Tabla C.15. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 5 RL

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,545	20:0	0,0821
14:1	0,695	18:4n3	0,115
16:0	17,2	18:3n3	15,5
16:1	0,833	20:2n6	0,124
16:2	7,52	22:0	0,0732
16:3	0,538	20:5n3	0,0911
18:0	3,26	22:5n3	0,0859
18:1	36,8	22:6n3	0,0312
18:2n3	0,0732	N.I.	3,83
18:2n6	12,6		

Tabla C.16. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando el medio de Rodríguez-López

Expt: 6 RL

T = 25 °C

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		M = R-L	I ₀ = 141,73 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %
0,0	0,425	2,12				
2,0	0,425	2,09				
4,0	0,425	2,15				
16,0	0,459	2,26				
22,5	0,573	2,36				
27,5	0,645	2,77				
40,5	0,882	2,81	2,72	0,501	4,00	
51,0	0,983	2,98				
65,0	1,68	6,88	4,20	0,614	7,54	
75,0	2,78	9,39				
89,0	3,90	12,4			18,0	
137,0	5,95	24,2	6,12	0,998	22,9	
147,0	6,57	27,0				
161,0	6,73	34,6	7,33	2,04	24,4	
185,0	7,15	39,4	8,54	2,15	27,1	
209,0	8,22	43,1	8,74	2,26	30,4	
233,0	9,31	46,0	8,91	2,22	31,2	
258,0	10,6	50,5			33,4	
305,0	12,4	59,7	6,28	2,04	34,2	
329,0	13,9	61,7	5,76	1,74	35,5	
353,0	14,4	64,3	4,76	1,52	36,3	
377,0	15,3	65,8	3,41	1,05	37,6	
400,0	15,9	66,7	2,96	0,914	37,0	
426,0	16,2	67,1			34,6	
473,0	18,2	71,1	2,96	0,794	33,5	
497,0	18,0	62,7	2,70	0,664	32,5	49,5
I _F = 125,09 μE m ⁻² s ⁻¹						

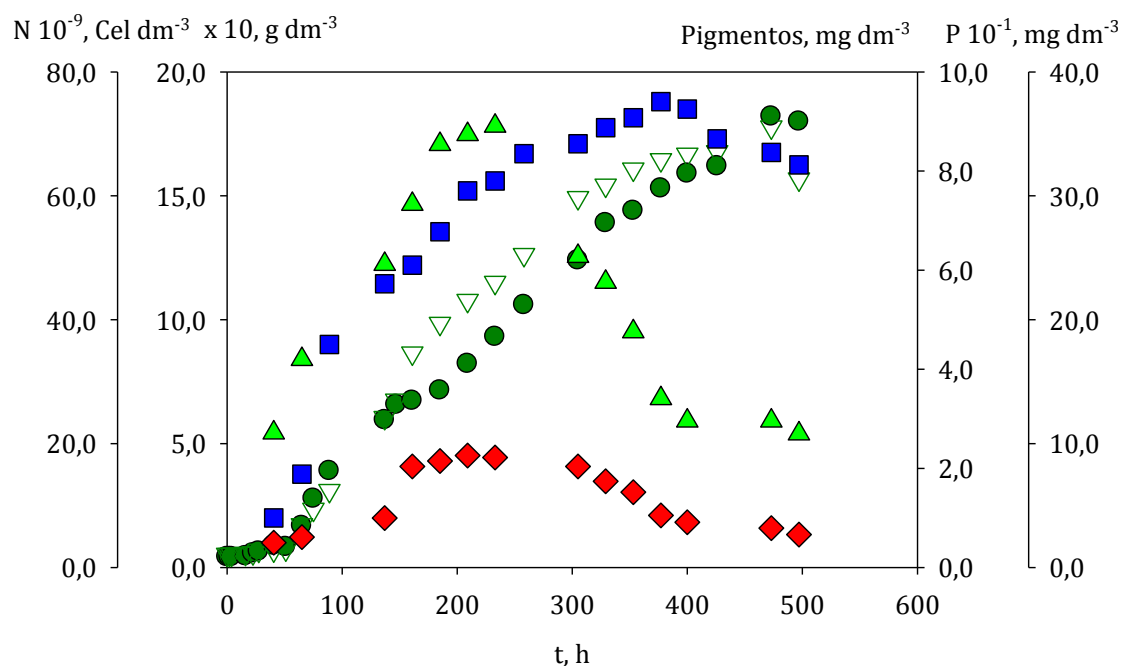


Figura C.6 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 6 RL.

Tabla C.17. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 6 RL.

% N	% C	% H	% S	% O
7,17	49,1	6,90	0,459	36,4

Tabla C.18. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 6 RL

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,565	18:2n6	12,6
14:1	0,709	20:0	0,0701
16:0	17,7	18:4n3	0,107
16:1	0,852	18:3n3	16,4
16:2	7,75	20:2n6	0,128
16:3	0,568	22:0	0,0671
18:0	3,60	22:5n3	0,0842
18:1	35,6	22:6n3	0,0301
18:2n3	0,0671	N.I.	3,42

Tabla C.19. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando el medio de Rodríguez-López

Expt: 7 RL

T = 30 °C

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		M = R-L	I ₀ = 124,24 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	
t h	x 10 g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %
0,0	0,128	0,580				
2,0	0,138	0,636				
5,0	0,145	0,731				
7,0	0,158	0,844				
21,0	0,194	1,07				
26,0	0,272	1,16	0,781	0,132	1,14	
31,0	0,359	1,19				
44,0	0,709	2,90	1,43	0,274	2,87	
55,0	1,06	9,43				
68,0	1,73	11,7	1,68	0,450	6,58	
79,0	2,63	14,1				
94,0	3,52	25,2	2,62	0,676	13,1	
140,0	4,12	39,7	4,60	1,03	15,2	
151,0	4,84	45,9				
177,0	6,41	56,1	5,28	1,22	20,2	
190,0	6,78	59,0	6,80	1,34	21,3	
214,0	7,69	61,3	6,63	1,45	24,0	
238,0	8,38	60,8	9,54	2,60	26,6	
261,0	9,60	60,1	7,41	1,85	29,7	
286,0	12,2	59,0	6,17	1,62	29,3	
310,0	12,1	56,6	5,68	1,48	26,7	
334,0	11,9	53,6	5,19	1,35	26,5	44,2
						I _F = 110,68 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

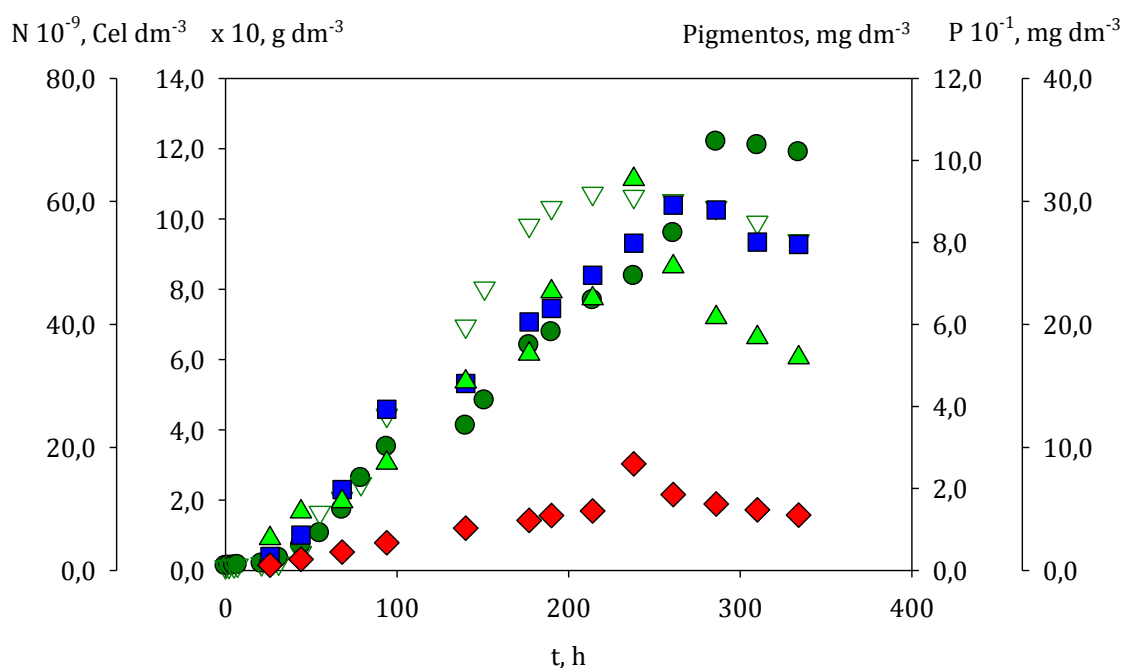


Figura C.7 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 7 RL.

Tabla C.20. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 7 RL

% N	% C	% H	% S	% O
6,70	48,6	6,72	0,497	37,5

Tabla C.21. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 7 RL

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,543	18:2n6	15,5
14:1	0,604	18:3n3	17,1
16:0	19,2	20:0	0,0887
16:1	0,729	18:4n3	0,0885
16:2	6,15	22:00	0,440
16:3	0,504	20:5n3	0,0832
18:0	1,42	22:5n3	0,0618
18:1	33,4	N.I.	3,49
18:2n3	0,596		

Tabla C.22. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando el medio de Rodríguez-López

Expt: 8 RL

T = 30 °C

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		M = R-L	I ₀ = 139,63 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	
t h	X 10 ¹⁰ g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %
0,0	0,124	0,660				
2,0	0,135	0,718				
5,0	0,138	0,756				
7,0	0,148	0,853				
21,0	0,206	1,04				
26,0	0,288	1,16	0,881	0,153	1,37	
31,0	0,346	1,20				
44,0	0,852	3,20	1,51	0,298	3,58	
55,0	1,19	10,5				
68,0	2,12	13,8	3,81	0,813	8,88	
79,0	3,12	20,7				
94,0	4,00	27,3	5,53	1,29	14,5	
140,0	5,68	43,8	5,90	1,28	20,3	
151,0	6,85	46,1				
177,0	8,38	51,4	6,17	1,51	25,9	
190,0	9,44	54,7	8,02	2,26	28,2	
214,0	11,1	58,7	8,92	2,60	29,1	
238,0	12,3	62,9	8,16	2,33	32,2	
261,0	14,8	60,7	7,45	2,17	32,8	
286,0	16,0	62,9	7,02	2,04	35,3	
310,0	16,8	61,1	6,61	1,95	33,5	
334,0	16,2	60,1	6,33	1,79	26,9	44,8
I _F = 109,71 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$						

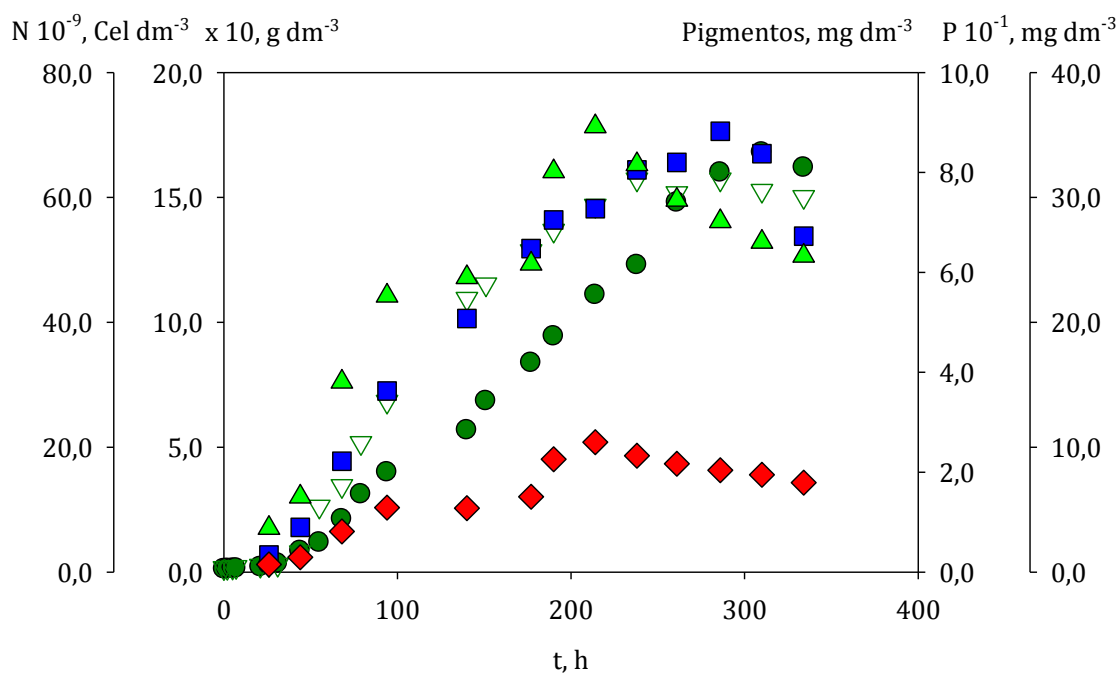


Figura C.8 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 8 RL.

Tabla C.23. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 8 RL

% N	% C	% H	% S	% O
6,63	48,3	6,79	0,486	37,8

Tabla C.24. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 8 RL

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,562	18:2n3	0,724
14:1	0,594	18:2n6	15,9
16:0	18,3	20:0	0,0787
16:1	0,690	18:3n3	19,1
16:2	6,16	22:0	0,420
16:3	0,493	20:5n3	0,0952
18:0	1,41	22:5n3	0,0596
18:1	33,2	N.I.	2,21

➤ Influecía de la velocidad específica de suministro del aire

Tabla C.25. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando el medio de Rodríguez-López

Expt: 9 RL

Q = 0,0 v/v/min

T = 25 °C		pH = 8,0		M = R-L		I₀ = 141,73 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	
t h	x 10² g dm⁻³	N 10⁻⁹ Cel dm⁻³	CHL 10³ g dm⁻³	Ca 10³ g dm⁻³	P 10² g dm⁻³	L %	
0,0	0,0413	0,0600					
2,0	0,0413	0,0792					
4,0	0,112	0,0784					
14,5	0,147	0,0776					
19,5	0,147	0,115					
26,0	0,182	0,133					
40,5	0,252	0,545					
49,0	0,849	0,558					
65,5	1,83	1,09	0,333	0,0772	0,858		
73,0	2,49	1,35					
89,5	3,51	1,76	0,565	0,152	1,22		
113,5	4,26	3,22			1,65		
161,0	4,77	3,51	0,796	0,218	1,07		
184,5	5,00	3,84	0,833	0,143	0,530		
207,0	5,16	3,94	0,884	0,106	0,582		
231,0	5,14	4,08	0,654	0,104	0,635	27,4	
							I_F = 132,52 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

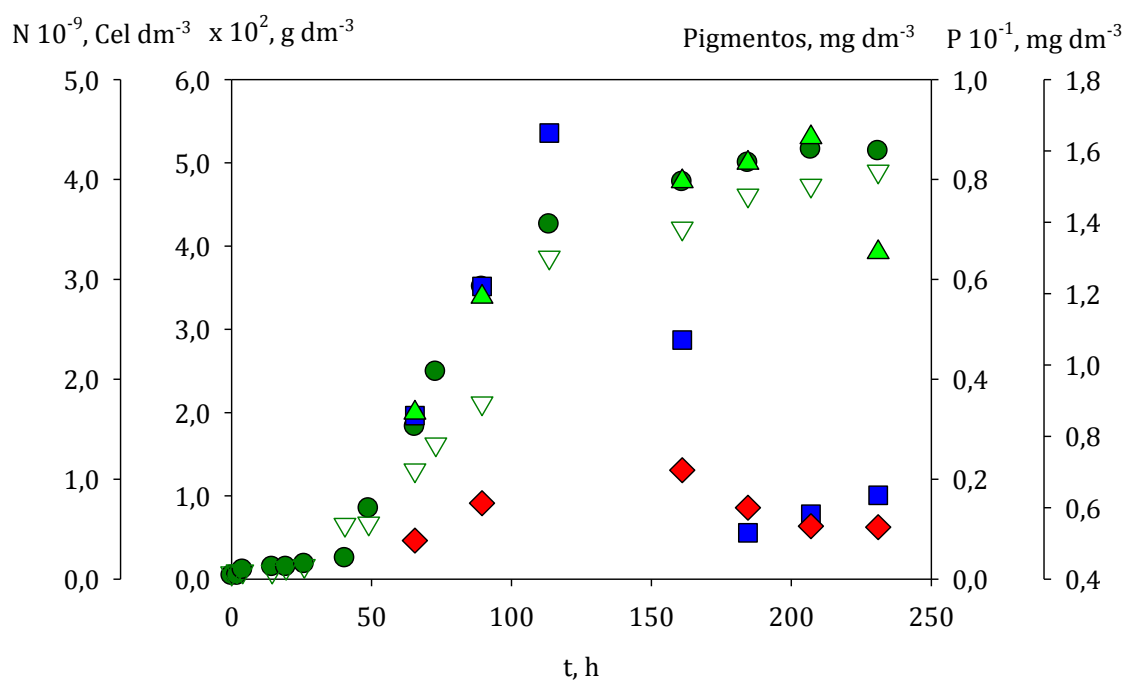


Figura C.9 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 9 RL.

Tabla C.26. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 9 RL

% N	% C	% H	% S	% O
6,64	47,9	5,99	0,713	38,7

Tabla C.27. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 9 RL

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,173	18:3n3	35,5
14:1	0,0606	20:1n9	0,564
16:0	19,5	18:4n3	0,410
16:1	0,334	20:2n6	0,283
16:2	2,91	22:0	0,124
16:3	3,07	22:1n9	0,0110
18:0	16,0	20:5n3	0,0171
18:1	20,9	22:5n3	0,374
18:2n3	0,476	22:6n3	0,0347
18:2n6	1,08	N.I.	5,94
20:0	0,265		

Tabla C.28. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando el medio de Rodríguez-López

Expt: 10 RL

Q = 0,0 v/v/min

T = 25 °C		pH = 8,0		M = R-L		I₀ = 140,57 μE m⁻² s⁻¹	
t h	x 10² g dm⁻³	N 10⁻⁹ Cel dm⁻³	CHL 10³ g dm⁻³	Ca 10³ g dm⁻³	P 10² g dm⁻³	L %	
0,0	0,0413	0,0600					
2,0	0,0766	0,0792					
4,0	0,112	0,0784					
14,5	0,182	0,0776					
19,5	0,253	0,0960					
26,0	0,182	0,171					
40,5	0,709	0,489					
49,0	1,13	0,465					
65,5	1,58	0,625	0,333	0,0772	0,732		
73,0	3,16	0,909					
89,5	3,79	1,58	1,04	0,266	1,28		
113,5	4,79	3,00			1,49		
161,0	5,46	3,51	1,31	0,255	1,02		
184,5	5,90	4,03	0,733	0,143	0,954		
207,0	5,95	4,08	0,609	0,106	0,954		
231,0	5,90	4,17	0,487	0,104	0,656	28,7	
							I_F = 125,91 μE m⁻² s⁻¹

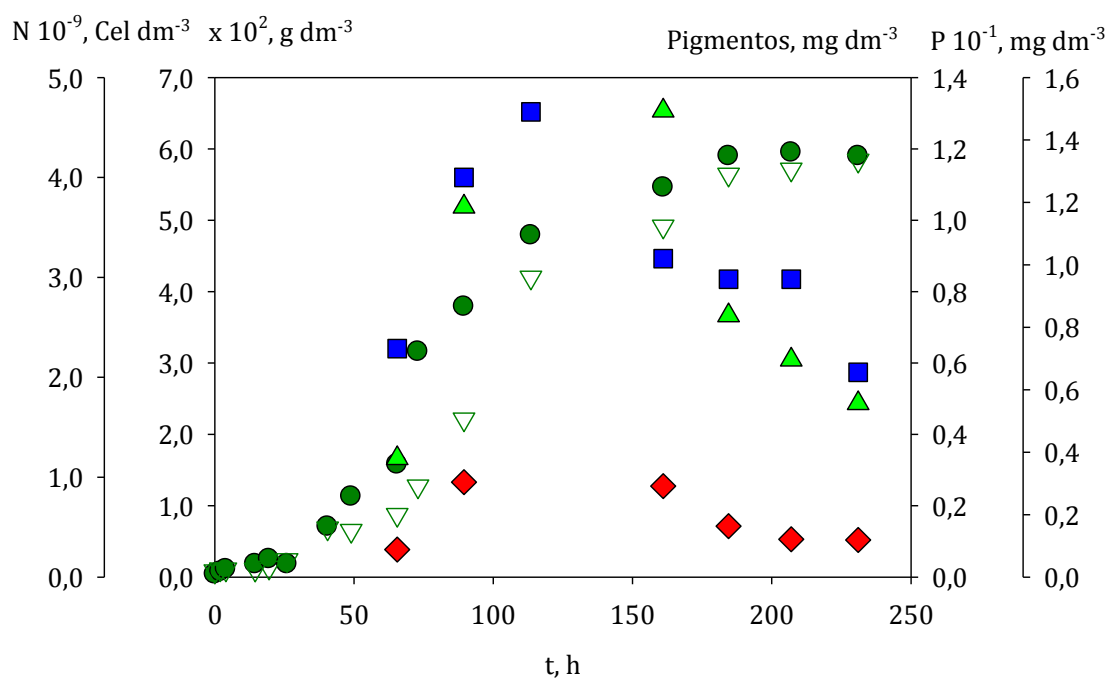


Figura C.10 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 10 RL.

Tabla C.29. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 10 RL

% N	% C	% H	% S	% O
6,69	48,2	6,04	0,702	38,4

Tabla C.30. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 10 RL

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,185	18:3n3	32,6
14:1	0,0656	20:1n9	0,593
16:0	19,56	18:4n3	0,458
16:1	0,326	20:2n6	0,296
16:2	3,04	22:0	0,134
16:3	3,33	22:1n9	0,271
18:0	15,8	20:5n3	0,0302
18:1	20,2	22:5n3	0,434
18:2n3	0,520	22:6n3	0,0243
18:2n6	1,31	N.I.	8,75
20:0	0,276		

Tabla C.31. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando el medio de Rodríguez-López

Expt: 11 RL

Q = 0,5 v/v/min

T = 25 °C		pH = 8,0		M = R-L		I₀ = 124,24 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	
t h	x 10 g dm⁻³	N 10⁻⁹ Cel dm⁻³	CHL 10³ g dm⁻³	Ca 10³ g dm⁻³	P 10² g dm⁻³	L %	
0,0	0,806	2,86					
2,0	0,806	2,95					
4,0	0,853	3,01					
6,0	0,916	3,06					
8,0	0,877	3,16					
19,0	0,971	3,29	1,34	0,333	4,13		
24,0	1,42	3,24					
31,0	1,48	3,48					
44,0	1,82	12,1	2,65	0,663	6,89		
54,0	2,66	19,9					
68,0	3,51	21,0	3,50	0,920	12,7		
78,0	3,83	21,5					
95,0	4,35	22,6	2,60	0,849	15,0		
117,0	4,70	23,0	2,03	0,630	14,6		
164,0	5,61	23,0	1,97	0,617	13,4		
188,0	5,69	22,5	1,74	0,592	11,4		
212,0	5,93	21,6	1,17	0,585	10,2		
236,0	6,46	20,7	1,13	0,574	9,94		
260,0	6,55	19,8	0,921	0,578	9,12	47,3	
							I_F = 122,96 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

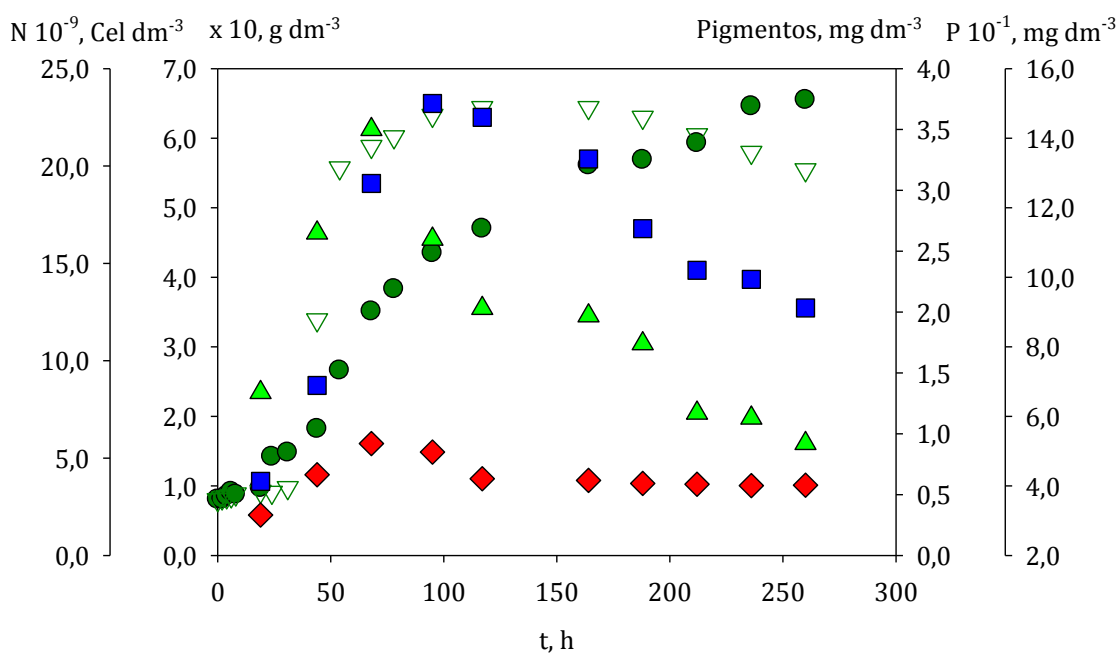


Figura C.11 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 11 RL.

Tabla C.32. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 11 RL

% N	% C	% H	% S	% O
6,93	48,9	6,65	0,0833	37,5

Tabla C.33. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 11 RL

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,580	18:2n6	25,8
14:1	0,648	20:0	0,103
16:0	17,4	18:3n3	18,1
16:1	1,03	18:4n3	0,0522
16:2	7,02	20:2n6	0,217
16:3	0,548	22:0	0,0974
18:0	4,17	20:5n3	0,336
18:1	21,0	22:5n3	0,0781
18:2n3	0,0591	N.I.	2,78

Tabla C.34. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando el medio de Rodríguez-López

Expt: 12 RL

$Q = 0,5 \text{ v/v/min}$

$T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$		$\text{pH} = 8,0$		$M = R-L$		$I_0 = 124,24 \text{ } \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$
t h	x 10 g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %
0,0	0,756	2,44				
2,0	0,815	2,61				
4,0	0,869	3,55				
6,0	0,878	3,57				
8,0	0,846	3,73				
19,0	0,955	3,80	1,01	0,321	3,80	
24,0	1,10	3,84				
31,0	1,44	3,86				
44,0	1,90	9,82	2,34	0,604	6,50	
54,0	2,30	17,8				
68,0	3,14	20,4			10,3	
78,0	3,55	19,8				
95,0	4,03	19,9	3,62	0,962	12,1	
117,0	4,43	19,9	1,93	0,872	11,4	
164,0	5,16	20,4	1,75	0,712	10,1	
188,0	5,64	20,1	1,61	0,693	9,33	
212,0	5,91	19,3	1,56	0,620	9,54	
236,0	6,34	18,6	1,52	0,636	9,96	
260,0	6,44	17,8	1,18	0,578	10,4	49,7
						$I_F = 121,65 \text{ } \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$

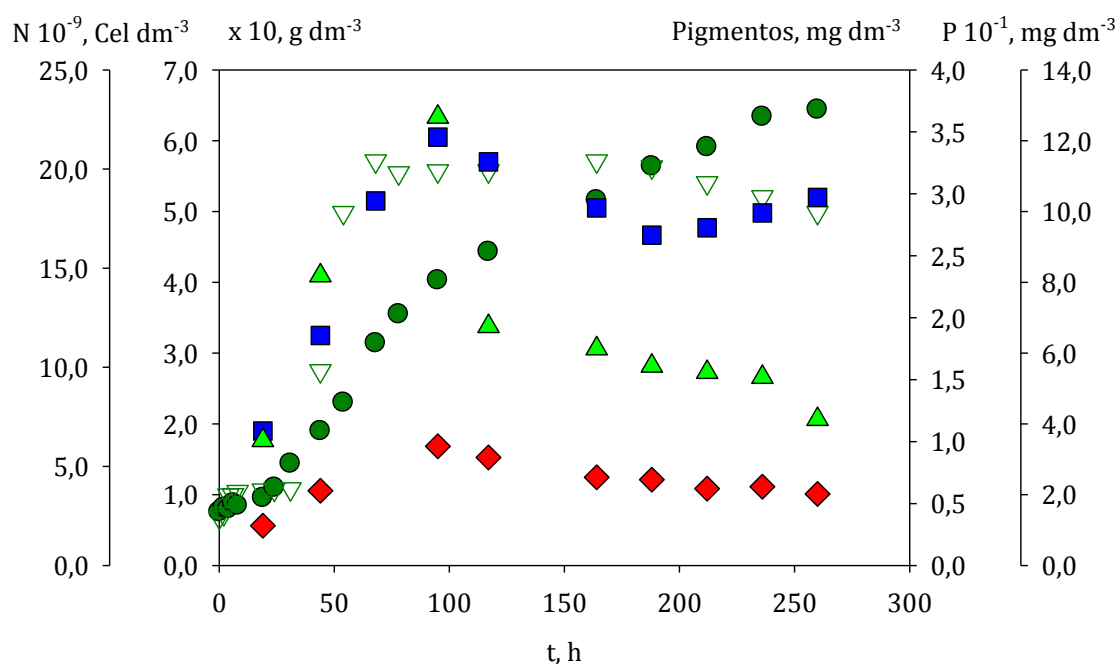


Figura C.12 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 12 RL.

Tabla C.35. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 12 RL

% N	% C	% H	% S	% O
6,66	48,1	6,31	0,0921	37,9

Tabla C.36. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 12 RL

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,583	18:2n3	0,0655
14:1	0,664	18:2n6	25,9
16:0	17,4	20:0	0,0759
16:1	1,04	18:3n3	18,1
16:2	6,97	22:0	0,162
16:3	0,545	20:5n3	0,110
18:0	4,14	N.I.	2,91
18:1	21,1		

Tabla C.37. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando el medio de Rodríguez-López

Expt: 13 RL

$Q = 1 \text{ v/v/min}$

$T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$		$\text{pH} = 8,0$		$M = R-L$		$I_0 = 124,24 \text{ } \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	
t h	$\times 10$ g dm^{-3}	$N 10^{-9}$ Cel dm^{-3}	$\text{CHL } 10^3$ g dm^{-3}	$\text{Ca } 10^3$ g dm^{-3}	$P 10^2$ g dm^{-3}	L %	
0,0	0,175	0,540					
2,0	0,175	0,596					
5,0	0,175	0,632					
7,0	0,175	0,668					
21,0	0,175	1,07					
26,0	0,299	1,16	0,874	0,137	1,36		
31,0	0,353	1,21					
44,0	0,873	3,37	1,49	0,302	3,82		
55,0	1,09	6,54					
68,0	2,02	11,2	3,32	0,820	8,35		
79,0	2,93	17,5					
94,0	4,17	22,9	4,46	1,07	14,1		
140,0	4,80	35,5	7,76	1,89	14,4		
151,0	5,86	39,4					
177,0	7,18	50,0	7,48	1,96	15,7		
190,0	8,98	56,5	7,78	2,26	16,2		
214,0	9,32	61,9	7,73	2,30	17,8		
238,0	10,3	66,2	8,95	2,68	18,1		
261,0	11,4	71,4	12,7	3,32	18,5		
286,0	14,6	74,8	17,7	4,29	23,7		
310,0	14,8	77,9	18,3	4,21	23,4		
334,0	15,4	77,3	18,5	4,42	23,8		
358,0	15,5	74,5	15,8	3,80	23,2		
382,0	15,7	73,2	11,8	2,90	23,0		
430,0	17,0	69,6	9,11	2,51	22,6		
454,0	17,3	67,5	7,03	1,89	22,4		
459,0	17,6	66,1					
478,0	17,4	67,6	6,48	1,74	22,0	48,0	
							$I_f = 128,49 \text{ } \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$

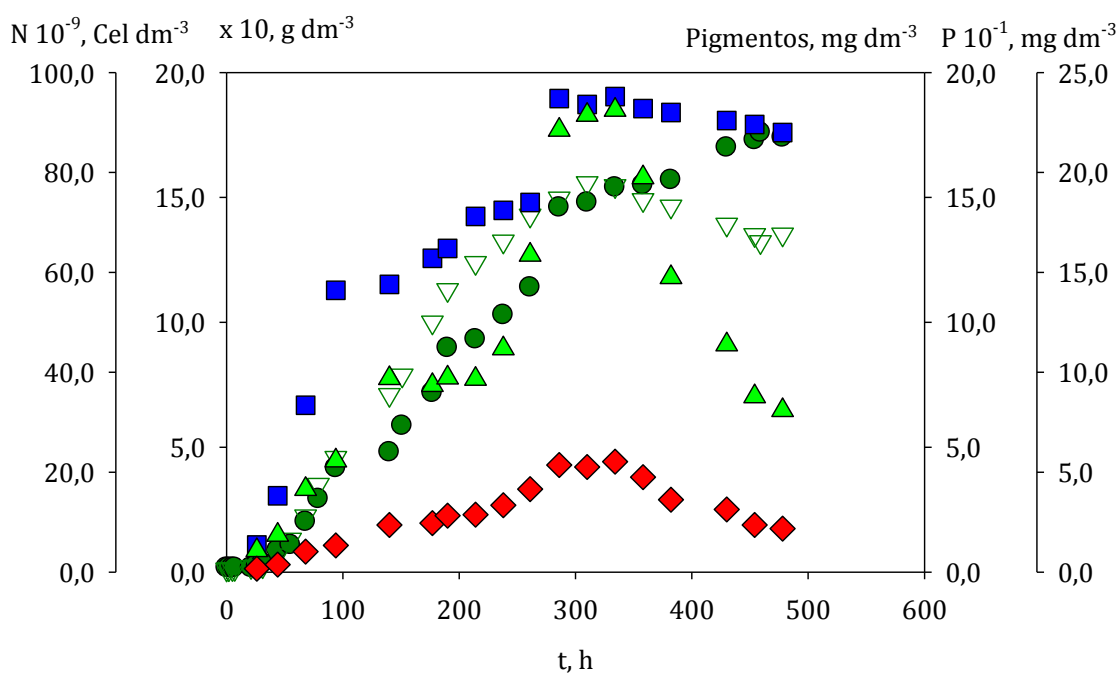


Figura C.13 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 13 RL.

Tabla C.38. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 13 RL

% N	% C	% H	% S	% O
7,14	49,3	6,87	0,520	36,2

Tabla C.39. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 13 RL

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,545	18:2n3	0,0732
14:1	0,695	18:2n6	20,6
16:0	17,2	20:0	0,0821
16:1	0,833	18:3n3	10,5
16:2	7,52	20:2n6	0,124
16:3	0,538	22:0	0,0732
18:0	3,26	N.I.	2,16
18:1	35,8		

Tabla C.40. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando el medio de Rodríguez-López

Expt: 14 RL

$Q = 1 \text{ v/v/min}$

$T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$		$\text{pH} = 8,0$		$M = R-L$		$I_0 = 124,24 \text{ } \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	
t h	$x \cdot 10$ g dm^{-3}	$N \cdot 10^{-9}$ Cel dm^{-3}	$\text{CHL } 10^3$ g dm^{-3}	$\text{Ca } 10^3$ g dm^{-3}	$P \cdot 10^2$ g dm^{-3}	L %	
0,0	0,425	2,12					
2,0	0,425	2,09					
4,0	0,425	2,15					
16,0	0,459	2,26					
22,5	0,573	2,36					
27,5	0,645	2,77					
40,5	0,882	2,81	2,72	0,501	4,00		
51,0	0,830	2,98					
65,0	1,68	6,88	4,20	0,614	7,54		
75,0	2,78	9,39					
89,0	3,90	12,4			18,0		
137,0	5,95	24,2	6,12	0,998	22,9		
147,0	6,57	27,0					
161,0	6,37	34,6	7,33	2,04	24,4		
185,0	7,15	39,4	8,54	2,15	27,1		
209,0	8,22	43,1	8,74	2,26	30,4		
233,0	9,31	46,0	8,91	2,22	31,2		
258,0	10,6	50,5			33,4		
305,0	12,4	59,7	6,28	2,04	34,2		
329,0	13,9	61,7	5,76	1,74	35,5		
353,0	14,4	64,3	4,76	1,52	36,3		
377,0	15,3	65,8	3,41	1,05	37,6		
400,0	15,9	66,7	2,96	0,914	37,0		
426,0	16,2	67,1			34,6		
473,0	18,2	71,1	2,96	0,794	33,5		
497,0	18,0	62,7	2,70	0,664	32,5	49,5	
							$I_F = 125,09 \text{ } \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$

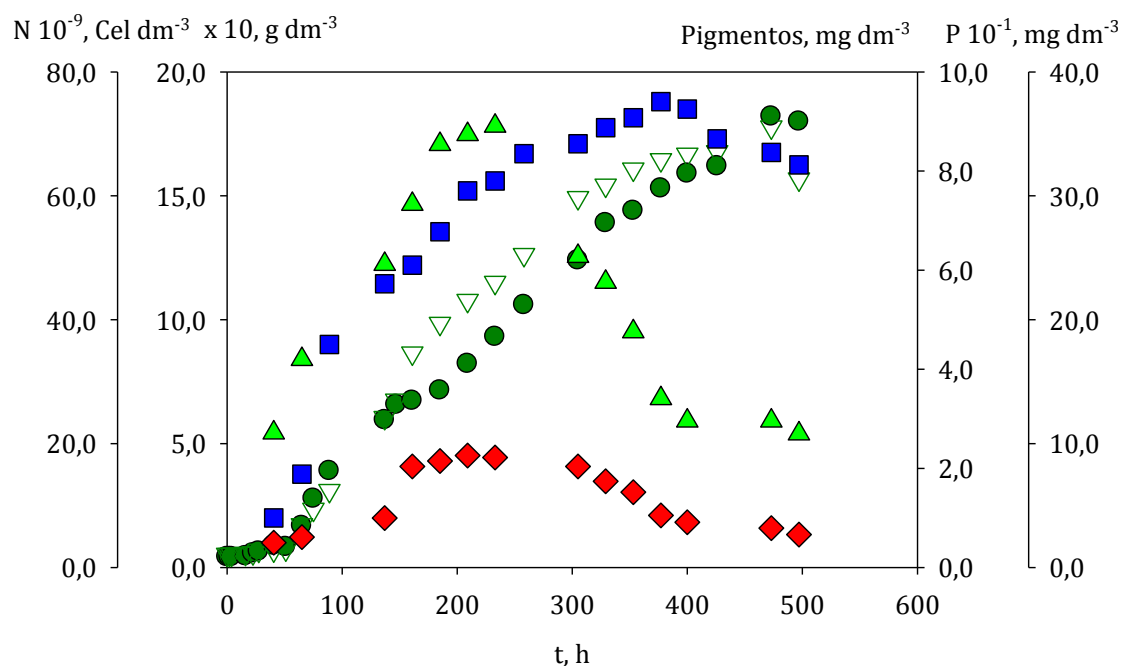


Figura C.14 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 14 RL.

Tabla C.41. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 14 RL

% N	% C	% H	% S	% O
7,17	49,1	6,90	0,459	36,4

Tabla C.42. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 14 RL

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,565	18:2n3	0,0671
14:1	0,709	18:2n6	20,0
16:0	17,7	20:0	0,0701
16:1	0,852	18:3n3	10,4
16:2	7,75	20:2n6	0,128
16:3	0,568	22:0	0,0671
18:0	3,60	N.I.	2.92
18:1	34,6		

Tabla C.43. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando el medio de Rodríguez-López

Expt: 15 RL

Q = 1,5 v/v/min

T = 25 °C		pH = 8,0		M = R-L		I₀ = 140,57 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	
t h	x 10 g dm⁻³	N 10⁻⁹ Cel dm⁻³	CHL 10³ g dm⁻³	Ca 10³ g dm⁻³	P 10² g dm⁻³	L %	
0,0	0,00766	0,0600					
2,0	0,0112	0,0792					
4,0	0,0120	0,0794					
14,5	0,0146	0,0816					
19,5	0,0215	0,115					
26,0	0,0249	0,152					
40,5	0,0418	0,282					
49,0	0,103	0,353					
65,5	0,220	0,972	0,364	0,0965	0,967		
73,0	0,409	1,68					
89,5	0,699	3,22	2,15	0,476	2,86		
113,5	1,43	5,47			5,82		
161,0	3,88	26,2	2,22	0,765	14,8		
184,5	5,02	34,6	3,15	0,932	19,0		
207,0	6,11	38,4	3,98	1,20	21,7		
231,0	7,32	42,4	4,61	1,49	24,7		
256,0	8,58	45,5	5,57	1,60	25,3		
281,0	9,61	49,0			26,6		
327,0	11,5	52,9	8,84	2,19	28,7		
352,5	13,0	57,1	8,57	1,89	28,3		
375,0	14,0	57,6	6,66	1,60	29,6		
399,0	13,7	56,4	6,41	1,56	25,4	45,2	
							I_F = 109,19 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

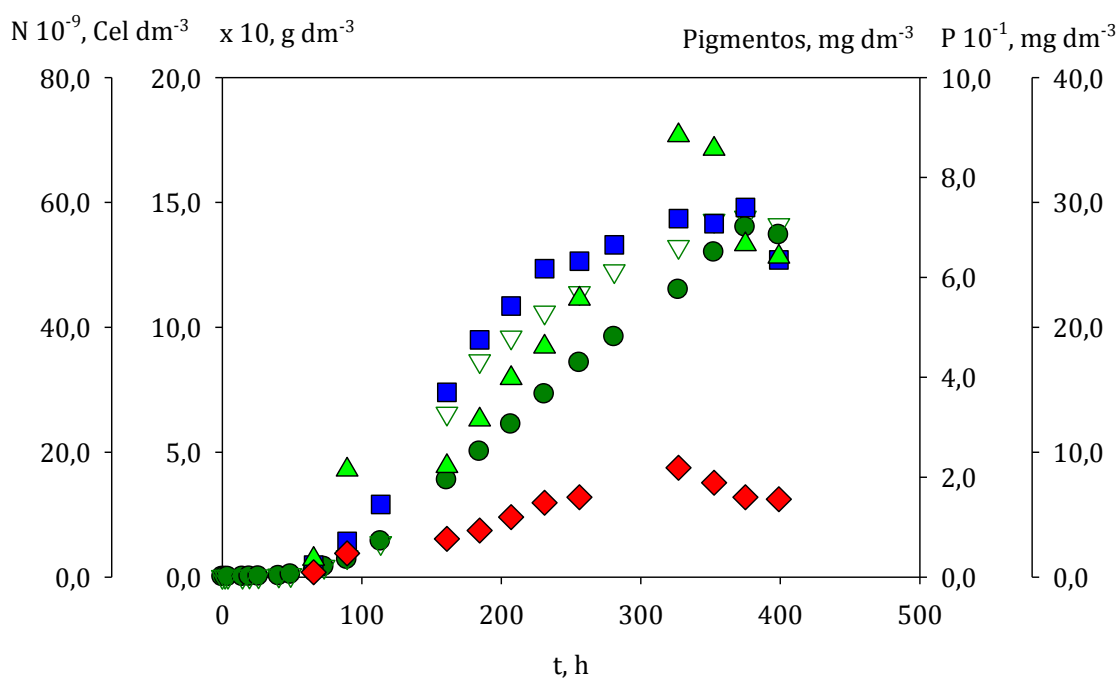


Figura C.15 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 15 RL.

Tabla C.44. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 15 RL

% N	% C	% H	% S	% O
7,39	50,2	6,63	0,707	35,1

Tabla C.45. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 15 RL

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,0648	18:3n3	37,8
14:1	0,0256	20:1n9	0,588
16:0	19,03	18:4n3	0,196
16:1	0,158	20:2n6	0,645
16:2	1,99	22:0	0,158
16:3	3,65	22:1n9	0,0684
18:0	18,7	20:5n3	0,0237
18:1	18,8	22:5n3	0,0477
18:2n3	0,546	22:6n3	0,246
18:2n6	1,40	N.I.	3,73
20:0	0,291		

Tabla C.46. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando el medio de Rodríguez-López

Expt: 16 RL

$Q = 1,5 \text{ v/v/min}$

$T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$		$\text{pH} = 8,0$		$M = R-L$		$I_0 = 141,73 \text{ } \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	
t h	$\times 10$ g dm^{-3}	$N 10^{-9}$ Cel dm^{-3}	$\text{CHL } 10^3$ g dm^{-3}	$\text{Ca } 10^3$ g dm^{-3}	$P 10^2$ g dm^{-3}	L %	
0,0	0,00766	0,0682					
2,0	0,0147	0,0821					
4,0	0,0182	0,0954					
14,5	0,0286	0,0976					
19,5	0,0321	0,125					
26,0	0,0354	0,171					
40,5	0,0490	0,319					
49,0	0,145	0,316					
65,5	0,331	1,36	0,364	0,0965	1,52		
73,0	0,604	2,12					
89,5	0,985	5,98	1,88	0,380	4,32		
113,5	1,89	13,1			7,60		
161,0	4,67	30,1	1,83	0,546	18,1		
184,5	5,64	36,7	2,82	0,753	21,5		
207,0	6,52	40,2	3,60	1,06	23,8		
231,0	7,76	44,0	4,61	1,07	24,2		
256,0	8,60	48,2	5,17	1,16	26,3		
281,0	9,97	51,2			29,1		
327,0	12,6	52,8	8,04	1,99	33,4		
352,5	14,3	55,5	8,18	1,89	35,9		
375,0	15,9	56,2	6,96	1,66	33,7		
399,0	15,7	55,6	6,70	1,56	29,6	44,9	
							$I_F = 108,99 \text{ } \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$

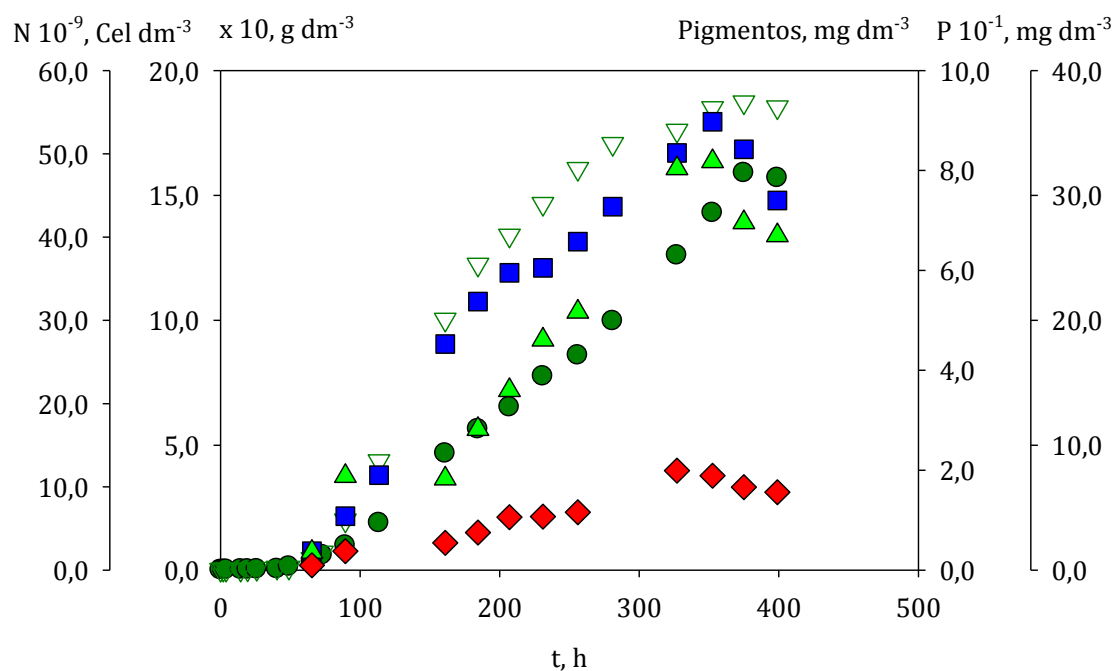


Figura C.16 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 16 RL.

Tabla C.47. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 16 RL

% N	% C	% H	% S	% O
7,36	49,9	6,37	0,717	35,6

Tabla C.48. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 16 RL

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,0726	18:3n3	35,8
14:1	0,415	20:1n9	0,636
16:0	19,1	18:4n3	0,636
16:1	0,231	20:2n6	0,839
16:2	2,11	22:0	0,182
16:3	3,75	22:1n9	0,758
18:0	18,6	20:5n3	0,162
18:1	18,2	22:5n3	0,0585
18:2n3	0,579	22:6n3	0,241
18:2n6	1,45	N.I.	3,85
20:0	0,313		

D. CULTIVOS DE *Chlorella pyrenoidosa* EN AGUAS RESIDUALES

Tabla D.1. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas

Expt: 1 ALF

MEDIO = 5 % ALF + UP

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C	I ₀ = 124,24 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ² g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %
0,0	0,935	0,100				
2,0	0,935	0,119				
6,0	0,935	0,255				
8,5	0,935	0,272				
22,0	0,935	0,307				
26,0	0,935	0,342				
32,5	1,12	0,376				
46,0	1,47	0,464	0,122	0,0196	0,624	
56,5	1,84	0,585				
70,0	2,40	1,45	0,272	0,0387	1,29	
80,0	3,77	2,15				
93,0	4,43	4,21	0,599	0,134	2,61	
104,0	6,96	6,21				
118,5	9,44	8,08			4,64	
166,0	16,9	20,3	2,48	0,533	8,01	
190,0	22,6	23,2	3,24	0,707	8,97	
214,0	26,3	25,2	3,94	0,912	8,76	
238,0	29,9	26,7	4,27	0,986	8,55	
262,0	32,6	27,9	4,59	1,09	7,29	
288,5	34,1	28,1	4,72	1,16	6,87	
335,5	34,3	27,5	5,01	1,29	6,24	20,4
						I _F = 123,58 μE m ⁻² s ⁻¹

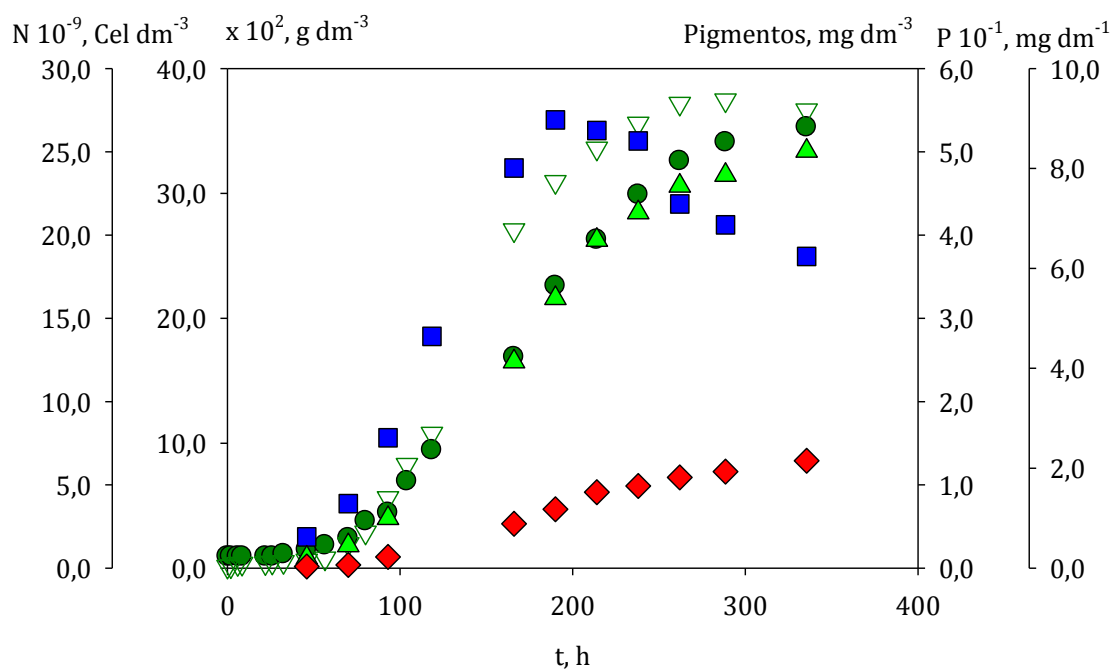


Figura D.1 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 1 ALF.

Tabla D.2. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 1 ALF

% N	% C	% H	% S	% O
7,21	45,1	7,04	0,586	40,0

Tabla D.3. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 1 ALF

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,696	18:1	8,57
14:1	0,764	18:2n3	0,120
16:0	21,7	18:2n6	13,9
16:1	2,88	20:0	0,104
16:2	3,73	18:3n3	23,8
16:3	0,340	20:2n6	1,16
18:0	7,55	20:5n3	0,289
		N.I.	14,4

Tabla D.4. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas

Expt: 2 ALF

MEDIO = 5 % ALF + UP

Q = 1 v/v/min		H = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 124,24 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ² g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	0,448	0,140					
2,0	0,597	0,218					
6,0	0,655	0,235					
8,5	0,684	0,251					
22,0	1,03	0,286					
26,0	1,15	0,302					
32,5	1,40	0,317					
46,0	1,62	0,350	0,120	0,0194	1,04		
56,5	1,78	0,363					
70,0	2,45	1,56	0,149	0,0381	1,63		
80,0	3,64	2,02					
93,0	4,61	6,86	0,555	0,150	2,92		
104,0	7,06	7,84					
118,5	9,43	12,1			4,26		
166,0	17,5	21,7	2,48	0,545	6,76		
190,0	22,1	23,7	3,07	0,688	7,08		
214,0	28,5	25,5	4,39	0,975	6,98		
238,0	30,4	27,2	4,62	1,07	6,45		
262,0	31,7	27,8	4,73	1,10	6,14		
288,5	32,3	28,0	4,87	1,15	5,93		
335,5	32,8	27,7	4,75	1,27	5,30	21,3	
I _F = 123,27 μE m ⁻² s ⁻¹							

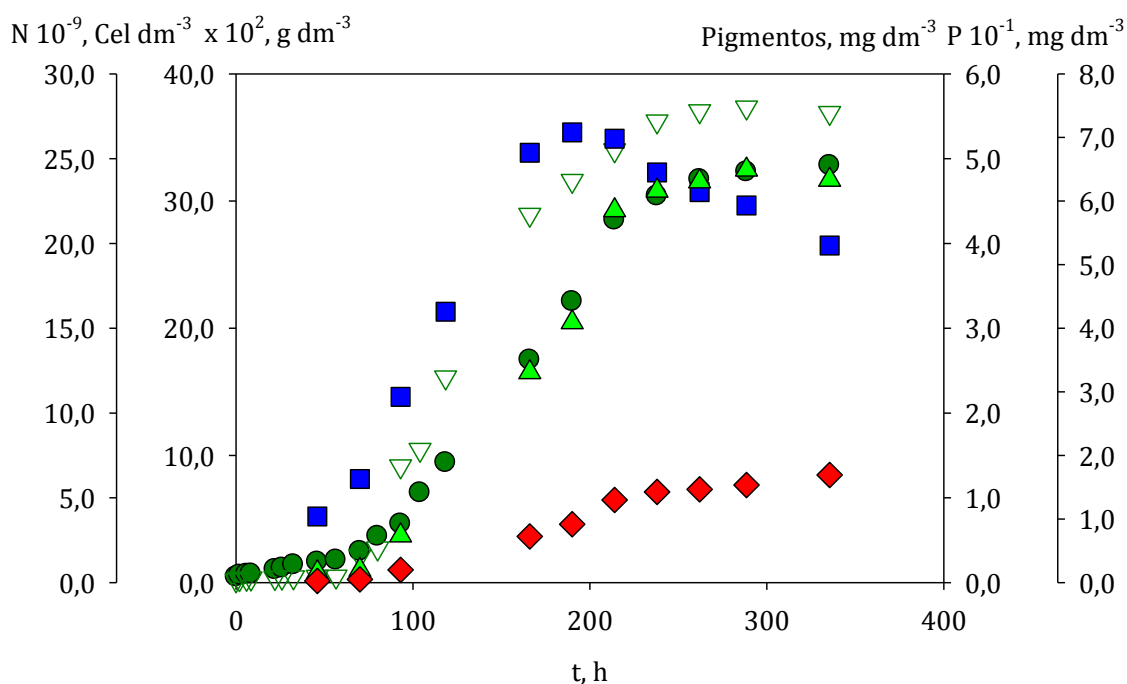


Figura D.2 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 2 ALF

Tabla D.5. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 2 ALF

% N	% C	% H	% S	% O
7,23	45,2	7,18	0,675	39,7

Tabla D.6. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 2 ALF

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,718	18:1	9,12
14:1	0,800	18:2n3	0,127
16:0	22,0	18:2n6	14,7
16:1	2,91	20:0	0,128
16:2	3,75	18:3n3	24,4
16:3	0,362	20:2n6	0,136
18:0	7,89	N.I.	13,0

Tabla D.7. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas

Expt: 3 ALF

MEDIO = 10 % ALF + UP

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 139,63 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	
t h	x 10 ² g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	1,19	0,120					
2,0	1,19	0,218					
5,0	1,19	0,294					
7,5	1,19	0,330					
21,0	1,19	0,576					
25,0	1,59	0,608					
31,0	2,00	0,639					
45,0	3,12	1,41	0,426	0,0974	1,52		
55,5	3,91	1,90					
68,5	5,11	4,82	0,631	0,134	1,67		
79,0	6,44	5,73					
92,5	7,65	6,50			2,65		
175,5	22,6	22,0					
189,0	26,1	23,3	4,70	0,987	9,08		
213,0	29,7	34,2	4,98	1,07	10,9		
236,5	36,2	39,5	5,94	1,42	8,55		
260,5	40,4	40,8			9,08		
308,5	46,2	42,4	7,37	1,66	9,28		
332,5	46,2	42,0	7,49	1,80	8,76	41,9	
							I _F = 120,59 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

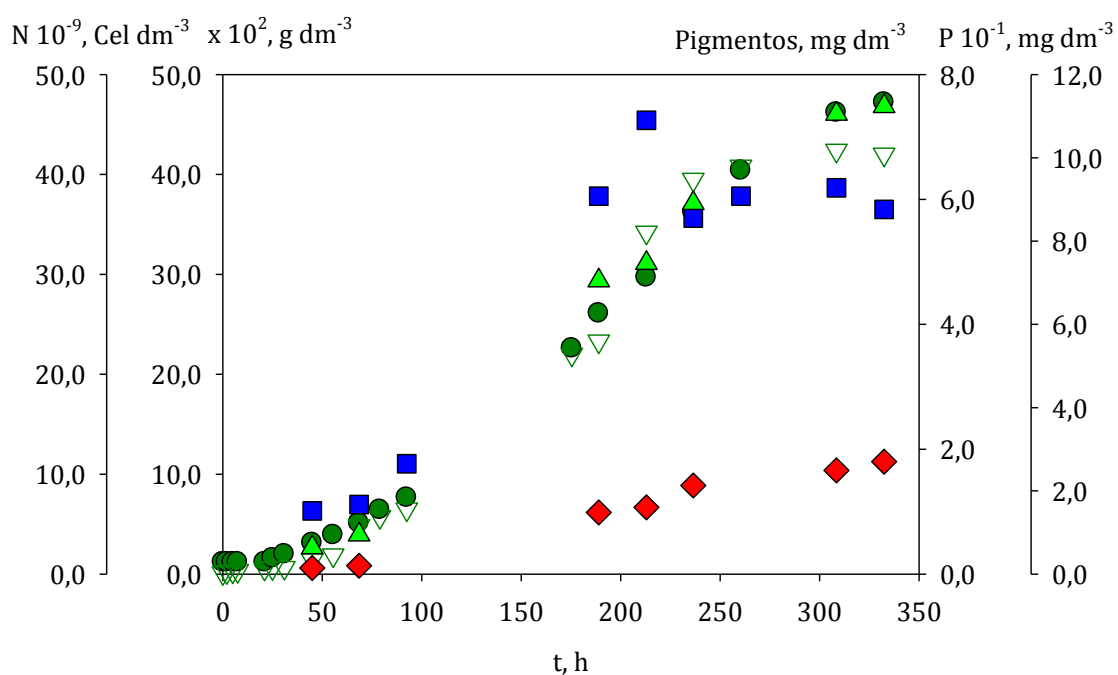


Figura D.3 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▼) en función del tiempo el Exp. 3 ALF.

Tabla D.8. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 3 ALF.

% N	% C	% H	% S	% O
7,00	46,1	6,96	0,677	39,2

Tabla D.9. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 3 ALF.

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,522	18:2n6	17,3
14:1	0,762	20:0	0,108
16:0	20,9	18:3n3	23,2
16:1	3,35	18:4n3	0,176
16:2	5,29	22:0	0,207
16:3	0,368	20:2n6	0,126
18:0	7,66	22:5n3	0,185
18:1	8,64	N.I.	11,1
18:2n3	0,108		

Tabla D.10. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas

Expt: 4 ALF

MEDIO = 10 % ALF + UP

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0	T = 25 °C		I ₀ = 139,63 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ² g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %
0,0	0,894	0,200				
2,0	0,894	0,198				
5,0	0,894	0,235				
7,5	0,894	0,252				
21,0	0,894	0,365				
25,0	1,09	0,418				
31,0	1,26	0,470				
45,0	1,84	1,00	0,153	0,0390	0,718	
55,5	2,69	1,31				
68,5	3,73	2,63	0,482	0,0961	1,94	
79,0	4,68	3,81				
92,5	5,31	4,67			2,74	
175,5	19,5	22,5				
189,0	21,9	27,2	3,66	0,778	11,9	
213,0	26,5	35,5	4,30	0,972	14,6	
236,5	31,3	40,3	4,59	1,16	10,8	
260,5	33,4	41,5			9,95	
308,5	35,4	41,9	5,01	1,28	9,11	
332,5	35,7	41,4	5,01	1,25	6,17	42,7
						I _F = 123,01 μE m ⁻² s ⁻¹

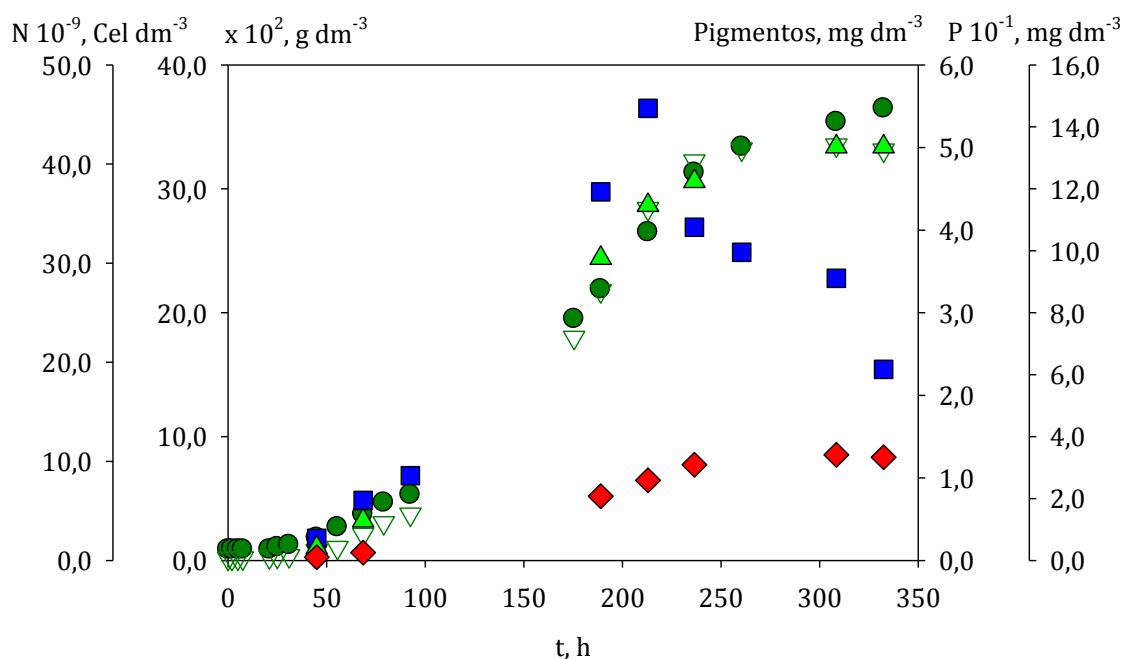


Figura D.4. Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▼) en función del tiempo en el Exp. 4 ALF.

Tabla D.11. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 4 ALF

% N	% C	% H	% S	% O
7,13	46,2	6,91	0,629	39,2

Tabla D.12. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 4 ALF

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,512	18:2n3	0,107
14:1	0,794	18:2n6	17,2
16:0	20,4	18:3n3	22,9
16:1	3,24	18:4n3	0,101
16:2	5,09	22:0	0,152
16:3	0,382	20:2n6	0,236
18:0	7,61	20:5n3	1,65
18:1	8,57	N.I.	11,1

Tabla D.13. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas

Expt: 5 ALF

MEDIO = 20 % ALF + UP

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 141,73 µE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ² g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	1,97	0,620					
2,5	2,15	0,653					
4,5	2,27	0,686					
18,5	2,40	0,756					
22,0	2,55	0,768					
28,5	2,81	1,04					
42,5	3,20	1,41			1,73		
90,5	4,11	3,06	0,451	0,0385	1,91		
114,5	5,51	3,66	0,621	0,0570	2,33		
138,5	6,77	4,21	0,817	0,0751	2,75		
162,5	9,13	4,77	1,33	0,111	3,38		
186,0	14,0	17,2	2,18	0,403	3,59		
210,5	18,4	21,9			4,01		
260,0	30,8	36,5	3,58	1,13	5,27		
282,0	36,1	37,4	4,74	1,39	6,11		
306,0	39,9	39,0	6,34	1,64	4,96		
329,5	43,6	39,0	7,41	1,69	5,06		
353,5	43,4	38,3	6,75	1,53	5,06	41,7	
							I _F = 119,90 µE m ⁻² s ⁻¹

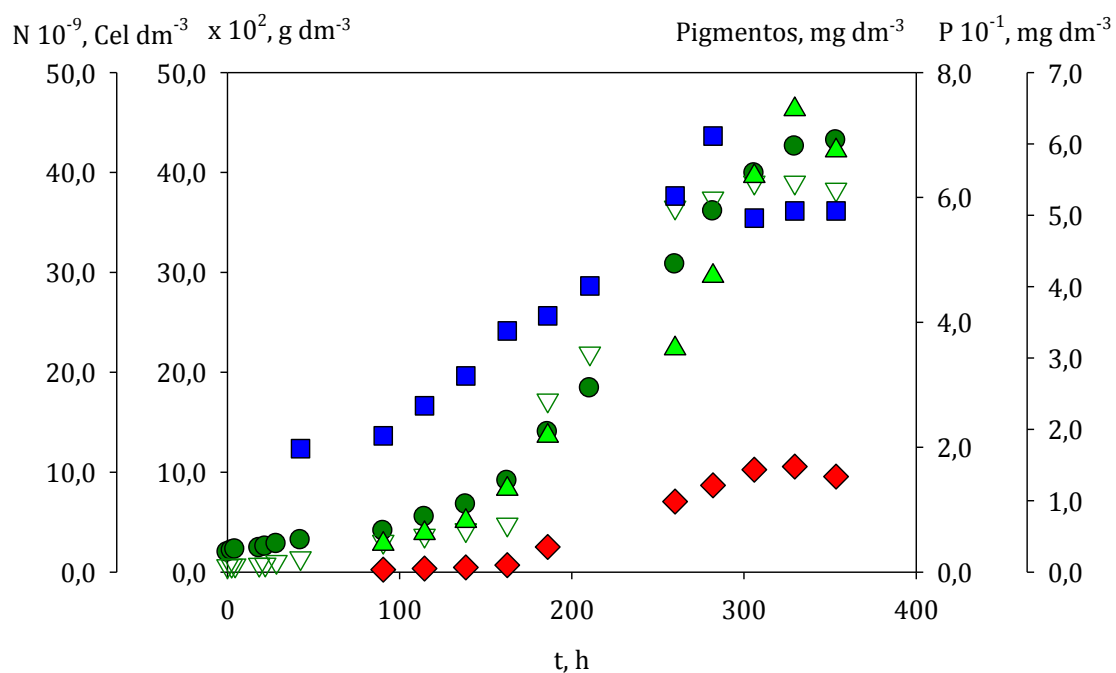


Figura D.5 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 5 ALF.

Tabla D.14. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 5 ALF

% N	% C	% H	% S	% O
7,32	48,1	7,39	0,497	36,7

Tabla D.15. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 5 ALF

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,493	18:2n6	17,2
14:1	0,793	20:0	0,113
16:0	20,8	18:3n3	22,5
16:1	3,20	18:4n3	0,0948
16:2	4,41	20:2n6	0,122
16:3	0,361	22:0	0,373
18:0	7,37	20:5n3	0,333
18:1	8,16	22:5n3	0,361
18:2n3	0,0826	N.I.	16,4

Tabla D.16. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas

Expt: 6 ALF

MEDIO = 20 % ALF + UP

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 140,57 µE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ² g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	1,59	0,400					
2,0	1,59	0,436					
5,0	1,59	0,451					
7,5	1,59	0,485					
21,0	1,59	0,576					
25,0	1,79	0,604					
31,0	1,93	0,653					
45,0	3,10	2,42	0,606	0,0969	1,33		
55,5	6,26	4,11					
68,5	7,85	5,90	1,10	0,266	3,33		
79,0	8,91	7,90					
92,5	9,62	9,27			4,04		
175,5	20,7	16,4					
189,0	23,8	18,7	5,32	0,993	8,60		
213,0	28,5	26,2	7,02	1,30	9,42		
236,5	31,4	28,0	7,88	1,50	10,1		
260,5	39,6	29,7			11,2		
308,5	40,6	32,2	9,22	1,80	11,9		
332,5	40,7	31,0	8,67	1,81	7,20	45,4	
							I _F = 116,34 µE m ⁻² s ⁻¹

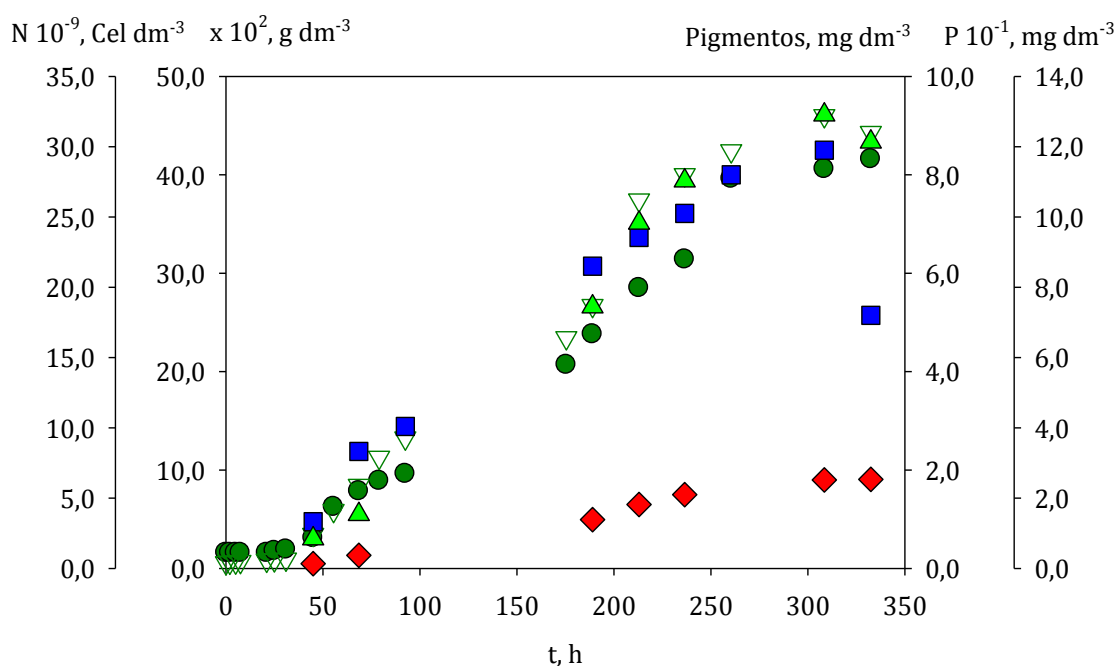


Figura D.6 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▼) en función del tiempo en el Exp. 6 ALF.

Tabla D.17. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 6 ALF

% N	% C	% H	% S	% O
7,40	48,2	7,30	0,513	36,6

Tabla D.18. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 6 ALF

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,485	18:2n6	17,0
14:1	0,765	20:0	0,118
16:0	20,3	18:3n3	21,4
16:1	3,13	18:4n3	0,0839
16:2	4,33	20:2n6	0,290
16:3	0,335	22:0	0,258
18:0	7,24	20:5n3	0,235
18:1	9,19	22:5n3	1,85
18:2n3	0,0791	N.I.	13,2

Tabla D.19. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas

Expt: 7 ALF

MEDIO = 30 % ALF + UP

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 141,73 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ² g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	0,657	0,140					
2,0	0,747	0,198					
6,0	0,776	0,255					
8,5	0,805	0,291					
22,0	0,950	0,346					
26,0	1,36	0,374					
32,5	1,66	0,407					
46,0	2,21	0,586	0,154	0,0197	0,984		
56,5	2,85	0,720					
70,0	3,59	3,54	0,580	0,0977	1,52		
80,0	7,10	4,48					
93,0	9,12	7,35	1,28	0,252	3,80		
104,0	12,7	10,0					
118,5	14,5	14,9			5,64		
166,0	24,8	25,7	4,87	1,02	8,03		
190,0	32,1	27,8	5,85	1,16	8,66		
214,0	38,4	30,1	6,45	1,39	8,66		
238,0	45,2	32,2	7,42	1,59	8,55		
262,0	48,7	33,1	8,02	1,70	8,34		
288,5	51,7	33,8	8,46	1,86	7,29		
335,5	61,5	34,6	9,43	2,21	7,61		
360,0	61,8	34,4	9,64	2,22	6,77	46,0	
							I _F = 115,64 μE m ⁻² s ⁻¹

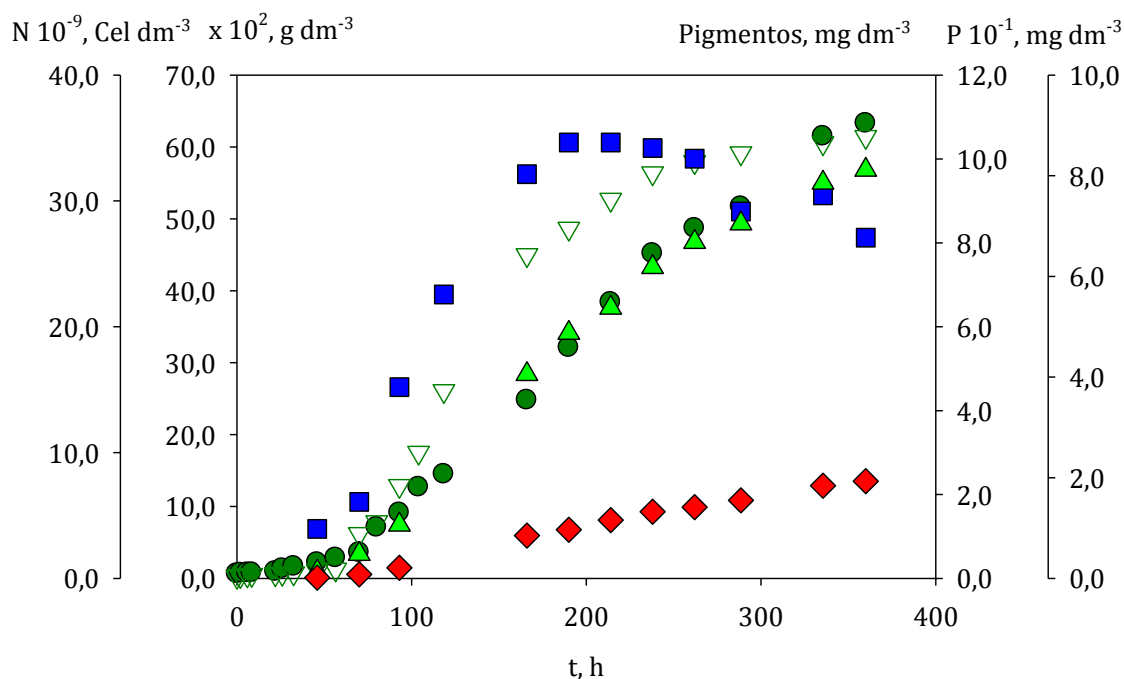


Figura D.7 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 7 ALF.

Tabla D.20. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 7 ALF

% N	% C	% H	% S	% O
7,16	46,9	7,11	0,645	38,2

Tabla D.21. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 7 ALF

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,708	20:0	0,113
14:1	0,807	18:3n3	24,7
16:0	19,8	18:4n3	0,100
16:1	3,65	20:1n9	0,195
16:2	3,30	20:2n6	0,132
16:3	0,359	22:0	0,586
18:0	7,49	22:1n9	0,140
18:1	9,25	20:5n3	0,534
18:2n3	0,150	22:5n3	0,328
18:2n6	13,3	N.I.	14,4

Tabla D.22. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas

Expt: 8 ALF

MEDIO = 30 % ALF + UP

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 141,73 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	
t h	x 10 ² g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	1,11	0,280					
3,0	1,11	0,416					
6,5	1,22	0,490					
20,0	1,54	0,485					
24,0	1,80	0,518					
30,5	2,42	0,589					
44,0	3,51	3,42					
48,0	4,56	4,10					
54,5	5,88	4,94					
67,0	7,11	7,78	1,33	0,290	3,17		
78,5	9,48	8,90					
91,5	13,1	10,9	1,55	0,343	5,09		
111,0	14,9	14,1					
128,0	16,8	19,0			4,80		
173,5	28,5	24,9	4,85	0,873			
198,0	34,3	26,5	7,07	1,40	9,39		
221,0	39,0	29,4	8,13	1,66	10,3		
247,0	43,5	31,8	8,80	1,80			
270,0	47,9	34,9	8,39	1,77	5,48		
293,5	52,3	35,8			5,59		
341,5	52,3	33,0	7,94	1,78	5,59	46,5	
							I _F = 114,14 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

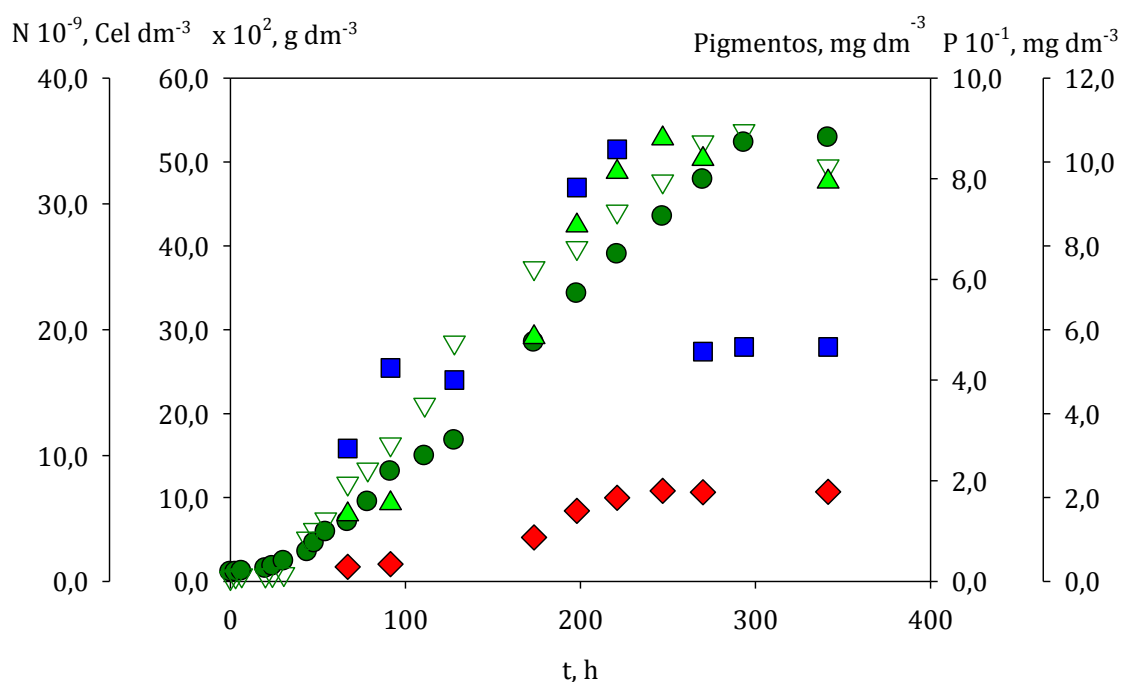


Figura D.8 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 8 ALF.

Tabla D.23. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 8 ALF

% N	% C	% H	% S	% O
7,17	47,4	7,35	0,636	37,4

Tabla D.24. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 8 ALF

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,648	20:0	0,0832
14:1	0,842	18:3n3	24,4
16:0	19,8	18:4n3	0,0960
16:1	3,64	20:1n9	0,265
16:2	3,22	20:2n6	0,130
16:3	0,347	22:0	0,558
18:0	7,31	20:5n3	0,406
18:1	8,87	22:5n3	0,260
18:2n3	0,152	N.I.	16,2
18:2n6	12,8		

Tabla D.25. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas

Expt: 9 ALF

MEDIO = 50 % ALF + UP

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0	T = 25 °C		I ₀ = 124,63 µE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ² g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %
0,0	1,19	0,460				
2,0	1,19	0,238				
6,0	1,19	0,196				
8,5	1,19	0,221				
22,0	1,19	0,250				
26,0	1,19	0,337				
32,5	1,90	0,462				
46,0	2,71	0,676	0,305	0,0585	1,11	
56,5	3,91	1,30				
70,0	4,69	2,79	1,05	0,192	1,91	
80,0	7,83	3,46				
93,0	10,6	8,53	2,38	0,436	4,26	
104,0	16,6	12,8				
118,5	18,4	18,8			7,32	
166,0	27,4	31,6	5,52	1,01	9,96	
190,0	31,2	32,3	7,15	1,33	11,0	
214,0	35,6	34,2	8,09	1,50	12,1	
238,0	41,8	35,4	8,53	1,71	14,1	
262,0	46,0	35,8	9,34	1,83	11,4	
288,5	51,5	35,7	9,84	1,99	11,2	
335,5	61,4	35,3	10,9	2,25	10,6	
360,0	61,6	35,3	11,3	2,41	9,75	47,1
						I _F = 110,91 µE m ⁻² s ⁻¹

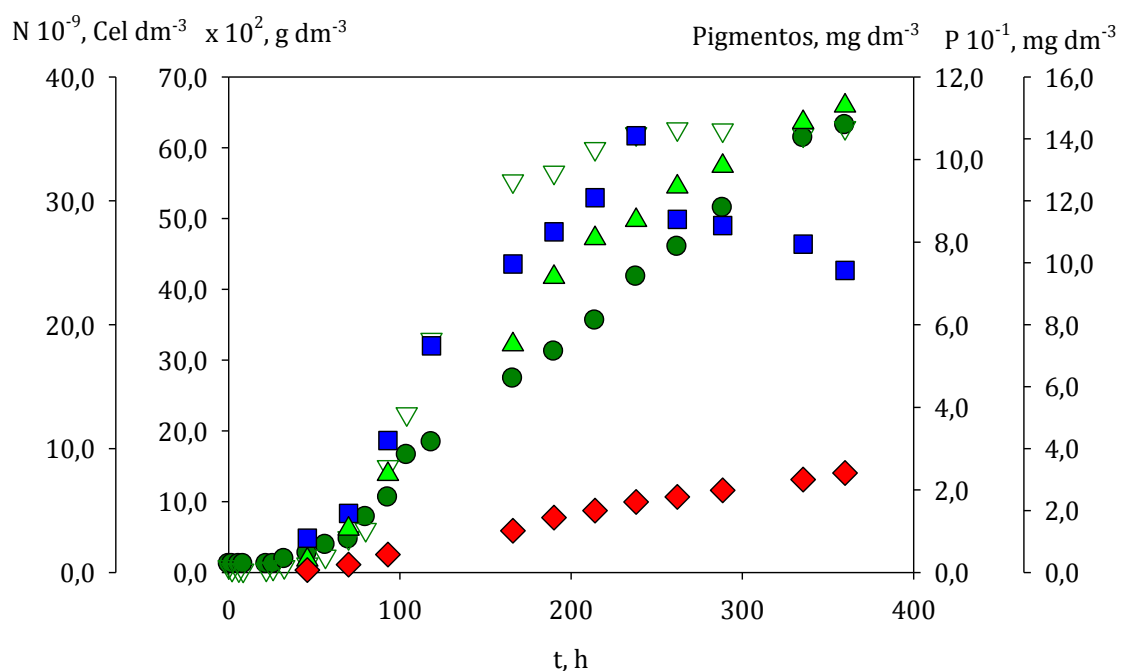


Figura D.9 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 9 ALF.

Tabla D.26. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 9 ALF

% N	% C	% H	% S	% O
7,20	46,4	6,95	0,639	38,8

Tabla D.27. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 9 ALF

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,594	18:2n6	15,3
14:1	1,22	20:0	0,127
16:0	20,7	18:3n3	18,5
16:1	4,50	18:4n3	0,0922
16:2	5,65	20:2n6	0,147
16:3	0,413	22:0	1,50
18:0	6,82	22:1n9	0,310
18:1	8,34	20:5n3	0,443
18:2n3	0,0740	N.I.	15,3

Tabla D.28. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas

Expt: 10 ALF

MEDIO = 50 % ALF + UP

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 124,63 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ² g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	1,37	0,360					
3,0	1,37	0,376					
6,5	1,37	0,412					
20,0	1,37	0,504					
24,0	1,37	0,518					
30,5	1,37	0,551					
44,0	1,93	2,33					
48,0	2,59	3,18					
54,5	3,51	4,06					
67,0	4,17	5,88	0,602	0,154	1,81		
78,5	7,77	8,10					
91,5	9,62	14,2	1,25	0,227	4,07		
111,0	11,5	17,5					
128,0	13,8	20,3			5,92		
173,5	20,4	27,7	4,04	0,789	5,61		
198,0	26,8	32,2	5,29	1,06	6,87		
221,0	31,8	35,6	5,90	1,21	7,92		
247,0	36,5	46,2	6,15	1,32			
270,0	38,5	47,2	6,40	1,36	8,24		
293,5	38,9	47,7			4,39		
341,5	38,3	47,3	5,81	1,31	4,56	47,1	
							I _F = 114,19 μE m ⁻² s ⁻¹

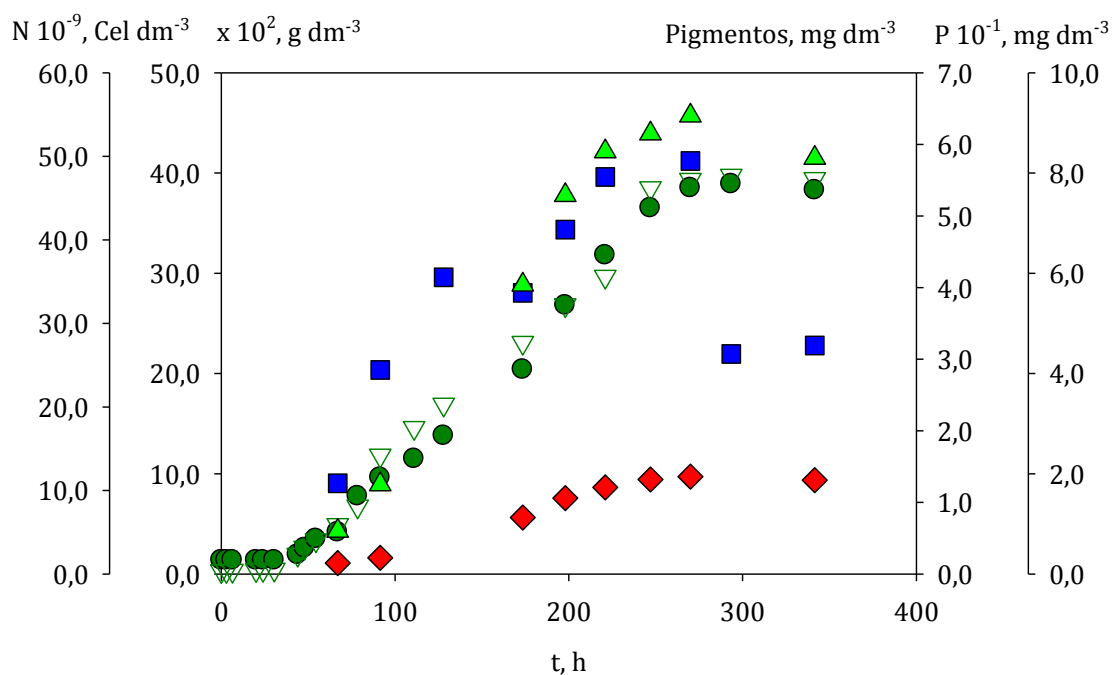


Figura D.10 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 10 ALF.

Tabla D.29. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 10 ALF

% N	% C	% H	% S	% O
7,01	46,6	6,89	0,642	38,9

Tabla D.30. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 10 ALF

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,615	18:2n6	15,6
14:1	1,25	20:0	0,112
16:0	21,3	18:3n3	18,4
16:1	4,65	20:2n6	0,210
16:2	5,72	22:0	0,656
16:3	0,333	22:1n9	0,191
18:0	6,62	20:5n3	0,451
18:1	8,15	N.I.	15,6
18:2n3	0,101		

Tabla D.31. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas

Expt: 11 ALF

MEDIO = 100 % ALF

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 139,60 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	
t h	x 10 ² g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	1,43	0,340					
3,0	1,43	0,356					
6,5	1,76	0,627					
20,0	1,69	0,698					
24,0	1,71	0,729					
30,5	2,00	0,779					
44,0	2,37	2,69					
48,0	3,19	3,05					
54,5	5,36	3,73					
67,0	6,06	5,94	0,424	0,0582	2,71		
78,5	11,4	7,13					
91,5	12,6	12,0	2,34	0,459	5,40		
111,0	15,8	14,9					
128,0	19,0	16,7			7,92		
173,5	26,5	19,5	5,67	1,06	7,40		
198,0	31,7	22,0	6,37	1,22	7,50		
221,0	36,9	24,0	8,01	1,56	8,55		
247,0	41,5	27,2	10,0	1,92			
270,0	43,9	28,6	9,63	1,92	10,0		
293,5	45,4	29,7			10,1		
341,5	37,1	26,4	9,16	1,86	7,08	47,8	
							I _F = 114,72 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

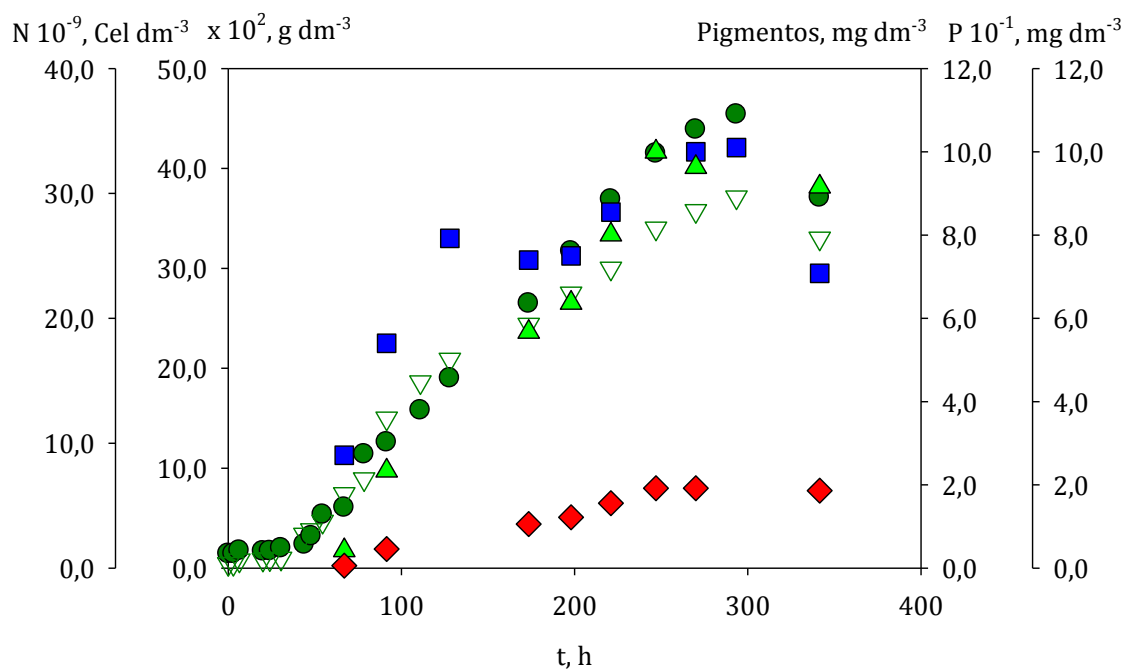


Figura D.11 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 11 ALF.

Tabla D.32. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 11 ALF

% N	% C	% H	% S	% O
7,32	47,8	7,11	0,620	37,1

Tabla D.33. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 11 ALF

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,524	18:2n6	18,1
14:1	1,04	20:0	0,143
16:0	19,2	18:3n3	22,2
16:1	1,69	20:2n6	0,243
16:2	4,42	22:0	0,260
16:3	0,431	20:5n3	0,178
18:0	6,84	22:5n3	0,158
18:1	10,8	N.I.	13,7
18:2n3	0,0765		

Tabla D.34. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas

Expt: 12 ALF

MEDIO = 100 % ALF

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 140,57 µE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ² g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	1,37	0,560					
2,0	1,69	0,614					
6,5	1,96	0,804					
20,5	2,21	1,13					
24,5	3,41	1,27					
30,5	4,98	2,20					
43,0	7,12	4,07					
54,0	9,32	5,18					
67,0	11,8	7,70	2,63	0,421	5,14		
78,0	16,2	13,0					
91,0	21,1	23,4	4,36	0,902	8,37		
101,5	26,4	26,1					
117,0	32,2	30,8					
163,0	41,6	33,7	7,50	1,56	13,4		
187,0	45,7	35,5	8,83	1,67	9,60		
198,0	47,8	34,7					
236,0	50,2	34,8	10,3	2,16	9,29		
259,0	49,3	34,0	12,7	2,37	6,98	48,2	
							I _F = 113,92 µE m ⁻² s ⁻¹

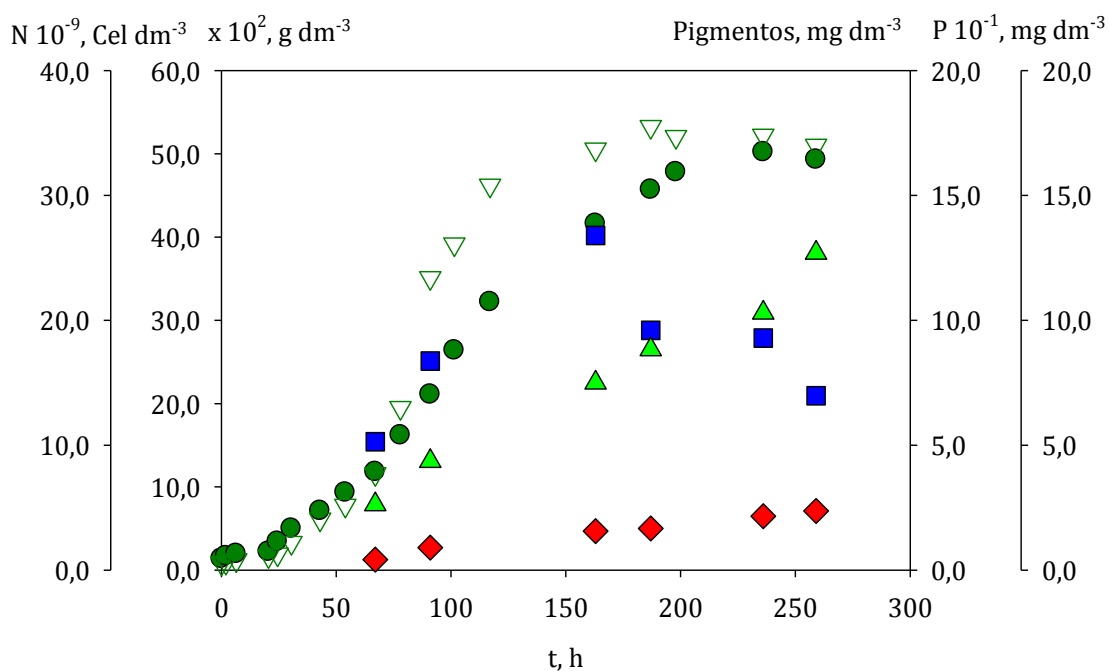


Figura D.12 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 12 ALF.

Tabla D.35. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 12 ALF

% N	% C	% H	% S	% O
7,36	47,9	7,00	0,617	37,1

Tabla D.36. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 12 ALF

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,518	18:2n6	18,2
14:1	1,04	20:0	0,111
16:0	19,2	18:3n3	23,0
16:1	1,65	20:2n6	0,653
16:2	4,28	22:0	0,260
16:3	0,425	20:5n3	0,191
18:0	6,24	22:5n3	0,133
18:1	11,0	N.I.	13,0
18:2n3	0,0850		

Tabla D.37. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites

Expt: 1 ALA

MEDIO = 5 % ALA + UP

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 124,24 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ² g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	4,00	1,62					
2,0	4,19	1,82					
5,5	4,81	2,02					
18,5	5,70	2,17					
23,0	6,67	2,53					
30,0	8,99	2,70					
43,0	10,7	7,19	0,612	0,157	4,50		
53,5	12,4	8,73					
67,0	15,6	11,0	1,57	0,232	5,34		
77,5	17,4	13,1					
91,0	20,3	21,1	2,15	0,533	6,60		
115,0	23,9	24,8			6,64		
164,0	26,6	26,3	2,91	0,801	6,77		
187,5	27,4	26,0	3,14	0,859	6,51		
236,0	28,5	26,6	3,31	1,00	6,08		
284,5	29,3	24,7	3,77	1,20	5,54		
331,0	29,0	18,0	3,93	1,16	5,01	28,1	
							I _F = 127,08 μE m ⁻² s ⁻¹

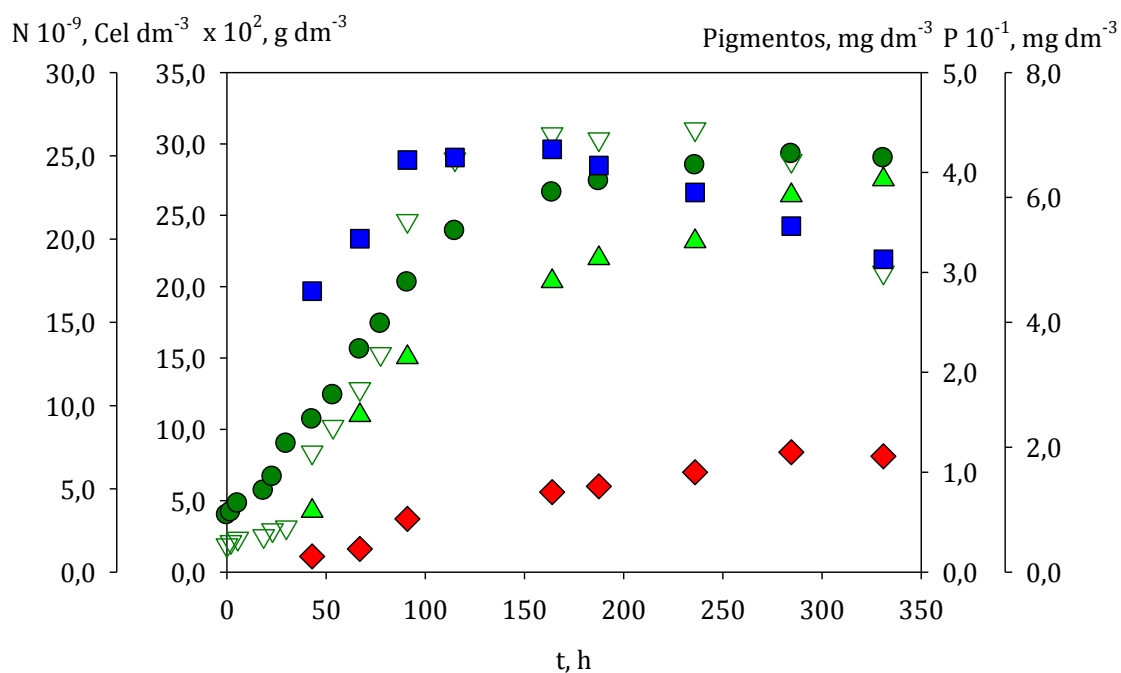


Figura D.13 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 1 ALA.

Tabla D.38. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 1 ALA

% N	% C	% H	% S	% O
7,12	41,1	6,96	0,952	43,9

Tabla D.39. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 1 ALA

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,541	18:2n6	10,8
14:1	0,679	20:0	0,219
16:0	20,3	18:3n3	28,2
16:1	5,21	20:2n6	0,378
16:2	3,82	22:0	0,612
16:3	1,37	22:1n9	0,185
18:0	7,81	20:5n3	0,529
18:1	7,59	22:5n3	0,271
18:2n3	0,257	N.I.	11,2

Tabla D.40. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites

Expt: 2 ALA

MEDIO = 5 % ALA + UP

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 124,24 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ² g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	3,34	1,52					
2,0	3,50	1,63					
5,5	4,28	1,71					
18,5	5,32	2,23					
23,0	6,18	2,39					
30,0	8,09	2,50					
43,0	9,54	7,16	0,722	0,116	3,87		
53,5	11,4	8,71					
67,0	14,4	11,0	1,72	0,418	4,29		
77,5	15,9	13,0					
91,0	17,4	15,7	1,87	0,484	4,92		
115,0	20,2	22,1			4,91		
164,0	22,3	24,3	2,45	0,661	5,64		
187,5	24,0	24,9	2,87	0,848	4,69		
236,0	26,2	25,3	3,03	0,870	4,85		
284,5	26,3	21,0	3,53	1,04	4,49		
331,0	25,6	16,5	3,77	0,977	3,96	20,3	
							I _F = 125,37 μE m ⁻² s ⁻¹

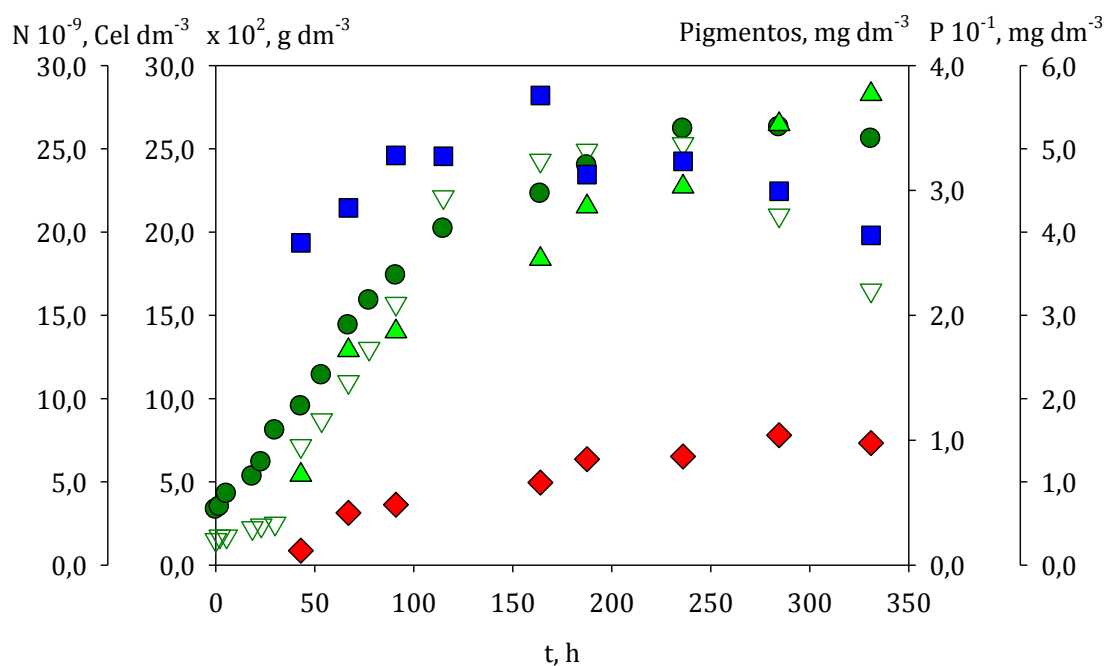


Figura D.14 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 2 ALA.

Tabla D.41. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 2 ALA

% N	% C	% H	% S	% O
7,14	43,8	6,65	1,00	41,5

Tabla D.42. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 2 ALA

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,534	18:2n6	11,0
14:1	0,687	20:0	0,201
16:0	21,0	18:3n3	28,5
16:1	5,16	20:2n6	0,155
16:2	3,90	22:0	0,730
16:3	1,39	22:1n9	0,178
18:0	7,87	20:5n3	0,569
18:1	7,63	22:5n3	0,341
18:2n3	0,250	N.I.	9,91

Tabla D.43. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites

Expt: 3 ALA

MEDIO = 10 % ALA + UP

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 140,57 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ² g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	1,76	0,520					
2,0	1,76	0,772					
6,5	1,76	0,804					
20,5	2,49	1,07					
24,5	3,11	1,19					
30,5	3,69	1,86					
43,0	4,28	3,34	0,615	0,157	1,94		
54,0	5,20	4,36					
67,0	6,10	5,47	0,912	0,194	2,35		
78,0	8,09	6,61					
91,0	10,4	11,6	1,14	0,269	2,44		
101,5	13,5	13,6					
117,0	15,0	15,9					
163,0	18,1	17,9	1,80	0,445	3,86		
187,0	18,4	18,7	2,18	0,476	3,05		
198,0	18,9	16,7					
236,0	19,4	14,0	2,40	0,571	3,06		
259,0	18,6	13,5	2,31	0,563	2,57	41,4	
							I _F = 121,51 μE m ⁻² s ⁻¹

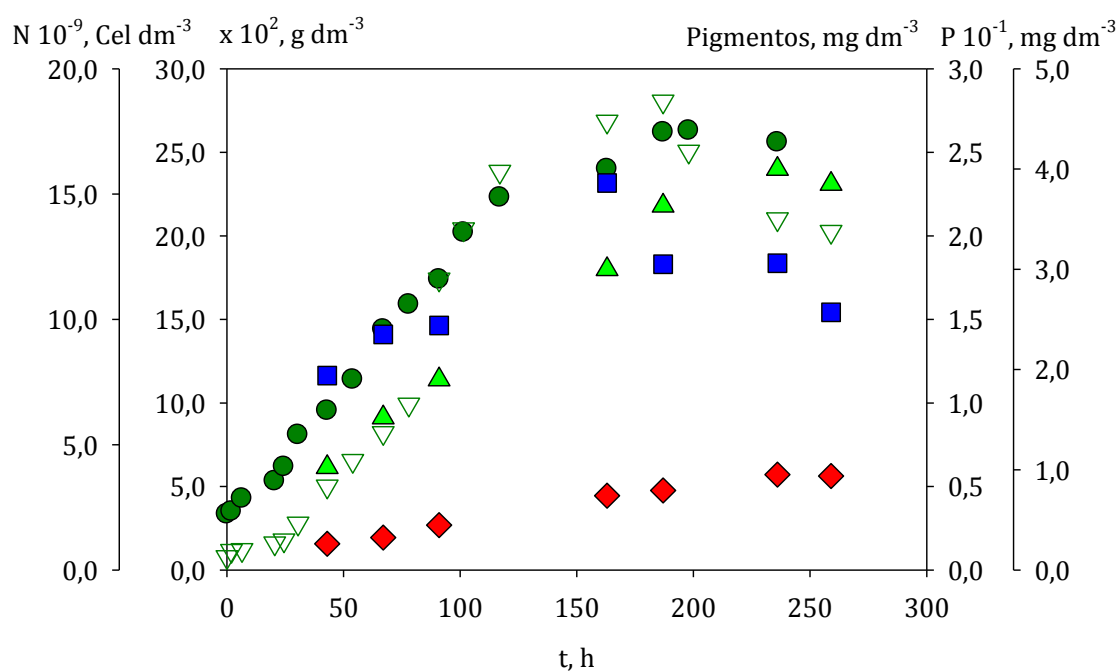


Figura D.13 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 3 ALA.

Tabla D.44. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 3 ALA

% N	% C	% H	% S	% O
6,92	41,0	6,78	0,863	44,4

Tabla D.45. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 3 ALA

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,652	18:2n3	0,0957
14:1	0,950	18:2n6	14,3
16:0	23,8	20:0	0,111
16:1	5,00	18:3n3	19,1
16:2	4,01	22:0	0,254
16:3	0,384	20:5n3	0,305
18:0	5,79	22:5n3	0,355
18:1	10,6	N.I.	14,3

Tabla D.46. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites

Expt: 4 ALA

MEDIO = 10 % ALA + UP

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 139,63 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ² g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	2,74	0,880					
2,5	2,74	0,990					
6,0	2,74	1,10					
18,5	2,74	1,40					
23,5	3,55	1,71					
29,5	4,64	1,78					
42,0	6,76	2,91					
53,0	7,89	3,95					
68,5	9,77	4,36	1,20	0,268	3,99		
115,5	18,0	14,3	1,45	0,333	7,01		
125,5	20,9	16,2					
139,0	22,2	25,2	2,62	0,618	9,08		
149,0	23,8	28,0					
162,5	24,7	27,1	3,56	0,783	9,71		
186,5	25,4	21,9	3,44	0,838	8,69		
210,0	25,1	21,1	3,00	0,752	8,18		
235,5	24,8	15,3	2,56	0,700	6,01		
282,5	23,5	14,5	2,56	0,640	4,49	43,9	
							I _F = 119,20 μE m ⁻² s ⁻¹

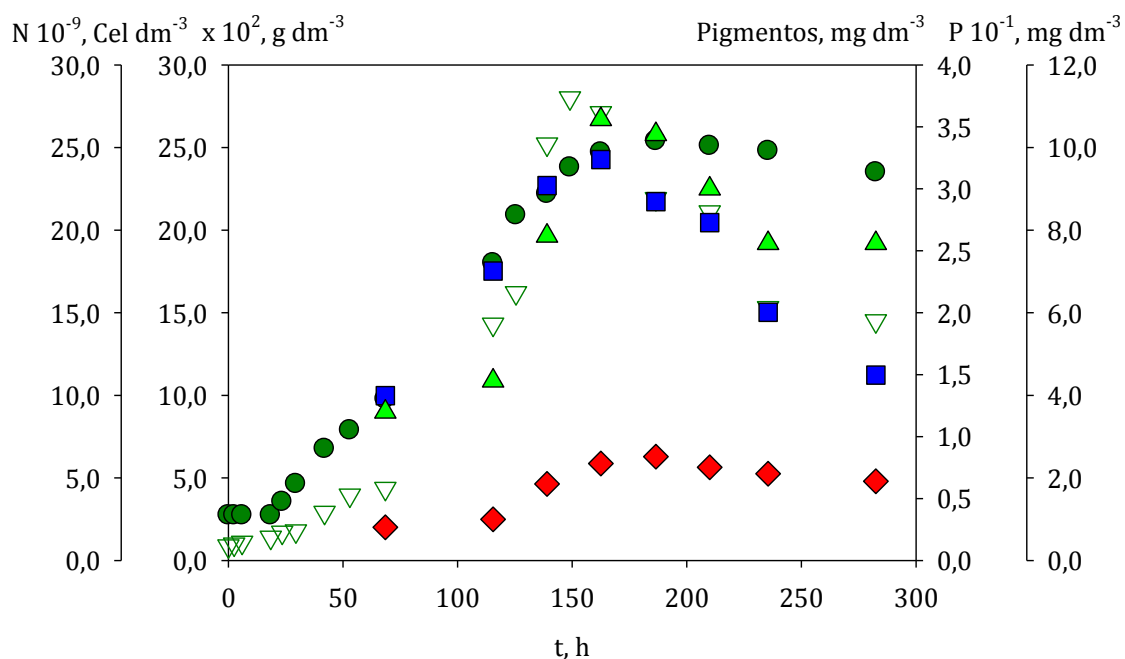


Figura D.16 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 4 ALA.

Tabla D.47. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 4 ALA

% N	% C	% H	% S	% O
6,94	40,8	6,68	0,849	44,7

Tabla D.48. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 4 ALA

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,605	18:2n6	13,5
14:1	0,908	18:3n3	18,2
16:0	22,8	18:4n3	0,721
16:1	4,78	20:2n6	1,40
16:2	3,83	22:1n9	0,145
16:3	0,363	20:5n3	0,337
18:0	5,58	22:5n3	0,357
18:1	10,5	N.I.	15,9
18:2n3	0,0870		

Tabla D.49. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites

Expt: 5 ALA

MEDIO = 20 % ALA + UP

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 141,73 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	
t h	x 10 ² g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	2,24	0,420					
3,0	2,37	0,436					
6,5	2,47	0,706					
20,0	3,27	0,776					
24,0	3,63	0,883					
30,5	4,04	1,10					
44,0	4,79	4,60					
48,0	5,91	5,09					
54,5	6,63	5,67					
67,0	7,42	7,28	1,27	0,232	4,59		
78,5	10,4	8,72					
91,5	12,2	13,2	1,61	0,343	6,24		
111,0	16,2	16,0					
128,0	18,2	20,4			7,42		
173,5	22,8	25,3	3,80	0,763	7,56		
198,0	26,3	27,1	4,36	0,894	7,92		
221,0	30,3	30,7	4,96	1,06	7,71		
247,0	34,6	34,5	5,63	1,25			
270,0	36,0	36,1	5,75	1,26	7,08		
293,5	37,0	36,4			7,08		
341,5	36,8	32,7	5,04	1,13	6,56	43,6	
							I _F = 117,69 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

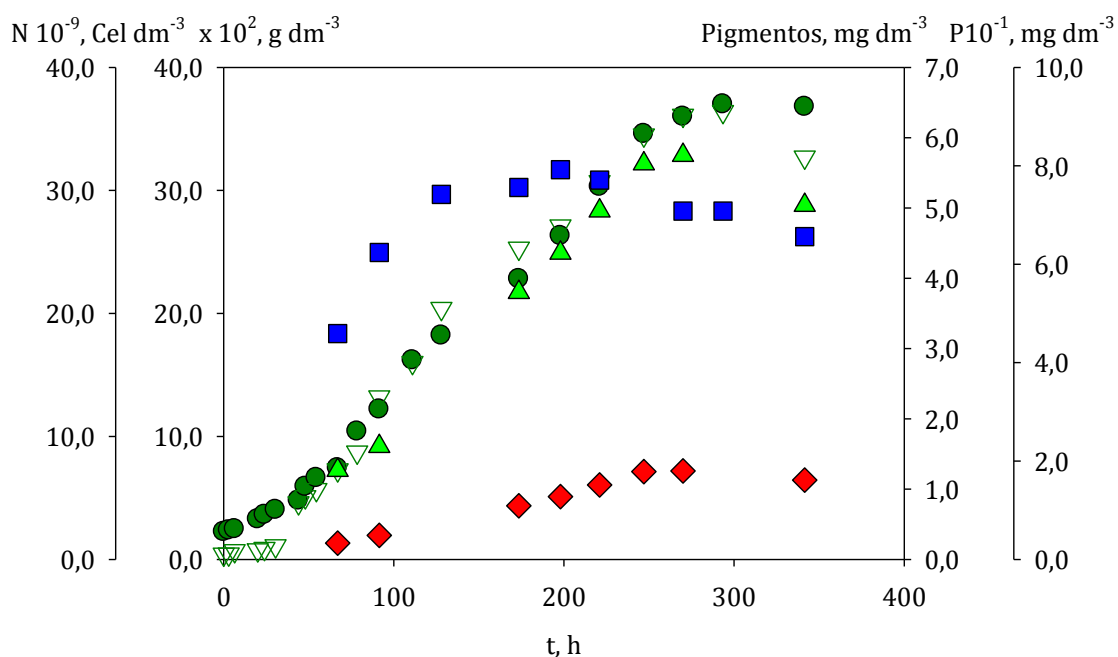


Figura D.17 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 5 ALA.

Tabla D.50. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 5 ALA.

% N	% C	% H	% S	% O
6,78	44,6	6,48	0,836	41,3

Tabla D.51. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 5 ALA

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,575	20:0	0,230
14:1	0,885	18:3n3	23,7
16:0	20,1	20:1n9	0,0448
16:1	4,83	20:2n6	0,174
16:2	4,06	22:0	0,648
16:3	0,282	22:1n9	0,227
18:0	7,14	20:5n3	0,570
18:1	9,56	22:5n3	0,313
18:2n3	0,148	N.I.	12,8
18:2n6	13,7		

Tabla D.52. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites

Expt: 6 ALA

MEDIO = 20 % ALA + UP

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C	I ₀ = 140,57 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ² g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %
0,0	1,58	0,740				
2,0	1,58	0,812				
6,5	1,58	0,960				
20,5	3,13	1,36				
24,5	4,63	1,57				
30,5	5,55	1,88				
43,0	7,68	4,02	0,853	0,234	3,53	
54,0	8,71	5,88				
67,0	10,6	7,19	1,20	0,269	5,06	
78,0	12,2	8,06				
91,0	14,0	9,84	1,36	0,340	5,43	
101,5	14,5	11,0				
117,0	15,3	15,0				
163,0	18,7	20,1	1,80	0,432	7,11	
187,0	19,8	22,8	2,10	0,530	5,22	
198,0	20,5	24,1				
236,0	20,5	24,5	2,23	0,577	4,64	
259,0	20,1	23,1	2,24	0,599	3,38	
331,0	17,1	15,6	2,01	0,595	2,86	46,2
						I _F = 125,74 μE m ⁻² s ⁻¹

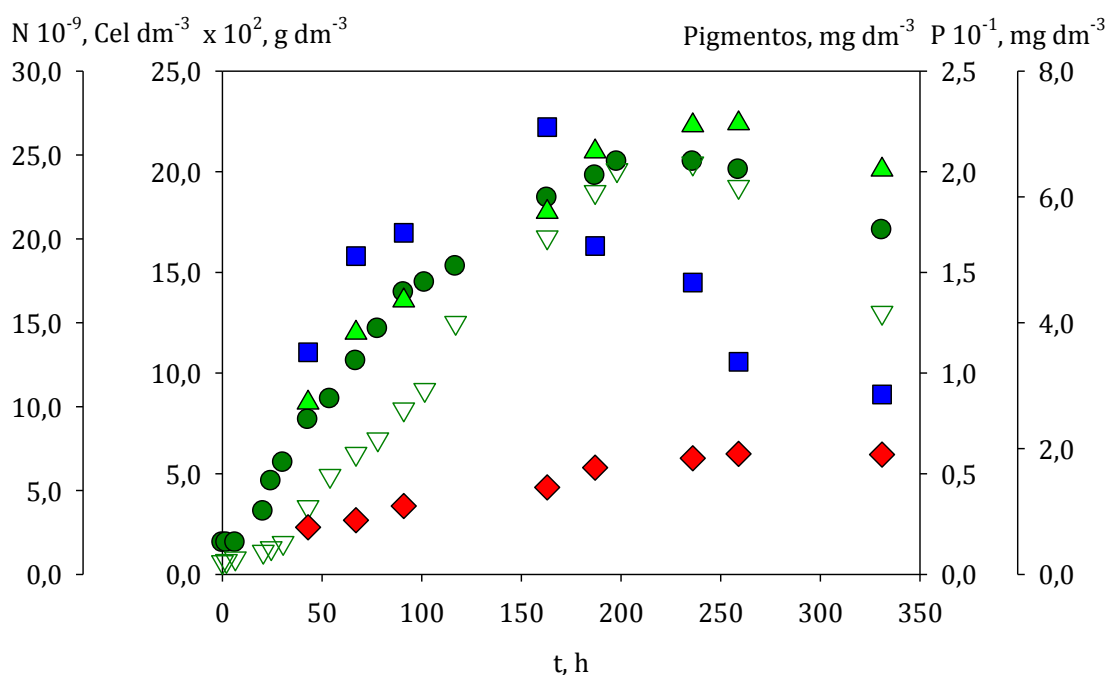


Figura D.18 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 6 ALA.

Tabla D.53. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 6 ALA

% N	% C	% H	% S	% O
7,00	42,1	6,78	0,838	43,3

Tabla D.54. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 6 ALA

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,575	18:2n6	13,7
14:1	0,876	20:0	0,220
16:0	19,9	18:3n3	23,3
16:1	4,81	20:1n9	0,196
16:2	3,92	20:2n6	0,131
16:3	0,290	22:0	0,585
18:0	7,19	22:1n9	0,206
18:1	9,67	20:5n3	0,499
18:2n3	0,143	22:5n3	0,292
		N.I.	13,5

Tabla D.55. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites

Expt: 7 ALA

MEDIO = 30 % ALA + UP

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 141,73 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ² g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	1,56	0,420					
2,0	1,56	0,713					
6,5	1,56	0,843					
20,5	2,87	1,22					
24,5	3,19	1,55					
30,5	3,34	1,77					
43,0	3,74	4,21	0,610	0,156	2,02		
54,0	5,61	5,92					
67,0	6,90	6,75	0,725	0,192	3,07		
78,0	10,1	7,77					
91,0	11,5	10,4	0,949	0,265	4,65		
101,5	13,0	13,6					
117,0	15,0	15,9					
163,0	17,8	18,7	2,14	0,504	7,01		
187,0	19,0	20,3	2,33	0,531	6,41		
198,0	20,0	21,1					
236,0	20,5	18,1	2,51	0,681	6,45		
259,0	20,4	15,6	2,66	0,734	4,88		
331,0	18,4	14,5	2,91	0,785	4,77	49,2	
							I _F = 123,57 μE m ⁻² s ⁻¹

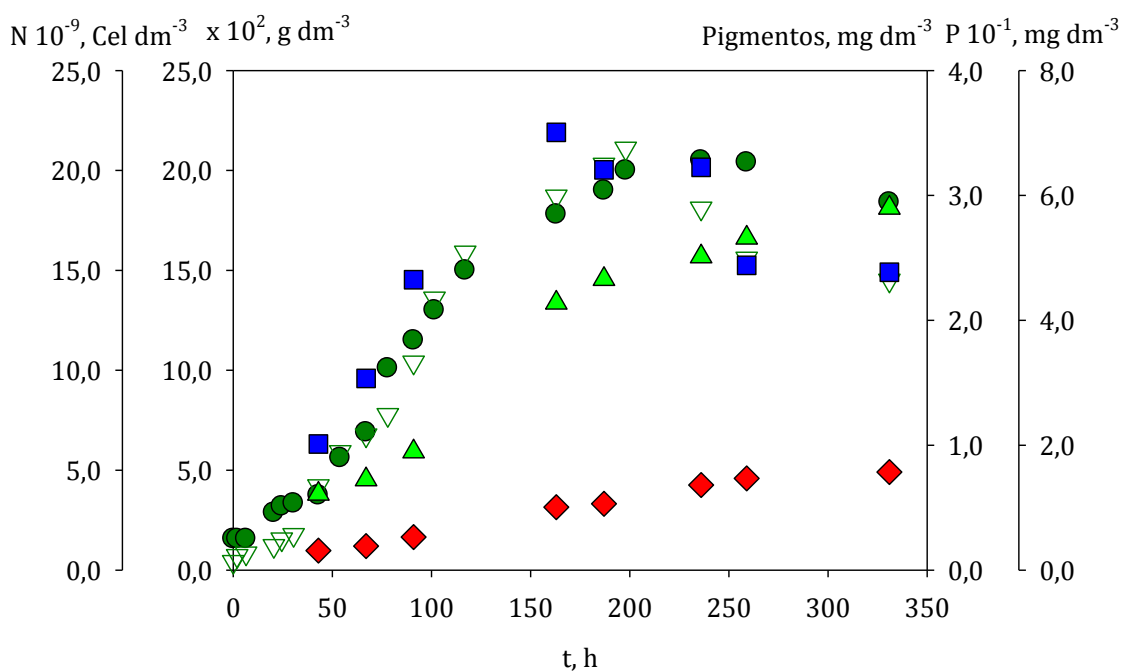


Figura D.19 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 7 ALA.

Tabla D.56. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 7 ALA

% N	% C	% H	% S	% O
7,13	42,6	6,81	0,881	42,6

Tabla D.57. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 7 ALA

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,540	18:2n3	0,155
14:1	0,765	18:2n6	17,0
16:0	19,4	20:0	0,0768
16:1	3,13	18:3n3	25,7
16:2	5,03	22:0	0,226
16:3	0,630	20:5n3	0,245
18:0	7,05	N.I.	11,8
18:1	8,25		

Tabla D.58. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites

Expt: 8 ALA

MEDIO = 30 % ALA + UP

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 141,73 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	
t h	x 10 ² g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	3,00	0,980					
2,5	3,00	1,11					
6,0	3,00	1,04					
18,5	3,48	1,78					
23,5	4,83	2,23					
29,5	7,26	2,35					
42,0	8,34	5,22					
53,0	10,0	6,34					
68,5	11,0	6,83	1,18	0,339	4,64		
115,5	16,7	11,9	2,09	0,506	5,60		
125,5	18,9	13,7					
139,0	19,8	16,1	2,83	0,599	6,01		
149,0	20,4	17,8					
162,5	21,5	18,9	3,27	0,755	5,54		
186,5	23,7	20,9	3,66	0,935	5,48		
210,0	25,2	23,2	4,33	1,14	5,17		
235,5	27,5	22,2	4,73	1,16	5,06		
282,5	29,4	19,9	4,78	1,16	5,01		
306,5	30,3	18,2	4,52	1,12	4,96		
331,0	29,6	14,9	4,18	1,02	4,80	48,7	
							I _F = 123,12 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

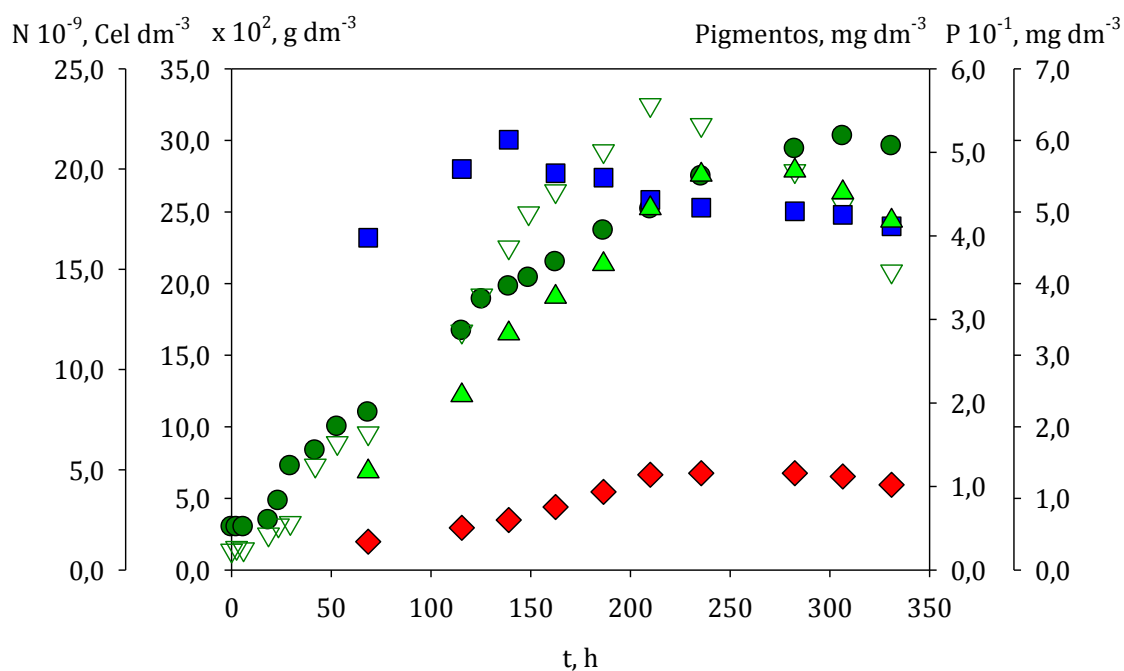


Figura D.20 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 8 ALA.

Tabla D.59. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 8 ALA

% N	% C	% H	% S	% O
7,07	41,8	6,87	0,868	43,4

Tabla D.60. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 8 ALA

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,526	18:2n3	0,102
14:1	0,685	18:2n6	15,7
16:0	18,5	20:0	0,107
16:1	3,08	18:3n3	23,1
16:2	5,00	20:2n6	0,240
16:3	0,489	22:0	0,257
18:0	7,33	20:5n3	0,887
18:1	7,47	N.I.	16,5

Tabla D.61. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites

Expt: 9 ALA

MEDIO = 50 % ALA + UP

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 139,63 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ² g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	2,84	0,660					
2,5	3,30	0,970					
6,0	3,39	1,08					
18,5	4,38	1,34					
23,5	5,50	1,57					
29,5	7,72	1,80					
42,0	8,69	3,55					
53,0	9,20	4,81					
68,5	10,1	7,83	1,13	0,306	5,64		
115,5	16,5	13,0	1,39	0,333	6,42		
125,5	16,9	15,7					
139,0	17,9	17,6	2,44	0,544	6,32		
149,0	18,7	19,0					
162,5	19,3	15,7	2,94	0,710	5,48		
186,5	18,9	7,92	2,67	0,731	5,01		
210,0	18,0	7,61	2,45	0,613	4,91	48,4	
							I _F = 127,92 μE m ⁻² s ⁻¹

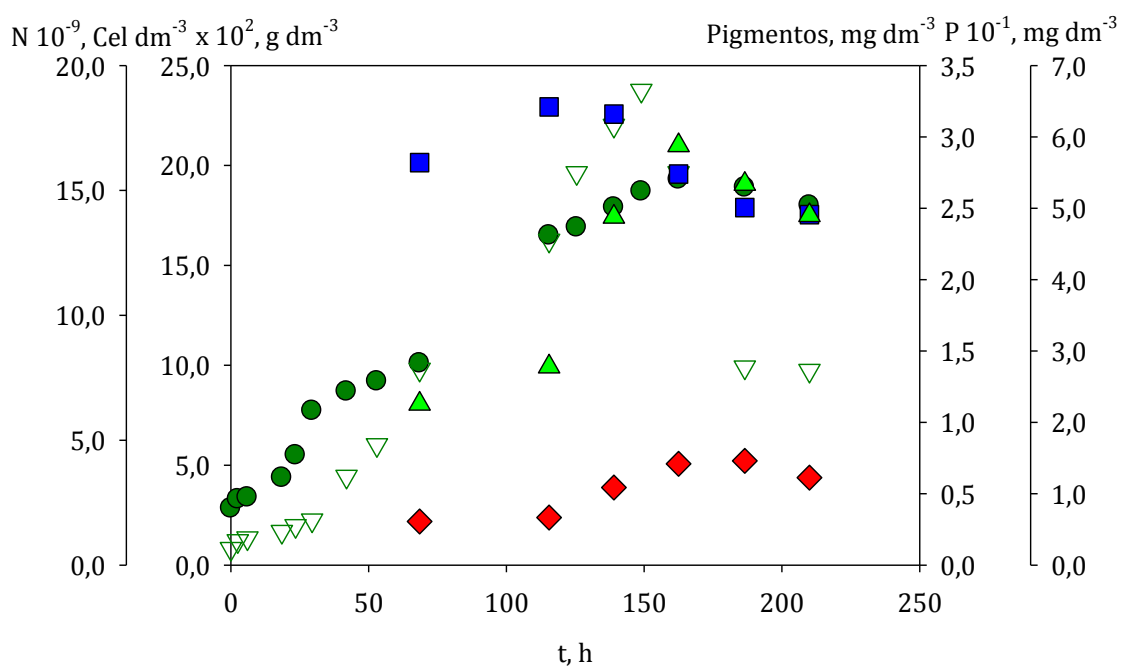


Figura D.21 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 9 ALA.

Tabla D.62. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 9 ALA

% N	% C	% H	% S	% O
7,26	44,1	6,65	0,767	41,2

Tabla D.63. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 9 ALA

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,709	18:1	12,3
14:1	1,21	18:2n6	17,0
16:0	19,3	20:0	0,489
16:1	5,52	18:3n3	18,2
16:2	6,52	22:0	0,740
16:3	2,47	N.I.	9,24
18:0	6,30		

Tabla D.64. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites

Expt: 10 ALA

MEDIO = 50 % ALA + UP

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 139,63 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ² g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	3,10	0,600					
2,5	3,43	0,832					
6,0	3,69	1,00					
18,5	3,92	1,24					
23,5	4,88	1,50					
29,5	6,16	1,67					
42,0	7,27	3,10					
53,0	8,53	4,55					
68,5	9,89	6,76	1,15	0,306	5,64		
115,5	13,7	11,2	1,38	0,393	6,42		
125,5	15,4	14,1					
139,0	17,3	17,6	2,34	0,544	6,32		
149,0	19,6	18,6					
162,5	19,9	16,3	3,14	0,710	5,48		
186,5	20,1	13,0	2,77	0,731	5,01		
210,0	20,0	12,3	2,45	0,613	4,91	48,9	
							I _F = 127,37 μE m ⁻² s ⁻¹

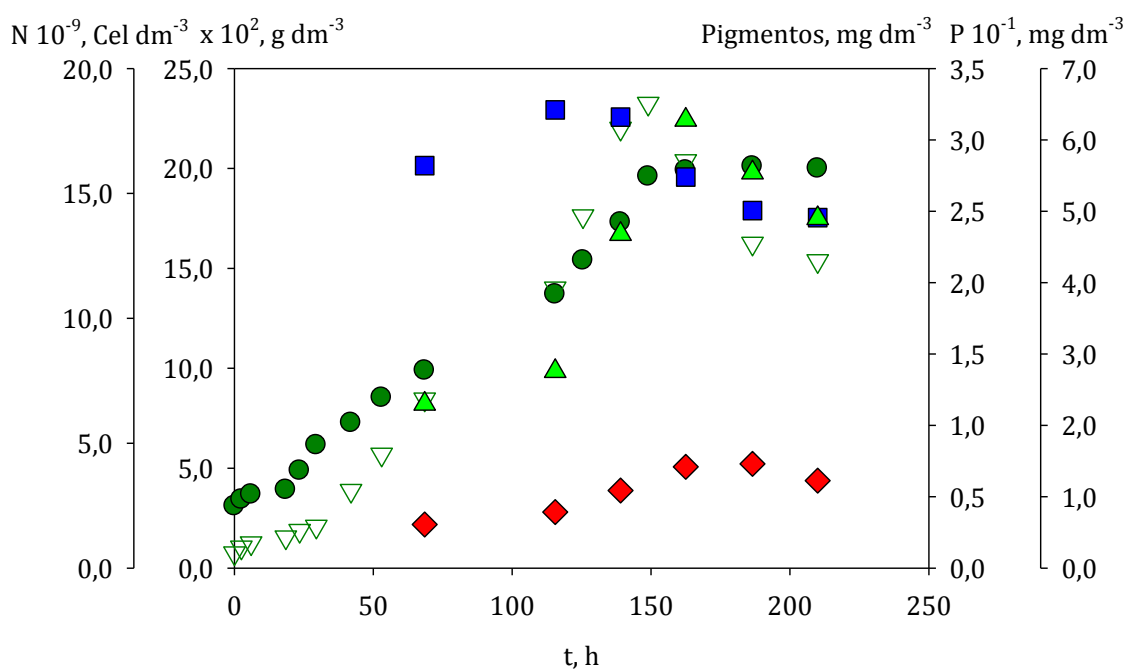


Figura D.22 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 10 ALA.

Tabla D.65. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 10 ALA

% N	% C	% H	% S	% O
7,34	44,0	6,57	0,779	41,3

Tabla D.66. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 10 ALA

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,817	18:0	6,66
14:1	1,41	18:1	12,5
16:0	20,9	18:2n6	18,4
16:1	6,04	18:3n3	18,7
16:2	5,80	N.I.	6,41
16:3	2,37		

Tabla D.67. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites

Expt: 11 ALA

MEDIO = 100 % ALA

Q = 1 v/v/min		pH = 8,00		T = 25 °C		I ₀ = 140,57 µE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ² g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	2,87	0,980					
2,5	3,63	1,07					
6,0	3,88	1,10					
18,5	4,76	1,94					
23,5	5,72	2,13					
29,5	6,01	2,35					
42,0	6,59	3,28					
53,0	7,20	3,95					
68,5	8,70	6,30	0,706	0,114	4,95		
115,5	13,2	10,3	0,795	0,146	5,92		
125,5	13,7	11,9					
139,0	14,1	13,5	1,23	0,355	6,06		
149,0	14,2	16,5					
162,5	14,3	13,7	2,17	0,589	5,65		
186,5	14,5	12,2	1,75	0,473	2,42		
210,0	14,1	8,07	1,65	0,362	2,34	49,8	
							I _F = 118,52 µE m ⁻² s ⁻¹

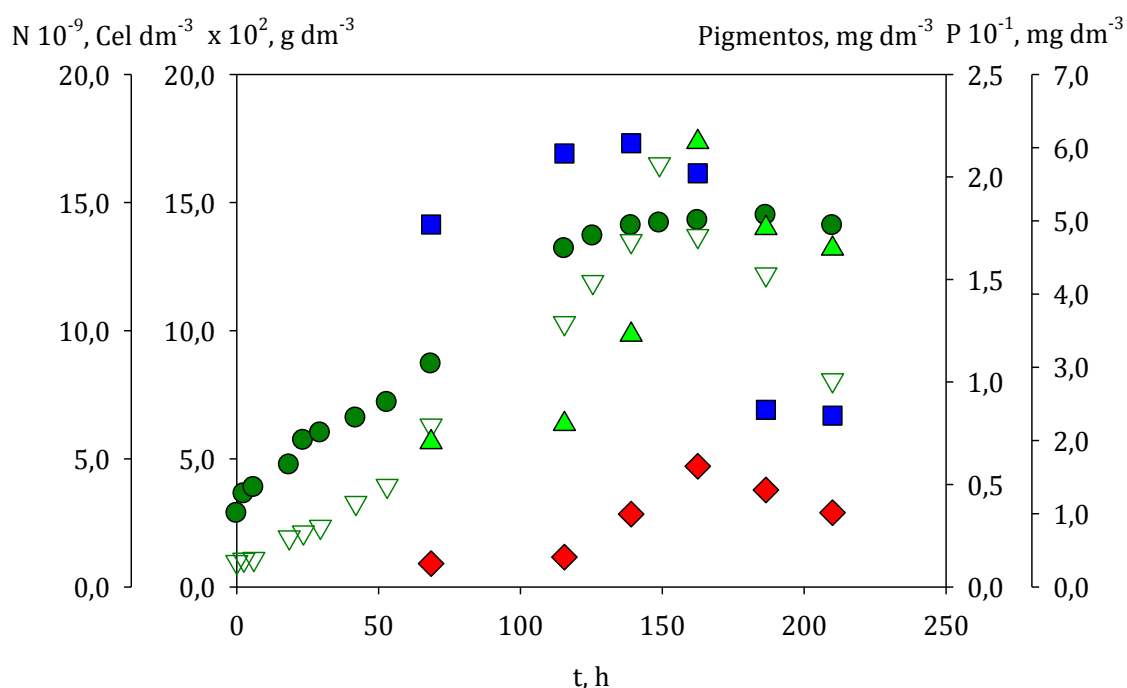


Figura D.23 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 11 ALA.

Tabla D.68. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 11 ALA

% N	% C	% H	% S	% O
7,00	40,2	6,32	0,723	45,8

Tabla D.69. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 11 ALA

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,729	18:1	9,53
14:1	1,17	18:2n3	0,274
16:0	19,3	18:2n6	16,2
16:1	6,01	20:0	0,642
16:2	5,70	18:3n3	19,9
16:3	0,357	20:1n9	0,120
18:0	6,60	22:0	0,635
		N.I.	12,8

Tabla D.70. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites

Expt: 12 ALA

MEDIO = 100 % ALA

Q = 1 v/v/min		pH = 8,00		T = 25 °C		I ₀ = 139,63 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ² g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	4,43	1,52					
2,0	4,46	1,58					
5,5	5,20	2,39					
18,5	5,62	2,42					
23,0	6,71	2,61					
30,0	7,17	2,73					
43,0	8,01	6,64	1,16	0,272	3,87		
53,5	10,5	7,81					
67,0	12,8	8,43	1,37	0,306	4,50		
77,5	14,7	9,91					
91,0	16,1	11,7	1,53	0,376	5,55		
115,0	17,8	14,3			5,84		
164,0	20,3	15,8	2,72	0,604	6,34		
187,5	20,0	15,1	2,70	0,661	6,06		
236,0	19,8	12,4	2,61	0,667	5,59	50,2	
							I _F = 120,43 μE m ⁻² s ⁻¹

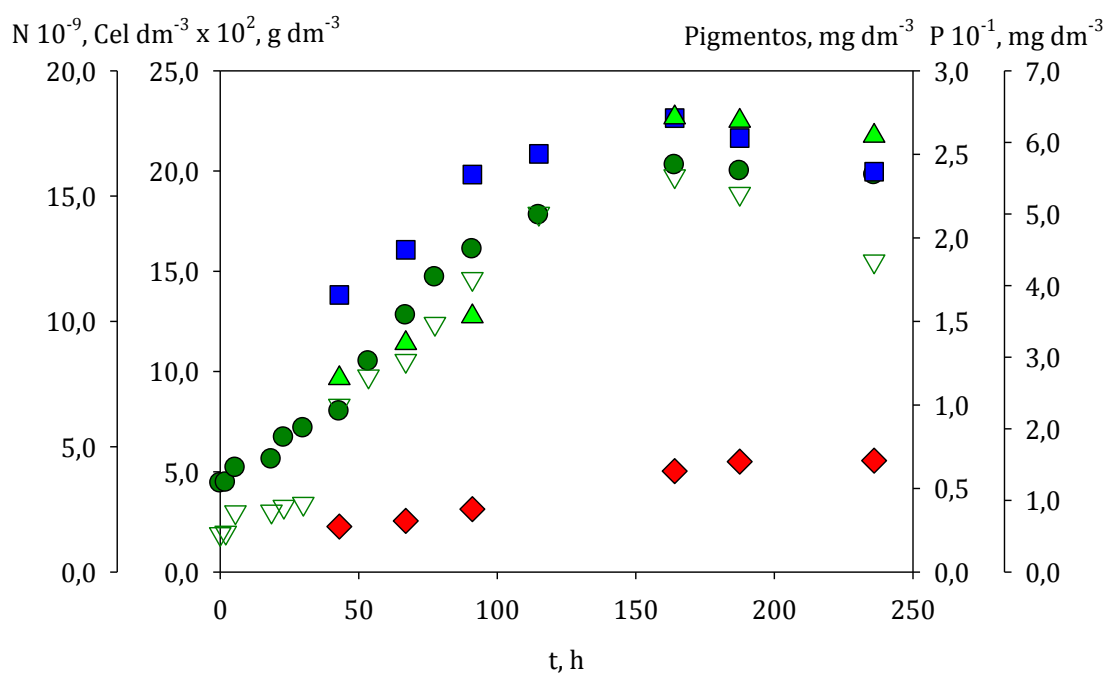


Figura D.24 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 12 ALA.

Tabla D.71. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 12 ALA

% N	% C	% H	% S	% O
7,02	40,1	6,36	0,768	45,8

Tabla D.72. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 12 ALA

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,672	18:1	9,43
14:1	1,23	18:2n3	0,263
16:0	19,9	18:2n6	16,3
16:1	6,13	20:0	0,617
16:2	5,91	18:3n3	20,4
16:3	0,354	22:0	0,604
18:0	6,54	N.I.	11,7

Tabla D.73. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas y aguas residuales urbanas

Expt: 1 ALFRU

MEDIO = 50 % ALF + RU

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C	I ₀ = 141,73 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ³ g dm ⁻³	N 10 ⁻¹⁰ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %
0,0	0,446	0,188				
3,0	0,495	0,202				
6,0	0,566	0,227				
19,5	0,772	0,275				
25,0	1,01	0,307				
30,0	1,26	0,353				
43,5	1,85	1,03	2,36	0,484	7,85	
54,0	2,96	1,31				
68,0	3,35	1,68	4,45	0,985	13,7	
78,0	3,80	3,05				
91,5	4,60	3,96	6,64	1,61	18,6	
102,0	5,12	4,23				
117,0	5,53	5,09	8,77	2,13	22,1	
164,0	6,96	6,49	12,2	2,76	26,6	
187,5	7,71	7,79	14,9	3,00	29,2	
210,5	8,25	8,06	15,9	3,28	28,1	
235,0	8,72	9,27	17,3	3,41	29,2	
259,0	8,82	9,77	18,0	3,65	28,3	
285,0	9,74	10,8	18,4	3,89	30,0	
331,0	10,3	10,2	20,2	3,99	27,5	
355,0	10,2	9,41	19,3	4,17	22,4	
379,0	9,86	8,95	18,6	3,86	23,7	41,6
I _F = 119,29 μE m ⁻² s ⁻¹						

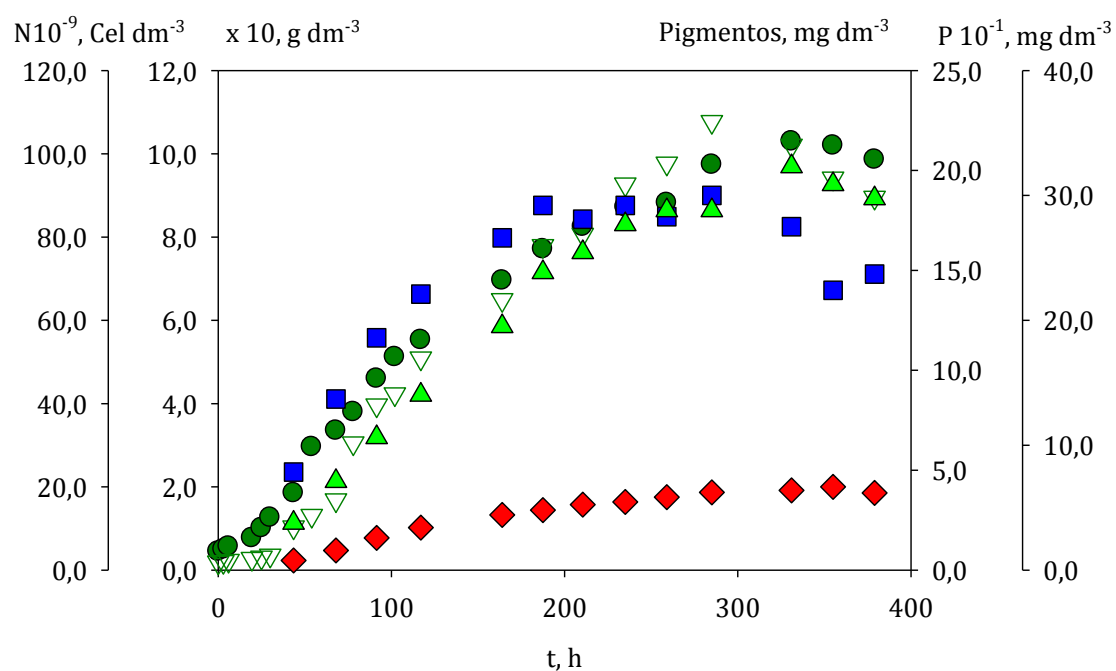


Figura D.25 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 1 ALFRU.

Tabla D.74. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 1 ALFRU.

% N	% C	% H	% S	% O
7,11	46,3	6,84	0,524	39,2

Tabla D.75 Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 1 ALFRU.

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,613	18:1	23,4
14:1	0,816	18:2n6	16,2
16:0	20,1	18:3n3	12,8
16:1	3,99	20:2n6	0,434
16:2	7,43	20:5n3	0,586
16:3	0,573	N.I.	6,80
18:0	6,24		

Tabla D.76. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas y aguas residuales urbanas

Expt: 2 ALFRU

MEDIO = 50 % ALF + RU

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I₀ = 140,57 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	
t	x 10	N 10⁻⁹	CHL 10³	Ca 10³	P 10²	L	
h	g dm⁻³	Cel dm⁻³	g dm⁻³	g dm⁻³	g dm⁻³	%	
0,0	0,466	2,02					
3,0	0,482	2,20					
6,0	0,550	2,31					
19,5	0,813	3,20					
25,0	1,01	3,55					
30,0	1,37	4,08					
43,5	1,93	11,9	2,88	0,607	9,00		
54,0	3,46	12,8					
68,0	3,98	25,8	4,81	1,10	16,9		
78,0	4,47	31,5					
91,5	5,24	61,3	6,15	1,55	20,7		
102,0	5,56	65,0					
117,0	6,09	64,9	8,00	1,95	23,6		
164,0	7,43	78,3	11,6	2,96	27,1		
187,5	8,34	81,0	12,7	3,03	29,2		
210,5	8,77	81,7	13,6	3,16	30,0		
235,0	9,20	85,6	15,3	3,35	29,2		
259,0	9,07	94,4	15,9	3,67	27,5		
285,0	9,62	71,3	17,8	4,04	27,5		
331,0	9,62	65,8	19,4	4,16	27,5		
355,0	9,59	59,5	16,1	3,76	26,6		
379,0	9,18	54,4	15,1	3,56	21,2	40,9	
							I_f = 113,44 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

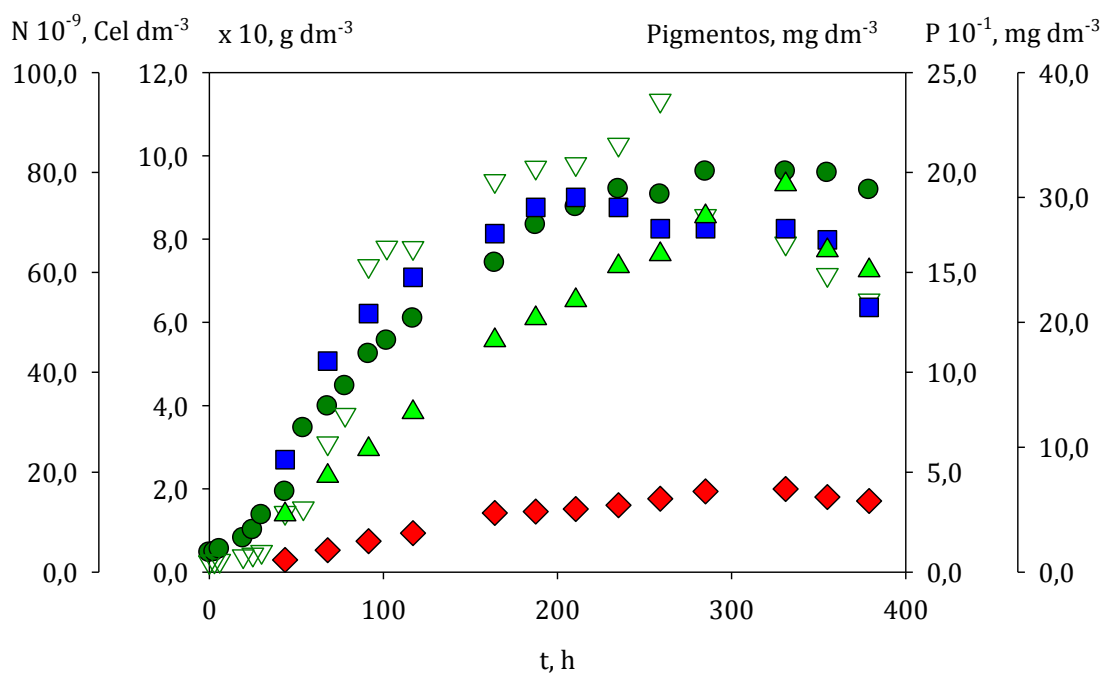


Figura D.26 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 2 ALFRU.

Tabla D.77. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 2 ALFRU

% N	% C	% H	% S	% O
7,10	45,3	6,63	0,564	40,4

Tabla D.78. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 2 ALFRU.

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,618	18:0	6,03
14:1	0,829	18:1	22,4
16:0	19,4	18:2n3	0,086
16:1	3,97	18:2n6	16,0
16:2	7,00	18:3n3	16,5
16:3	0,791	N.I.	6,38

Tabla D.79. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites y aguas residuales urbanas

Expt: 1 ALARU

MEDIO = 30 % ALA + RU

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 139,63 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	
t h	x 10 ³ g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	0,441	1,84					
3,0	0,493	2,02					
5,0	0,528	1,92					
18,0	0,616	2,27					
23,0	0,694	2,26					
28,5	0,858	2,32					
42,5	1,15	6,85	2,10	0,384	5,43		
53,0	1,87	8,76					
66,0	2,26	12,5	2,22	0,449	9,81		
76,5	2,40	15,8					
91,0	2,54	16,3			10,2		
138,0	2,49	16,7	4,03	0,909	9,54		
163,0	2,39	15,8	4,21	0,929	8,13		
186,0	2,33	14,3	4,36	0,898	6,77		
210,0	2,23	12,8	4,36	0,880	5,30	43,4	
							I _F = 122,11 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

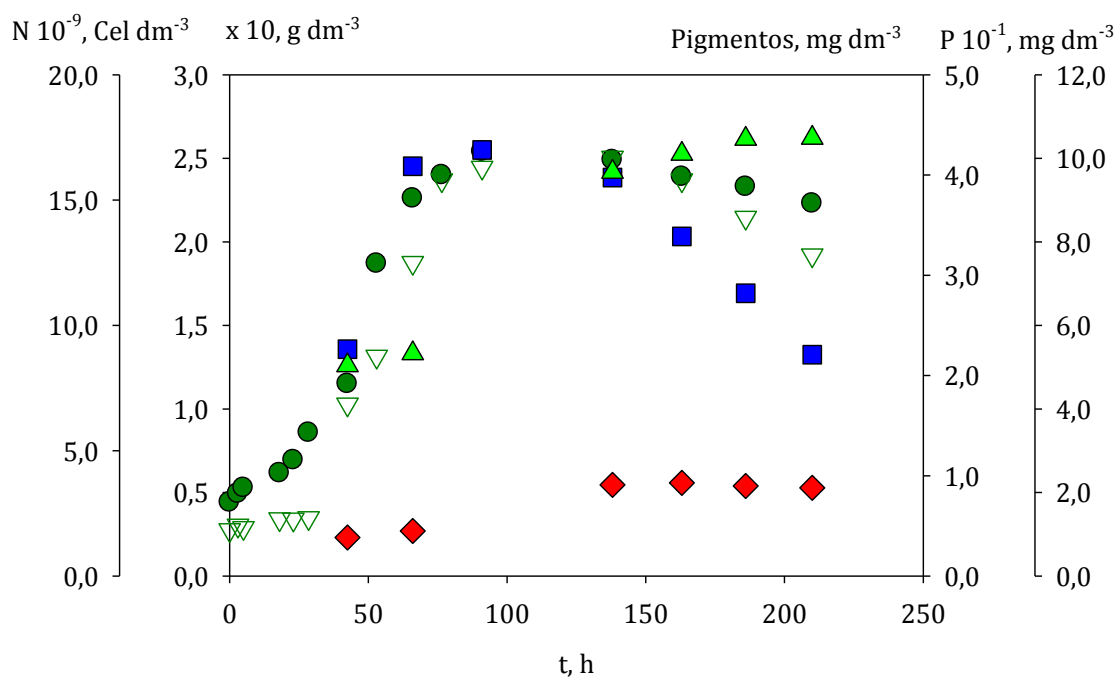


Figura D.27 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 1 ALARU.

Tabla D.80. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 1 ALARU

% N	% C	% H	% S	% O
7,50	46,4	6,84	0,486	38,8

Tabla D.81. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 1 ALARU

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,520	18:2n3	0,0876
14:1	1,02	18:2n6	15,5
16:0	21,0	20:0	0,120
16:1	5,05	18:3n3	20,6
16:2	3,53	22:0	0,390
16:3	0,490	20:5n3	0,260
18:0	7,40	N.I.	5,70
18:1	18,3		

Tabla D.82. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceites y aguas residuales urbanas

Expt: 2 ALARU

MEDIO = 30 % ALA + RU

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C	I₀ = 140,57 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	
t h	x 10 g dm⁻³	N 10⁻⁹ Cel dm⁻³	CHL 10³ g dm⁻³	Ca 10³ g dm⁻³	P 10² g dm⁻³	L %
0,0	0,492	1,96				
3,0	0,508	2,04				
5,0	0,530	1,96				
18,0	0,623	2,02				
23,0	0,728	2,34				
28,5	0,896	2,43				
42,5	1,34	9,10	2,18	0,445	5,48	
53,0	2,09	11,2				
66,0	2,62	14,3	3,59	0,683	9,95	
76,5	2,78	16,9				
91,0	3,03	19,0			10,9	
138,0	3,13	27,9	6,22	1,35	10,0	
163,0	3,23	21,0	6,23	1,40	8,91	
186,0	3,18	19,5	6,18	1,38	8,49	
210,0	3,16	17,7	4,39	1,20	7,86	44,1
						I_F = 121,75 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

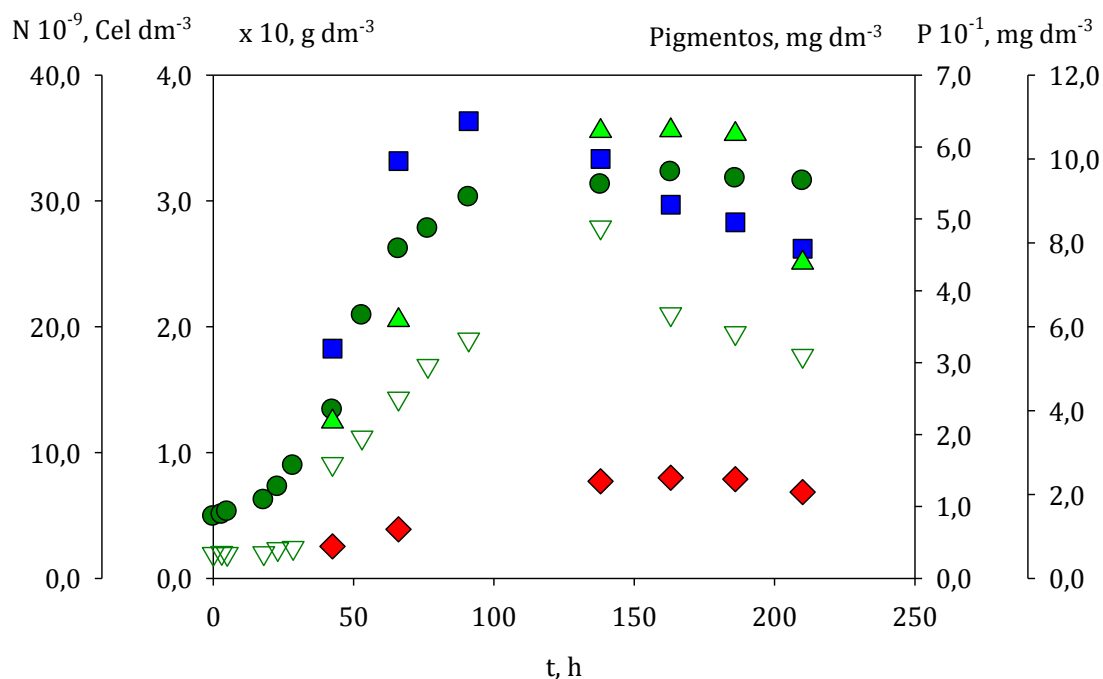


Figura D.28 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 2 ALARU.

Tabla D.83. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 2 ALARU

% N	% C	% H	% S	% O
7,42	47,1	6,92	0,319	38,3

Tabla D.84. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 2 ALARU

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,519	18:2n6	15,5
14:1	1,01	20:0	0,130
16:0	21,1	18:3n3	20,6
16:1	5,13	20:2n6	0,374
16:2	4,21	22:0	0,464
16:3	0,459	20:5n3	0,325
18:0	5,79	22:5n3	0,215
18:1	18,2	N.I.	5,90
18:2n3	0,0871		

Tabla D.85. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos

realizados usando aguas de lavado de aceitunas, aguas de lavado de aceites y aguas residuales urbanas

Expt: 1 ALFARU

MEDIO = 15 % ALF + 30 % ALA + RU

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 140,57 µE m ⁻² s ⁻¹	
t	x 10	N 10 ⁻⁹	CHL 10 ³	Ca 10 ³	P 10 ²	L	
h	g dm ⁻³	Cel dm ⁻³	g dm ⁻³	g dm ⁻³	g dm ⁻³	%	
0,0	0,357	1,34					
2,0	0,419	1,62					
6,0	0,484	1,78					
8,0	0,503	1,94					
20,5	0,619	2,02					
26,0	0,720	2,09					
31,5	0,866	2,35					
45,0	1,34	5,94	1,88	0,426	6,14		
55,0	2,22	7,70					
68,0	2,67	9,24	3,69	0,684	11,4		
79,0	3,23	15,2					
93,0	3,59	18,5	5,88	1,15	12,5		
118,5	4,12	34,8	7,79	1,46	12,9		
164,5	5,39	43,5	10,5	2,30	15,7		
189,5	6,19	51,7	11,0	2,32	18,4		
213,5	6,81	59,1	12,5	2,70	18,8		
240,0	7,15	65,1	13,0	2,91	18,8		
261,0	7,45	73,0	14,5	3,09	19,0		
286,5	8,13	76,1	14,5	3,18	18,8		
333,0	8,36	72,8	14,8	3,24	19,0		
357,0	8,46	70,1	15,5	3,34	19,0		
382,5	8,32	60,2	14,3	3,43	16,7		
406,0	8,32	57,7	13,3	3,20	16,3	45,5	
						I _F = 112,97 µE m ⁻² s ⁻¹	

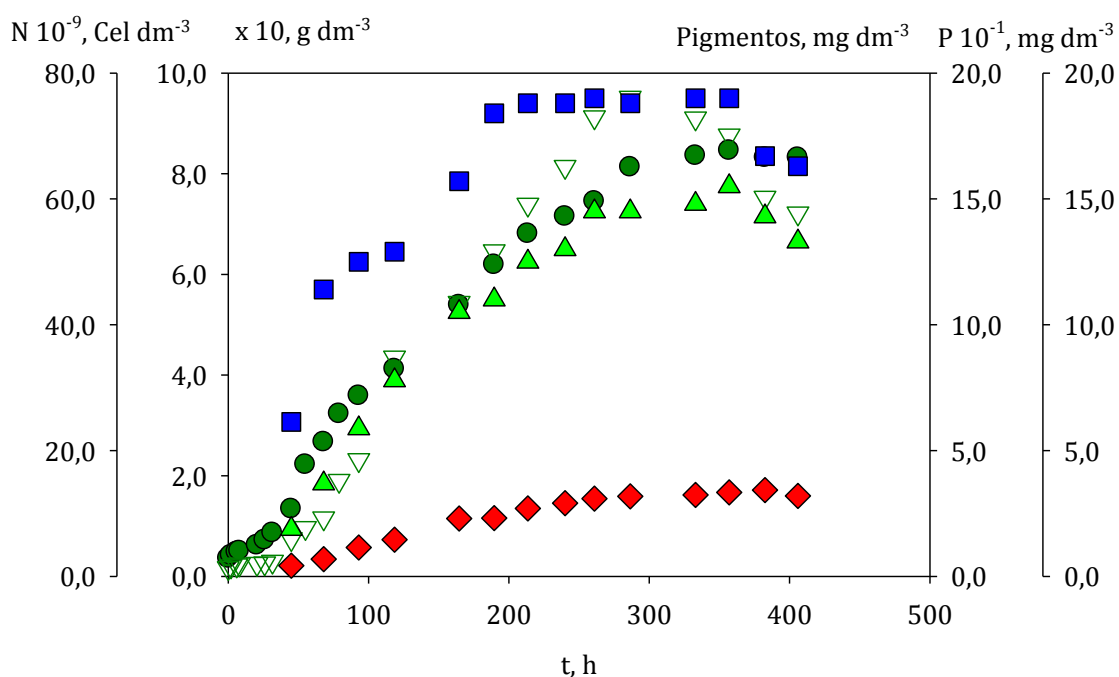


Figura D.29 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 1 ALFARU.

Tabla D.86. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 1 ALFARU

% N	% C	% H	% S	% O
6,82	45,7	6,75	0,407	40,3

Tabla D.87. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 1 ALFARU

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,619	18:2n3	0,0987
14:1	0,738	18:2n6	21,6
16:0	18,1	20:0	0,0857
16:1	3,87	18:3n3	21,2
16:2	7,20	22:0	0,314
16:3	0,610	20:5n3	0,374
18:0	1,51	22:5n3	0,221
18:1	18,2	N.I.	5,30

Tabla D.88. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivos realizados usando aguas de lavado de aceitunas, aguas de lavado de aceites y aguas residuales urbanas

Expt: 2 ALFARU

MEDIO = 15 % ALF + 30 % ALA + RU

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 141,73 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ³ g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	0,344	1,52					
2,0	0,399	1,62					
6,0	0,464	1,86					
8,0	0,513	1,96					
20,5	0,678	2,11					
26,0	0,754	2,18					
31,0	0,997	2,35					
45,0	1,37	10,2	2,01	0,504	6,03		
55,0	2,41	13,0					
68,0	2,83	14,9	4,00	0,839	12,3		
79,0	3,18	17,4					
93,0	3,89	18,9	4,86	1,16	16,3		
118,5	4,63	34,3	7,28	1,65	19,0		
164,5	5,97	41,2	9,48	2,22	22,8		
189,5	7,11	55,2	10,4	2,55	27,1		
213,5	7,45	62,5	12,1	2,90	28,3		
240,0	8,02	67,8	13,3	2,95	22,0		
261,0	8,16	71,0	14,2	3,21	20,5		
286,5	8,25	76,2	14,8	3,18	19,8		
333,0	8,62	72,9	15,2	3,44	20,5		
357,0	8,74	70,0	15,4	3,56	20,0		
382,5	8,77	66,5	14,9	3,39	18,8		
406,0	8,62	62,5	14,3	3,27	17,9	46,1	
							I _F = 112,82 μE m ⁻² s ⁻¹

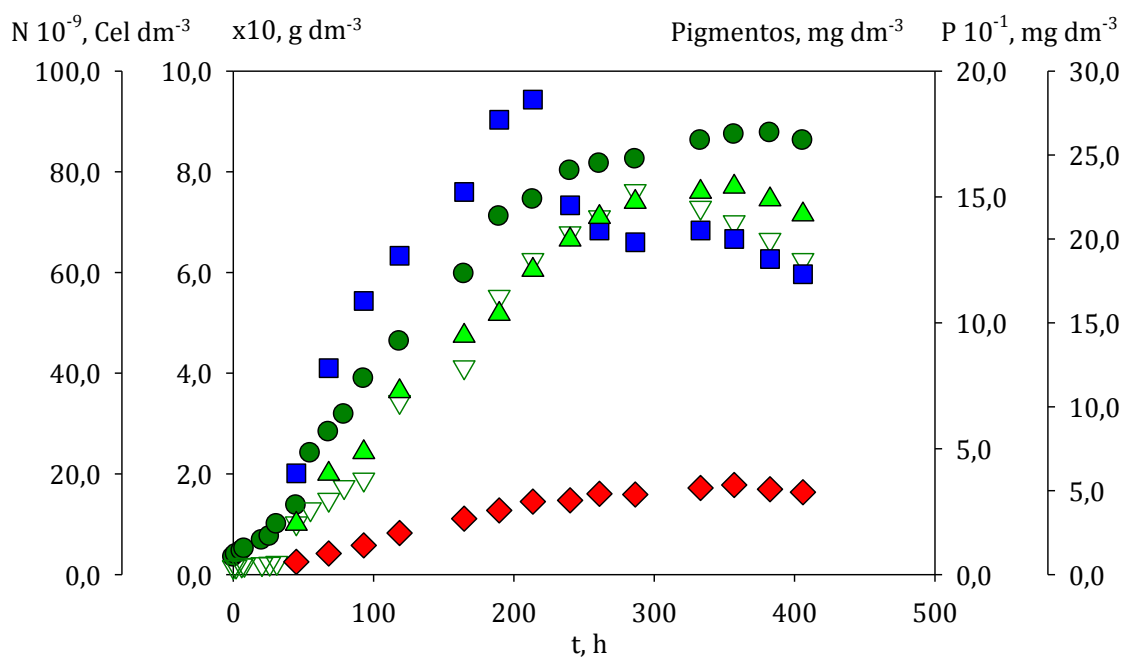


Figura D.30 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▼) en función del tiempo en el Exp. 2 ALFARU.

Tabla D.89. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 2 ALFARU

% N	% C	% H	% S	% O
6,77	45,3	6,64	0,278	41,0

Tabla D.90. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 2 ALFARU

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,563	18:2n6	17,1
14:1	0,717	20:0	0,0908
16:0	17,6	18:3n3	15,2
16:1	3,74	18:4n3	0,127
16:2	7,17	20:2n6	0,499
16:3	0,519	22:0	0,353
18:0	6,19	20:5n3	0,278
18:1	26,1	22:5n3	0,232
18:2n3	0,0865	N.I.	5,40

Tabla D.91. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivo realizado usando aguas de lavado de aceitunas, aguas de lavado de aceites y aguas residuales urbanas

Expt: 3 ALFARU

MEDIO = 20 % ALF + 30 % ALA + RU

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 139,63 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	
t h	x 10 g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	0,479	2,44					
3,0	0,521	2,48					
7,5	0,654	2,57					
21,0	0,786	3,80					
26,5	1,01	4,39					
30,5	1,35	5,88					
45,5	1,84	10,7	2,77	0,577	9,90		
54,5	2,17	13,0					
69,0	2,42	14,7	3,30	0,752	10,8		
78,5	2,55	15,4					
93,0	2,76	16,8	3,62	0,808	11,7		
102,5	3,03	20,3					
118,5	3,31	21,0	4,20	0,929	13,7		
169,0	4,14	24,7	4,98	1,18	15,2		
189,5	4,64	31,6	6,72	1,52	16,0		
213,5	5,16	36,4	6,57	1,51	16,2		
237,5	5,70	39,3	7,29	1,71	16,9		
261,0	6,06	44,8	11,1	2,46	17,7		
286,0	6,34	46,0	10,4	2,40	15,5		
333,0	6,15	47,2	9,71	2,29	12,8	45,8	
							I _F = 115,11 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

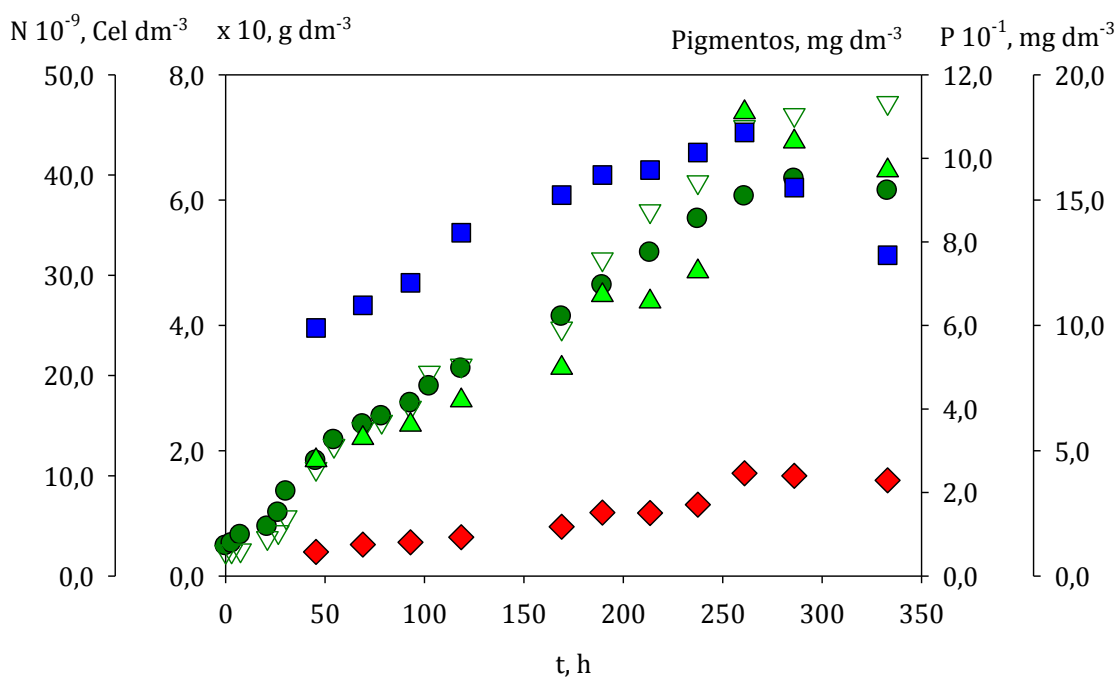


Figura D.31 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 3 ALFARU.

Tabla D.92. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 3 ALFARU

% N	% C	% H	% S	% O
6,80	46,1	6,80	0,476	39,9

Tabla D.93. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 3 ALFARU

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,418	18:2n6	16,8
14:1	0,713	20:0	0,254
16:0	17,8	18:3n3	16,1
16:1	3,52	22:0	0,346
16:2	6,94	20:5n3	0,266
16:3	0,532	22:5n3	0,180
18:0	6,38	N.I.	6,65
18:1	23,1		

Tabla D.94. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivo realizado usando aguas de lavado de aceitunas, aguas de lavado de aceites y aguas residuales urbanas

Expt: 4 ALFARU

MEDIO = 20 % ALF + 30 % ALA + RU

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 140,57 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ³ g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	0,476	2,46					
3,0	0,518	2,77					
7,5	0,605	3,23					
21,0	0,799	3,69					
26,5	0,946	4,24					
30,5	1,49	5,88					
45,5	1,98	12,4	2,79	0,582	9,12		
54,5	2,77	17,6					
69,0	2,99	20,0	4,11	0,915	12,8		
78,5	3,56	21,4					
93,0	3,77	22,9	4,86	1,12	15,0		
102,5	4,32	24,4					
118,5	4,78	32,9	6,48	1,39	15,5		
169,0	5,57	45,5	7,15	1,58	16,9		
189,5	5,92	48,6	8,09	1,83	17,0		
213,5	6,43	49,9	9,22	2,19	17,7		
237,5	7,09	54,1	11,0	2,50	16,2		
261,0	7,34	52,3	11,4	2,73	15,9		
286,0	7,58	50,6	12,6	2,87	14,7		
333,0	7,50	48,9	12,6	2,85	14,0	46,2	
							I _F = 116,56 μE m ⁻² s ⁻¹

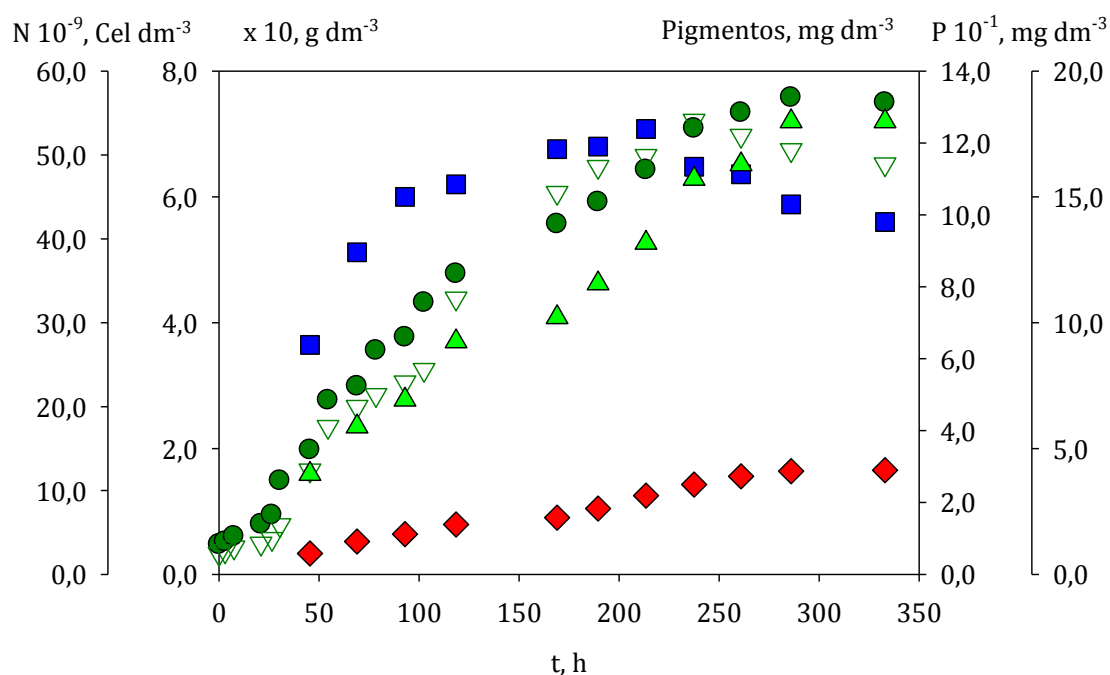


Figura D.32 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 4 ALFARU.

Tabla D.95. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 4 ALFARU

% N	% C	% H	% S	% O
6,86	45,5	6,71	0,452	40,5

Tabla D.96. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 4 ALFARU

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,446	18:2n3	0,0824
14:1	0,701	18:2n6	17,1
16:0	18,0	20:0	0,0950
16:1	3,37	18:3n3	16,9
16:2	6,73	20:2n6	0,407
16:3	0,402	22:0	0,351
18:0	6,31	20:5n3	0,299
18:1	23,3	22:5n3	0,231
		N.I.	8,20

Tabla D.97. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivo realizado usando aguas de lavado de aceitunas

Expt: 1 ALFC

MEDIO = 50 % ALF + UP + 1 % CO₂

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 124,24 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ³ g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	0,224	1,00					
3,0	0,262	1,11					
5,0	0,280	1,22					
21,5	0,347	1,26					
25,0	0,455	1,31					
28,5	0,539	2,30					
43,5	0,797	8,33	1,52	0,349	3,51		
53,0	1,15	22,4					
67,0	1,65	34,1	3,40	0,571	7,23		
76,5	2,26	36,2					
92,5	2,67	37,9	3,91	0,894	9,54		
116,5	3,11	41,4	4,91	1,06	10,8		
166,0	3,11	54,3	5,31	1,33	8,55		
193,0	2,88	55,8	3,90	0,954	7,68		
217,0	2,76	56,4	3,91	0,932	7,09		
241,0	2,64	53,9	3,81	0,908	6,76		
264,0	2,29	50,1	3,62	0,854	5,08	46,9	
							I _F = 113,15 μE m ⁻² s ⁻¹

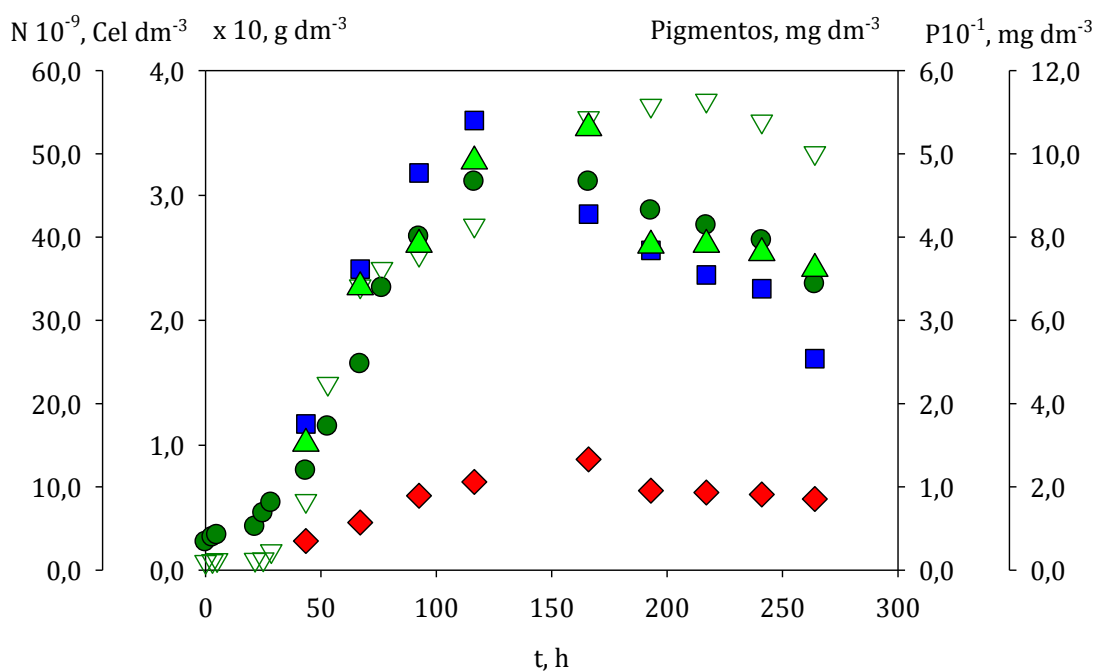


Figura D.33 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 1 ALFC.

Tabla D.98. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 1 ALFC

% N	% C	% H	% S	% O
7,05	45,0	6,67	0,493	40,8

Tabla D.99. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 1 ALFC

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,636	18:2n6	13,6
14:1	0,745	20:0	0,0884
16:0	19,5	18:3n3	17,3
16:1	5,88	20:1n9	0,125
16:2	5,67	22:0	0,858
16:3	0,317	20:5n3	0,591
18:0	7,44	22:5n3	0,208
18:1	20,4	22:6n3	0,378
18:2n3	0,0941	N.I.	6,10

Tabla D.100. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivo realizado usando aguas de lavado de aceitunas

Expt: 2 ALFC

MEDIO = 50 % ALF + UP + 1 % CO₂

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 124,24 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ³ g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	0,182	0,880					
3,0	0,212	1,03					
5,0	0,244	1,18					
21,5	0,301	1,28					
25,0	0,376	1,38					
28,5	0,475	2,26					
43,5	0,640	8,67	1,03	0,271	2,99		
53,0	0,862	22,1					
67,0	1,45	31,9	3,32	0,609	6,12		
76,5	2,37	35,3					
92,5	2,73	37,7	4,12	0,857	10,6		
116,5	2,95	39,6	4,74	0,949	10,8		
166,0	3,08	58,5	4,98	1,22	9,81		
193,0	2,90	56,5	3,58	1,09	8,03		
217,0	2,61	54,9	3,60	0,965	8,25		
241,0	2,50	52,2	3,31	0,908	7,08		
264,0	2,22	46,4	3,21	0,727	6,03	45,6	
							I _F = 115,95 μE m ⁻² s ⁻¹

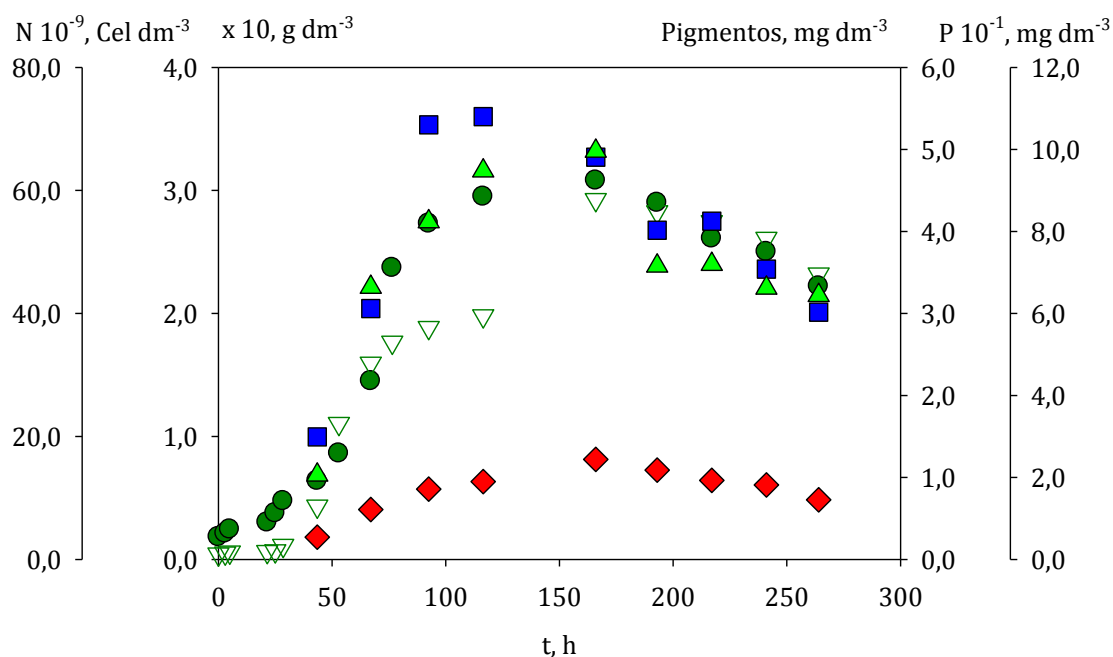


Figura D.34 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 2 ALFC.

Tabla D.101. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 2 ALFC

% N	% C	% H	% S	% O
7,07	45,1	6,67	0,332	40,9

Tabla D.102. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 2 ALFC

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,567	18:3n3	15,1
14:1	0,736	20:1n9	0,169
16:0	19,3	18:4n3	0,130
16:1	5,74	20:2n6	0,198
16:2	5,67	22:0	0,896
16:3	0,345	22:1n9	0,312
18:0	7,00	20:5n3	0,639
18:1	21,6	22:5n3	0,485
18:2n3	0,0950	22:6n3	0,444
18:2n6	13,7	N.I.	6,70
20:0	0,169		

Tabla D.103. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivo realizado usando aguas de lavado de aceitunas

Expt: 3 ALFC

MEDIO = 50 % ALF + UP + 2 % CO₂

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 124,24 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ³ g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	0,254	0,800					
3,0	0,266	1,09					
5,0	0,307	1,22					
21,5	0,359	1,26					
25,0	0,462	1,32					
28,5	0,527	2,32					
43,5	0,895	6,82	1,54	0,355	3,72		
53,0	1,85	34,9					
67,0	2,10	36,4	4,18	0,745	7,08		
76,5	2,41	39,9					
92,5	3,18	41,8	4,66	1,05	10,6		
116,5	3,95	43,4	5,16	1,30	12,9		
166,0	4,75	71,1	6,00	1,58	15,2		
193,0	5,20	75,5	5,82	1,64	15,6		
217,0	5,11	75,8	5,99	1,69	14,2		
241,0	4,90	72,5	5,93	1,67	13,5		
264,0	4,89	66,0	5,08	1,58	13,0	46,7	
							I _F = 118,02 μE m ⁻² s ⁻¹

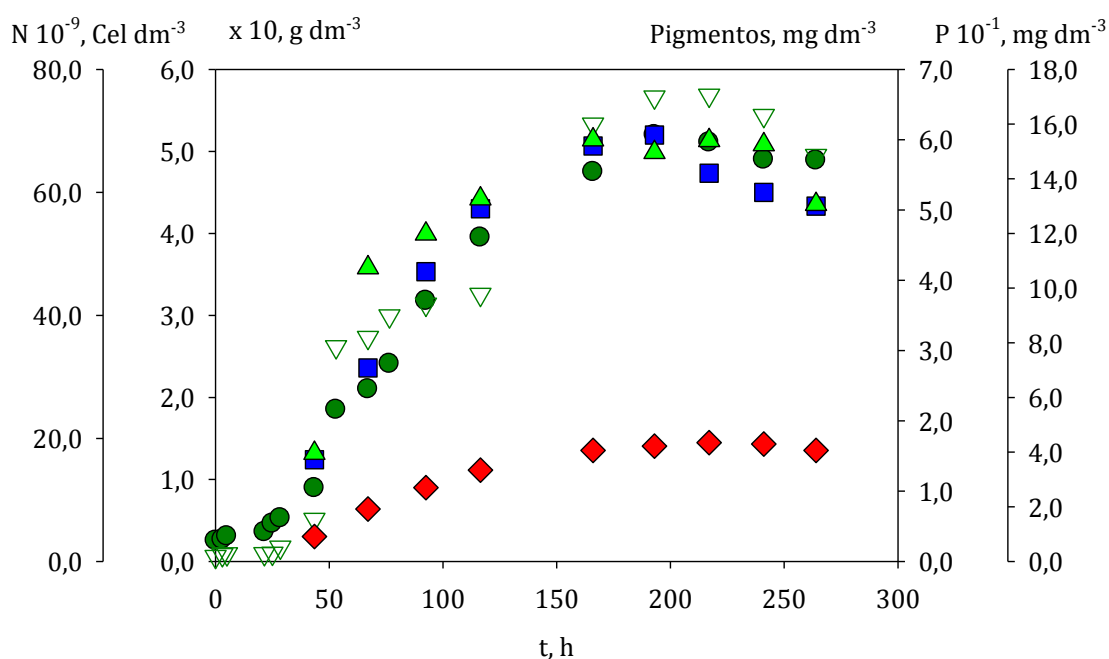


Figura D.35 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 3 ALFC.

Tabla D.104. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 3 ALFC

% N	% C	% H	% S	% O
7,01	44,9	6,60	0,481	41,1

Tabla D.105. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 3 ALFC

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,524	20:0	0,111
14:1	0,482	18:3n3	20,4
16:0	19,1	20:1n9	0,0335
16:1	2,65	18:4n3	0,273
16:2	4,14	20:2n6	0,139
16:3	0,289	22:0	0,365
18:0	7,48	22:1n9	0,145
18:1	21,7	20:5n3	0,352
18:2n3	0,102	22:5n3	0,234
18:2n6	14,2	N.I.	7,21

Tabla D.106. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivo realizado usando aguas de lavado de aceitunas

Expt: 4 ALFC

MEDIO = 50 % ALF + UP + 2 % CO₂

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 124,24 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ³ g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	0,212	0,720					
3,0	0,242	0,812					
5,0	0,266	1,08					
21,5	0,323	1,20					
25,0	0,433	1,27					
28,5	0,497	2,18					
43,5	0,819	6,48	2,16	0,473	3,62		
53,0	1,85	32,0					
67,0	2,04	34,5	4,06	0,628	8,49		
76,5	2,36	38,3					
92,5	2,83	39,3	4,66	0,967	11,6		
116,5	3,78	40,9	5,40	1,19	14,7		
166,0	4,19	67,9	6,25	1,47	15,2		
193,0	4,95	73,4	5,65	1,67	14,2		
217,0	5,11	73,1	5,82	1,55	14,2		
241,0	4,87	70,0	5,64	1,35	12,7		
264,0	4,65	62,4	4,74	1,26	10,1	46,3	
							I _F = 121,38 μE m ⁻² s ⁻¹

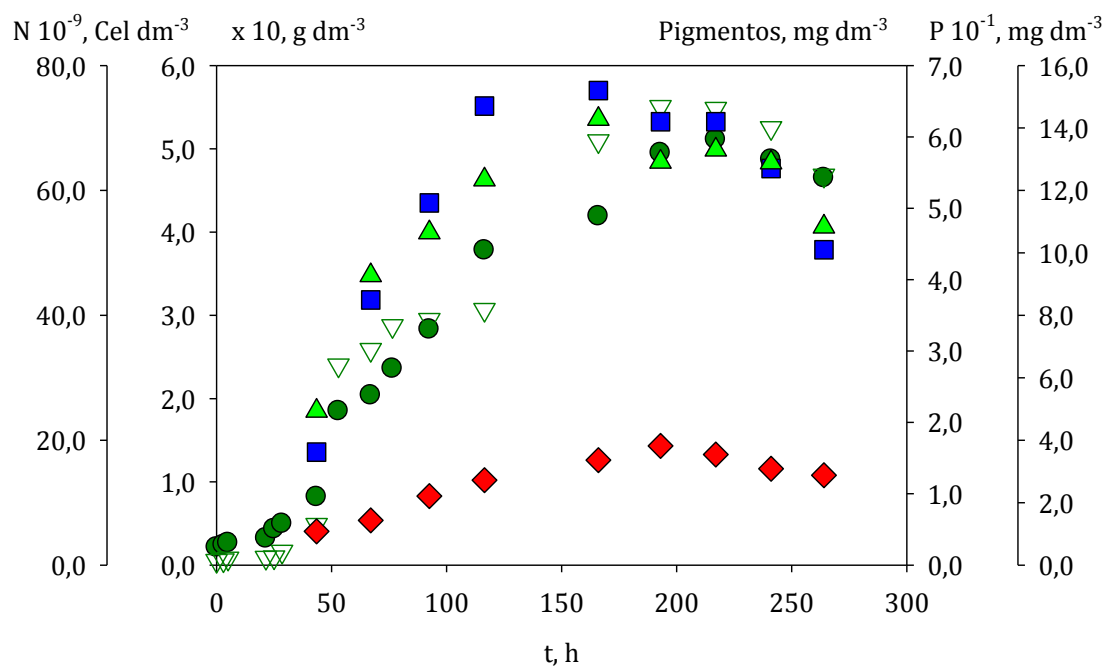


Figura D.36 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 4 ALFC.

Tabla D.107. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 4 ALFC.

% N	% C	% H	% S	% O
7,04	45,0	6,63	0,410	41,0

Tabla D.108. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 4 ALFC

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,508	18:2n6	13,9
14:1	0,446	20:0	0,0951
16:0	17,9	18:3n3	20,5
16:1	2,59	20:1n9	0,157
16:2	3,98	20:2n6	0,287
16:3	0,300	22:0	0,446
18:0	7,74	22:1n9	0,140
18:1	23,6	20:5n3	0,608
18:2n3	0,101	22:5n3	0,145
		N.I.	6,50

Tabla D.109. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivo realizado usando aguas de lavado de aceitunas

Expt: 5 ALFC

MEDIO = 50 % ALF + UP + 5 % CO₂

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 141,73 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 g dm ⁻³	N 10 ⁻¹⁰ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	0,427	0,203					
2,0	0,442	0,220					
15,0	0,605	0,255					
19,0	0,737	0,339					
23,0	0,835	0,422					
38,0	1,07	0,630	3,01	0,548	5,72		
47,5	1,92	1,15					
61,0	2,28	2,25	5,69	0,966	10,2		
72,0	3,35	3,41					
86,5	3,75	4,46	6,34	1,22	12,9		
111,5	4,45	6,36	6,59	1,50	13,1		
158,5	5,89	7,43	7,27	1,56	16,5		
181,0	6,57	9,20	9,40	2,21	15,2		
206,5	7,44	11,1	10,3	2,31	16,7		
228,5	7,98	10,3	10,6	2,62	16,1		
254,5	8,17	9,10	8,45	2,57	17,1		
279,0	8,11	8,29	8,49	2,45	16,7		
326,5	7,84	8,08	8,17	2,29	15,8	45,0	
							I _F = 118,43 μE m ⁻² s ⁻¹

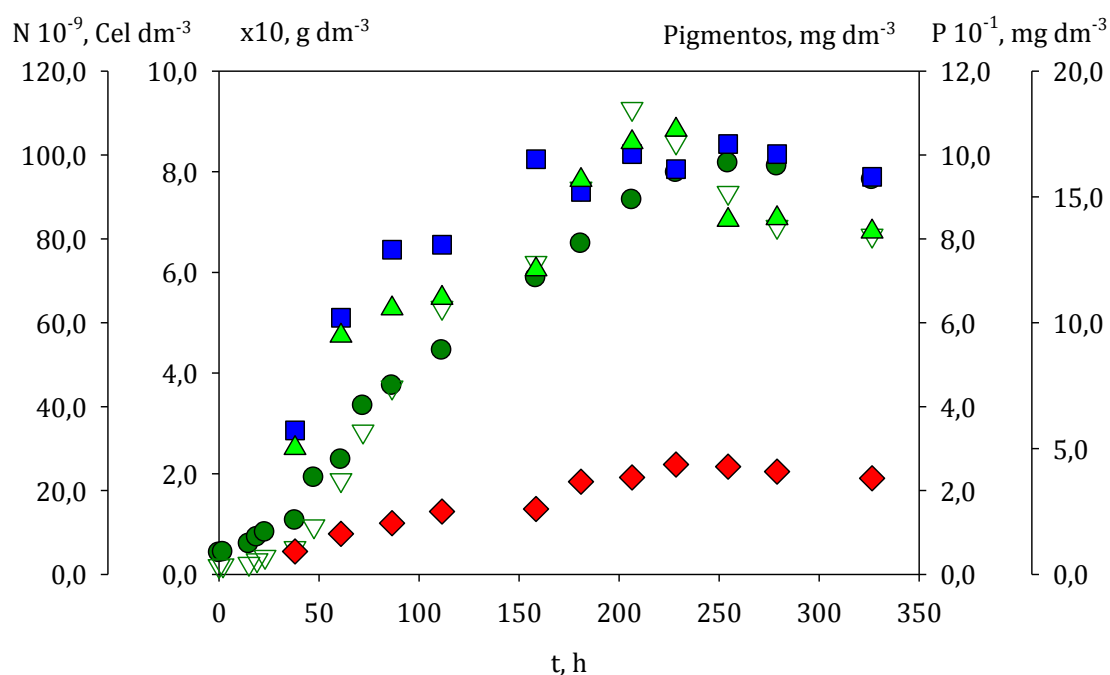


Figura D.37 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 5 ALFC.

Tabla D.110. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 5 ALFC

% N	% C	% H	% S	% O
4,97	47,2	6,92	0,439	40,4

Tabla D.111. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 5 ALFC

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,200	18:2n6	14,2
14:1	0,214	20:0	0,0789
16:0	17,1	18:3n3	20,4
16:1	1,34	18:4n3	0,123
16:2	3,14	20:2n6	0,400
16:3	0,102	22:0	0,957
18:0	7,89	22:1n9	0,228
18:1	25,2	20:5n3	0,550
18:2n3	0,0517	22:5n3	0,228
		N.I.	7,60

Tabla D.112. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivo realizado usando aguas de lavado de aceitunas

Expt: 6 ALFC

MEDIO = 50 % ALF + UP + 5 % CO₂

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0	T = 25 °C		I ₀ = 140,37 µE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ³ g dm ⁻³	N 10 ⁻¹⁰ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %
0,0	0,323	0,242				
2,0	0,388	0,257				
15,0	0,460	0,282				
19,0	0,633	0,363				
23,0	0,779	0,438				
38,0	0,948	0,566	3,56	0,783	4,74	
47,5	2,24	1,33				
61,0	2,51	2,13	6,29	1,16	11,1	
72,0	3,35	3,21				
86,5	3,95	4,60	7,16	1,45	13,7	
111,5	4,87	6,10	6,99	1,61	15,4	
158,5	6,13	6,83	7,55	1,63	19,0	
181,0	6,83	9,37	10,3	2,43	18,2	
206,5	7,70	11,4	11,3	2,52	17,9	
228,5	8,34	10,8	10,4	2,76	18,9	
254,5	8,07	9,76	7,94	2,50	17,1	
279,0	7,81	9,36	7,78	2,31	15,6	
326,5	7,37	8,62	6,39	2,10	14,0	45,3
						I _F = 121,20 µE m ⁻² s ⁻¹

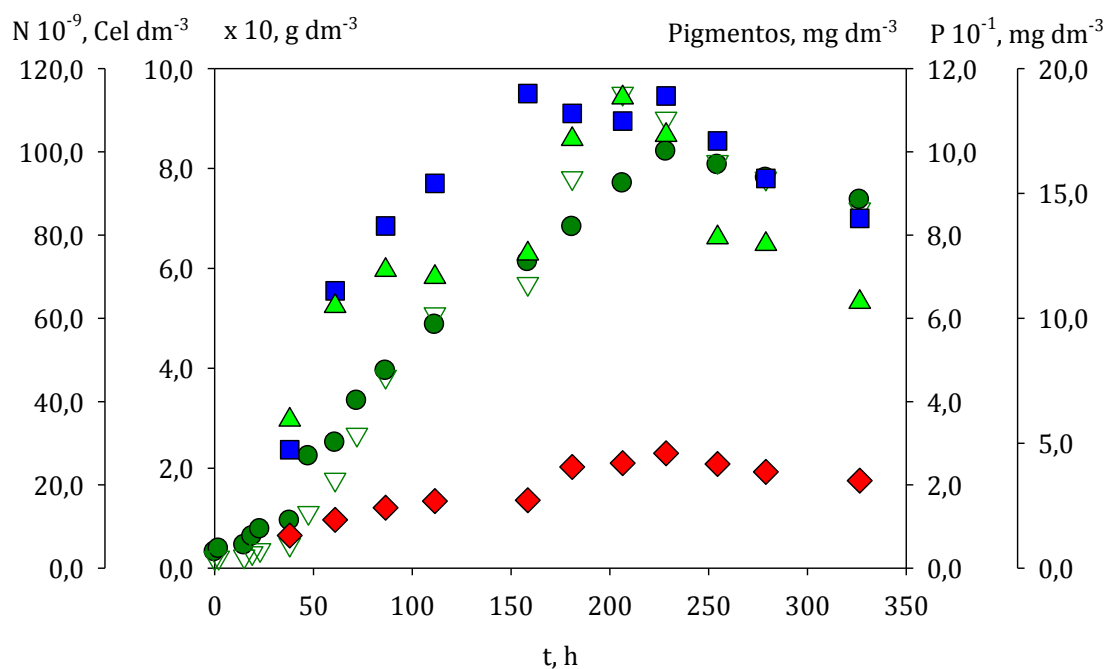


Figura D.38 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 6 ALFC.

Tabla D.113. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 6 ALFC

% N	% C	% H	% S	% O
4,97	47,3	6,89	0,385	40,5

Tabla D.114. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 6 ALFC

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,190	18:2n6	14,0
14:1	0,220	20:0	0,218
16:0	17,1	18:3n3	20,2
16:1	1,30	18:4n3	0,123
16:2	3,07	20:2n6	0,453
16:3	0,108	22:0	0,956
18:0	8,01	22:1n9	0,248
18:1	25,4	20:5n3	0,540
18:2n3	0,0491	22:5n3	0,179
		N.I.	7,64

Tabla D.115. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivo realizado usando aguas de lavado de aceitunas

Expt: 7 ALFC

MEDIO = 50 % ALF + UP + 10 % CO₂

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 141,73 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	0,735	1,64					
2,5	0,783	1,86					
8,0	0,847	2,61					
22,5	0,891	3,10	1,24	0,318	3,77		
27,0	1,16	3,46					
31,5	1,42	3,80					
47,0	1,92	11,5	3,34	0,711	6,24		
55,5	3,50	14,9					
72,5	3,76	19,3	4,77	1,10	12,5		
79,5	4,06	22,0					
95,5	4,59	26,0	6,81	1,36	13,3		
165,5	6,74	49,0	8,70	1,90	20,9		
188,5	7,30	61,2	9,69	2,11	21,2		
213,0	8,61	74,8	10,3	2,55	23,4		
235,5	8,87	77,9	11,0	2,82	19,2		
261,0	9,18	85,6	10,7	3,02	19,4		
286,0	9,36	90,6	9,57	2,55	16,6		
332,5	9,52	86,9	8,84	2,36	16,9		
356,5	9,37	84,0	8,10	2,27	15,0	47,1	
							I _F = 120,03 μE m ⁻² s ⁻¹

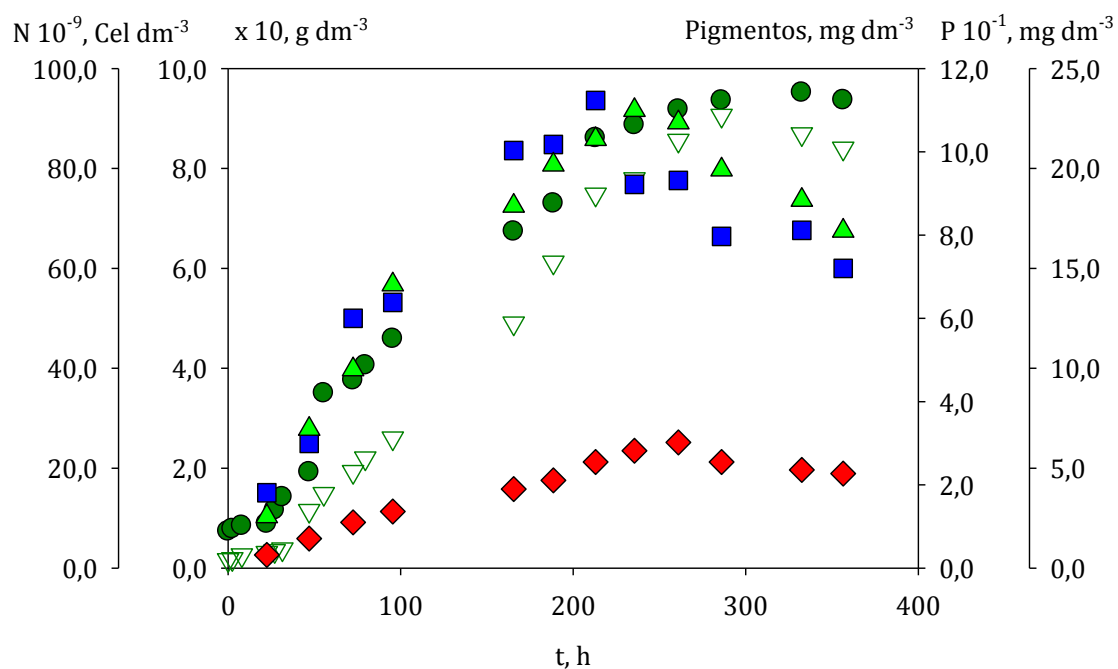


Figura D.39 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 7 ALFC.

Tabla D.116. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 7 ALFC

% N	% C	% H	% S	% O
4,62	48,6	7,24	0,419	39,2

Tabla D.117. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 7 ALFC

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,204	18:2n6	13,9
14:1	0,219	20:0	0,0908
16:0	17,6	18:3n3	19,7
16:1	2,16	18:4n3	0,215
16:2	4,20	20:2n6	0,350
16:3	0,208	22:0	0,339
18:0	5,70	22:1n9	0,125
18:1	27,8	20:5n3	0,230
18:2n3	0,0552	22:5n3	0,177
		N.I.	6,73

Tabla D.118. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivo realizado usando aguas de lavado de aceitunas

Expt: 8 ALFC

MEDIO = 50 % ALF + UP + 10 % CO₂

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 140,57 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ³ g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	0,768	1,90					
2,5	0,806	2,16					
8,0	0,868	2,37					
22,5	1,52	4,27	2,19	0,318	5,76		
27,0	1,99	4,80					
31,5	2,55	6,27					
47,0	2,95	10,9	2,99	0,711	11,3		
55,5	3,74	13,9					
72,5	4,07	21,1	6,25	1,10	13,7		
79,5	4,29	24,5					
95,5	4,97	27,8	7,18	1,36	15,0		
165,5	7,11	51,0	9,87	1,90	17,1		
188,5	8,07	63,3	10,0	2,11	17,9		
213,0	8,80	77,3	10,8	2,55	19,0		
235,5	10,3	80,0	11,3	2,82	20,5		
261,0	10,8	89,3	11,5	3,02	26,7		
286,0	11,1	97,6	10,5	2,55	19,2		
332,5	11,0	97,3	8,31	2,36	17,5		
356,5	10,8	91,0	7,43	2,27	15,8	47,7	
							I _F = 118,89 μE m ⁻² s ⁻¹

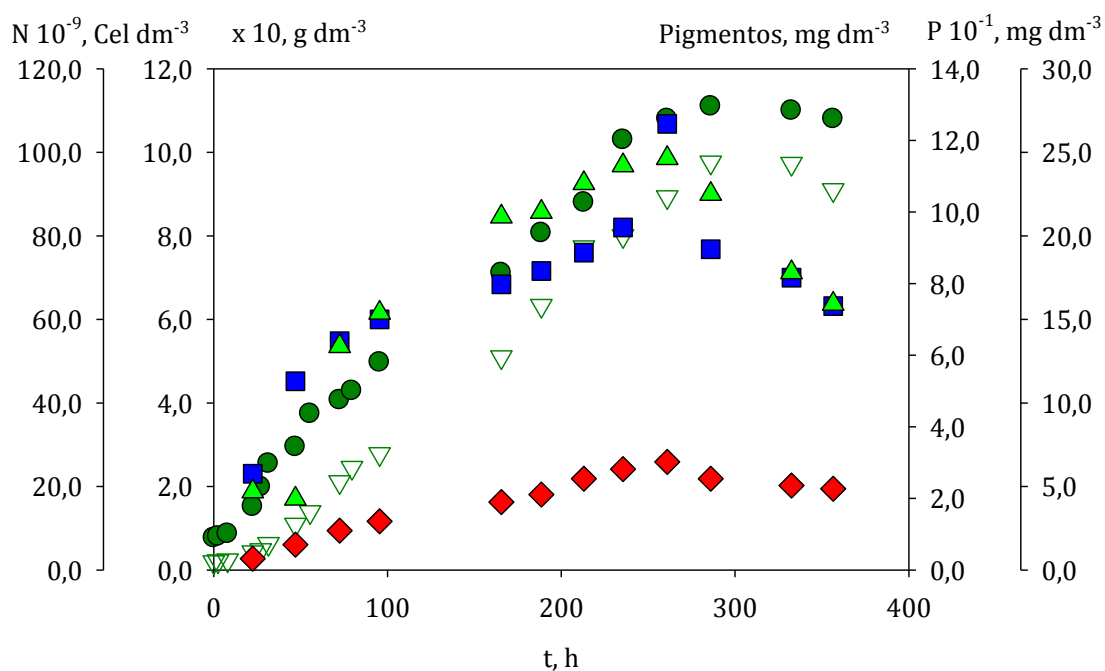


Figura D.40 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 8 ALFC.

Tabla D.119. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 8 ALFC

% N	% C	% H	% S	% O
4,64	48,5	7,24	0,359	39,3

Tabla D.120. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 8 ALFC

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,205	18:2n6	14,0
14:1	0,216	20:0	0,0805
16:0	17,2	18:3n3	20,5
16:1	2,09	18:4n3	0,211
16:2	4,04	20:2n6	0,300
16:3	0,165	22:0	0,336
18:0	5,64	22:1n9	0,127
18:1	27,4	20:5n3	0,219
18:2n3	0,0824	22:5n3	0,394
		N.I.	6,79

Tabla D.121. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivo realizado usando aguas de lavado de aceitunas

Expt: 9 ALFC

MEDIO = 50 % ALF + UP + 15 % CO₂

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 140,57 µE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ³ g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	0,421	2,50					
2,0	0,427	2,52					
15,0	0,470	2,55					
19,0	0,642	3,43					
23,0	0,789	3,88					
38,0	1,03	5,39	2,60	0,514	5,00		
47,5	1,59	11,3					
61,0	1,82	17,5	3,87	0,705	6,24		
72,0	2,71	21,1					
86,5	3,19	24,3	9,07	1,32	10,4		
111,5	4,65	45,9	10,8	2,04	14,4		
158,5	6,12	56,8	12,3	2,30	16,1		
181,0	6,71	73,3	13,0	3,37	13,5		
206,5	7,52	84,0	13,7	3,33	14,4		
228,5	8,05	86,6	14,9	3,15	14,8		
254,5	8,61	87,7	14,4	3,04	15,4		
279,0	9,04	89,1	12,9	2,94	16,1		
326,5	9,48	87,2	10,6	2,66	16,7		
350,5	9,62	77,5	10,5	2,63	16,7		
375,0	9,55	74,4	10,2	2,61	15,8	45,2	
							I _F = 115,25 µE m ⁻² s ⁻¹

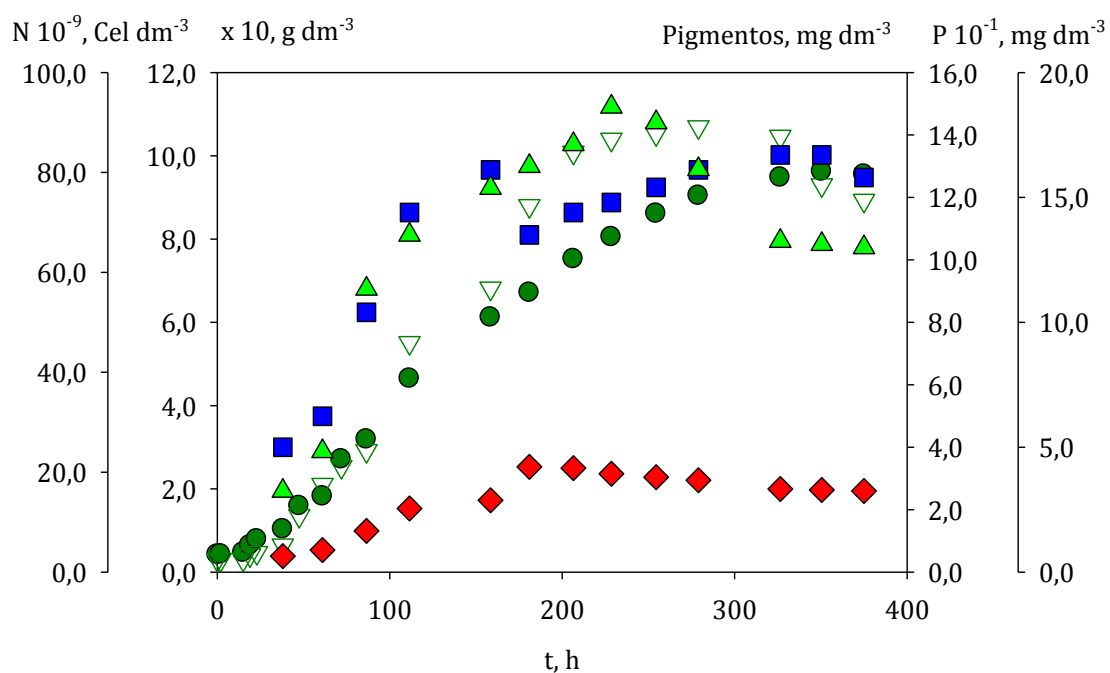


Figura D.41 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 9 ALFC.

Tabla D.122. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 9 ALFC

% N	% C	% H	% S	% O
4,53	49,7	7,31	0,457	38,0

Tabla D.123. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 9 ALFC

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,206	18:2n6	15,3
14:1	0,188	20:0	0,0732
16:0	17,2	18:3n3	19,3
16:1	1,84	18:4n3	0,269
16:2	4,80	20:2n6	0,0366
16:3	0,204	22:0	0,327
18:0	4,76	22:1n9	0,0990
18:1	28,0	20:5n3	0,245
18:2n3	0,0478	22:5n3	0,645
		N.I.	6,46

Tabla D.124. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivo realizado usando aguas de lavado de aceitunas

Expt: 10 ALFC

MEDIO = 50 % ALF + UP + 15 % CO₂

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 139,63 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ³ g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	0,374	2,22					
2,0	0,415	2,36					
15,0	0,464	2,39					
19,0	0,601	2,95					
23,0	0,750	3,80					
38,0	0,950	4,84	2,17	0,514	4,56		
47,5	1,18	10,1					
61,0	1,55	15,2	3,19	0,705	6,87		
72,0	2,01	19,3					
86,5	2,32	22,0	7,92	1,32	9,48		
111,5	3,48	39,6	10,1	2,04	10,7		
158,5	4,18	51,6	11,4	2,30	12,3		
181,0	5,81	70,2	11,8	3,37	11,6		
206,5	6,86	79,6	13,3	3,33	12,6		
228,5	7,56	84,2	14,1	3,15	14,0		
254,5	8,83	83,7	13,8	3,04	15,8		
279,0	8,99	87,7	12,0	2,94	14,5		
326,5	9,38	87,2	9,68	2,66	14,4		
350,5	9,45	83,0	8,06	2,63	14,4		
375,0	9,45	79,1	7,52	2,60	13,5	44,5	
							I _F = 114,93 μE m ⁻² s ⁻¹

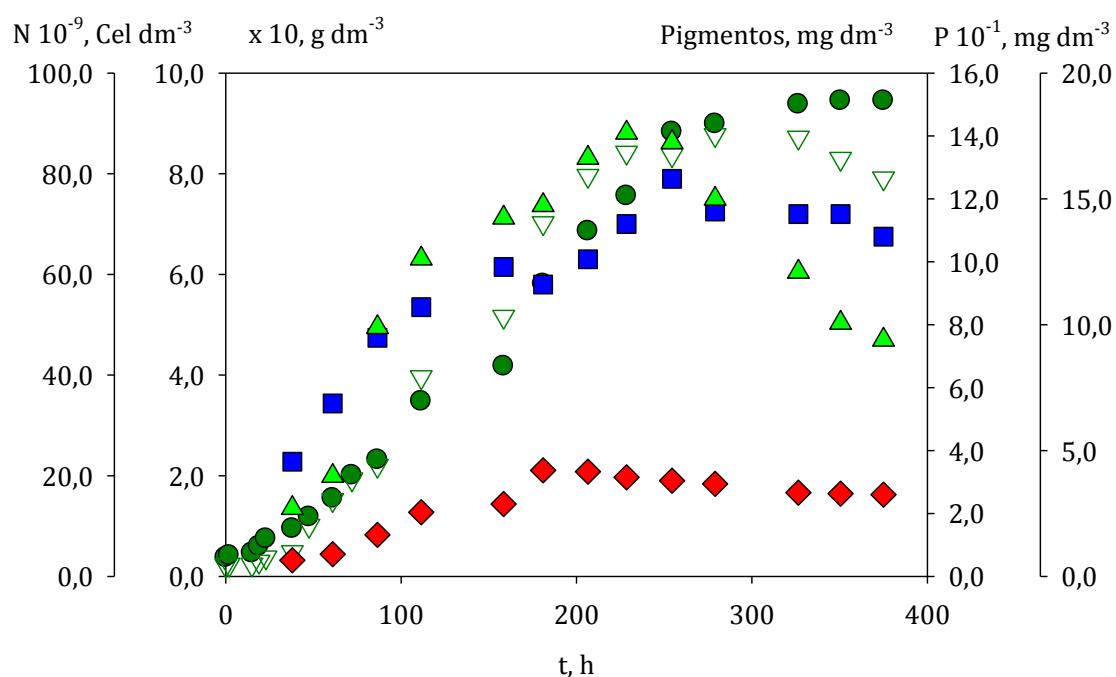


Figura D.42 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 10 ALFC.

Tabla D.125. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 10 ALFC

% N	% C	% H	% S	% O
4,48	49,8	7,37	0,353	38,0

Tabla D.126. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 10 ALFC

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,191	18:2n6	15,1
14:1	0,178	20:0	0,0647
16:0	17,0	18:3n3	17,9
16:1	1,86	18:4n3	0,150
16:2	4,79	20:2n6	0,0341
16:3	0,185	22:0	0,368
18:0	4,83	22:1n9	0,0930
18:1	28,3	20:5n3	0,226
18:2n3	0,488	22:5n3	0,650
		N.I.	7,59

Tabla D.127. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivo realizado usando aguas de lavado de aceites

Expt: 1 ALAC

MEDIO = 30 % ALA + UP + 1 % CO₂

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 124,24 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ³ g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	0,324	1,26					
3,0	0,340	1,58					
19,5	0,361	1,61					
24,0	0,452	1,63					
28,0	0,573	1,63					
42,0	0,769	7,97					
51,0	1,38	10,3					
66,5	1,80	15,8	2,63	0,547	8,49		
91,5	3,01	22,4	4,71	0,889	12,9		
139,0	5,33	28,3	7,19	1,48	22,0		
163,0	6,27	34,2	7,53	1,84	25,4		
186,5	7,19	39,2	7,92	2,01	27,9		
212,5	8,63	44,8	6,61	1,95	32,1		
234,5	9,32	48,4	5,35	1,89	31,3		
260,5	10,6	56,7	5,12	1,87	34,2		
308,0	12,0	59,1	5,12	1,83	31,7		
332,5	13,1	61,7	4,99	1,77	31,7		
357,0	13,0	62,0	4,45	1,61	28,3	45,3	
							I _F = 113,40 μE m ⁻² s ⁻¹

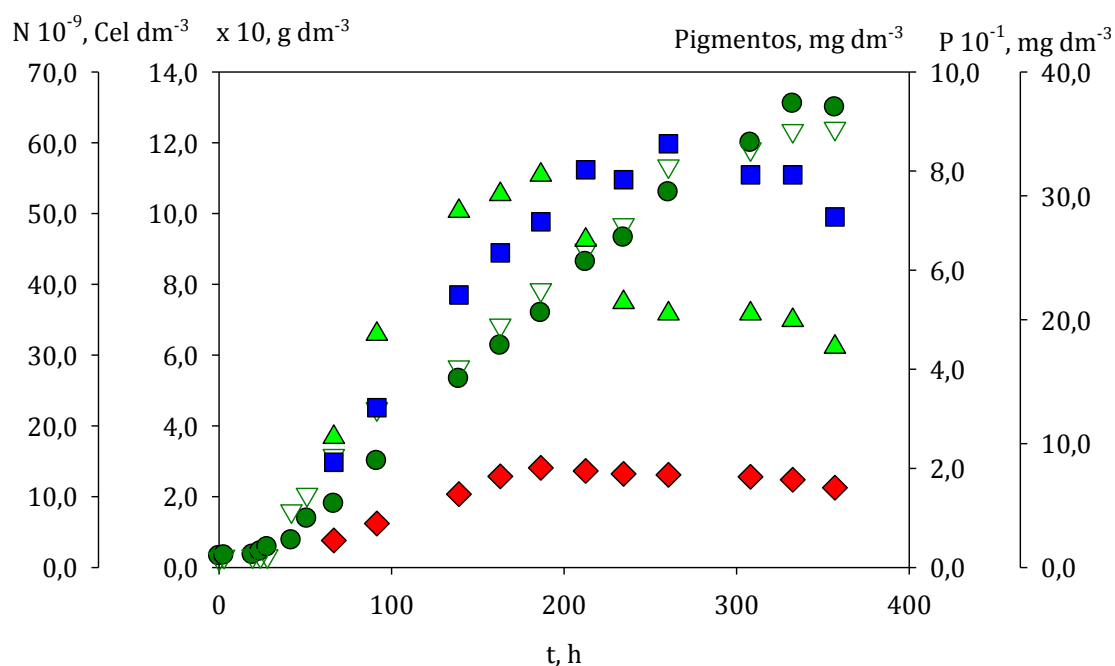


Figura D.43 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 1 ALAC.

Tabla D.128. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 1 ALAC

% N	% C	% H	% S	% O
4,38	48,9	7,22	0,348	39,1

Tabla D.129. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 1 ALAC

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,233	18:2n6	14,6
14:1	0,222	20:0	0,0382
16:0	19,5	18:3n3	17,0
16:1	1,91	20:1n9	0,125
16:2	4,30	18:4n3	0,040
16:3	0,121	20:2n6	0,279
18:0	7,51	22:0	0,255
18:1	25,6	20:5n3	0,178
18:2n3	0,0745	N.I.	6,01

Tabla D.130. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivo realizado usando aguas de lavado de aceites

Expt: 2 ALAC

MEDIO = 30 % ALA + UP + 1 % CO₂

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ =139,63 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ³ g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	0,287	1,10					
3,0	0,317	1,43					
19,5	0,348	1,57					
24,0	0,410	1,57					
28,0	0,484	1,63					
42,0	0,625	6,74					
51,0	1,05	7,89					
66,5	1,51	15,2	1,72	0,547	5,97		
91,5	2,30	22,0	3,99	0,889	8,07		
139,0	4,73	25,7	6,30	1,48	15,9		
163,0	5,77	31,8	7,00	1,84	17,9		
186,5	6,70	35,1	7,46	2,01	20,7		
212,5	7,87	39,7	6,27	1,95	23,2		
234,5	8,33	46,2	5,24	1,89	23,8		
260,5	9,45	52,7	5,07	1,87	26,3		
308,0	9,41	56,1	4,62	1,83	25,9		
332,5	9,17	55,8	4,24	1,77	23,2		
357,0	8,93	54,2	4,12	1,61	19,8	45,7	
							I _F =116,72 μE m ⁻² s ⁻¹

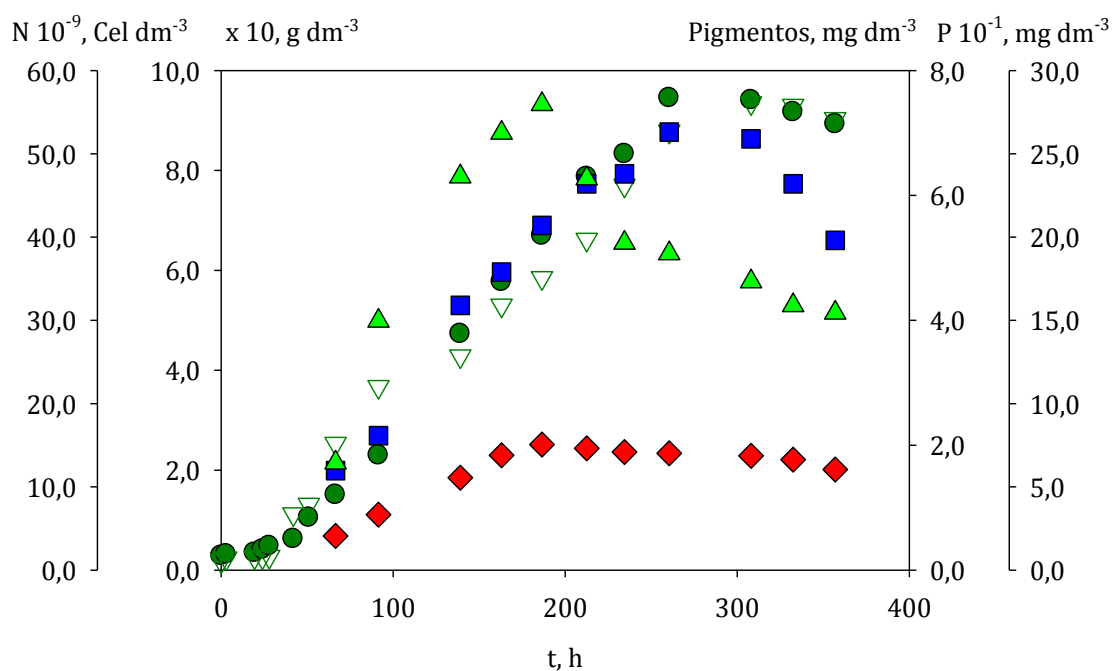


Figura D.44 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▼) en función del tiempo en el Exp. 2 ALAC.

Tabla D.131. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 2 ALAC

% N	% C	% H	% S	% O
4,37	49,7	7,34	0,318	38,3

Tabla D.132. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 2 ALA.

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,238	18:2n6	14,7
14:1	0,235	20:0	0,0816
16:0	19,6	18:3n3	17,1
16:1	1,95	18:4n3	0,119
16:2	4,45	20:2n6	0,0325
16:3	0,121	22:0	0,253
18:0	7,70	22:1n9	0,264
18:1	26,5	20:5n3	0,186
18:2n3	0,0419	N.I.	6,43

Tabla D.133. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivo realizado usando aguas de lavado de aceites

Expt: 3 ALAC

MEDIO = 30 % ALA + UP + 2 % CO₂

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C	I ₀ = 141,73 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ³ g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %
0,0	0,330	1,38				
3,0	0,350	1,72				
19,5	0,382	1,82				
24,0	0,548	1,92				
28,0	0,650	2,00				
42,0	0,797	8,16				
51,0	1,66	22,5				
66,5	1,84	24,9	2,40	0,538	8,87	
91,5	2,68	32,6	3,19	0,793	12,5	
139,0	3,02	36,5	3,55	1,02	13,1	
163,0	3,27	41,4	4,43	1,19	13,3	
186,5	3,41	44,7	4,09	1,20	12,4	
212,5	3,49	48,4	4,01	1,18	11,9	
234,5	3,54	50,2	3,88	1,05	11,6	
260,5	3,76	56,1	3,85	1,03	11,2	
308,0	4,19	58,1	3,25	0,957	10,8	
332,5	4,12	57,9	2,34	0,903	10,3	46,6
						I _F = 121,24 μE m ⁻² s ⁻¹

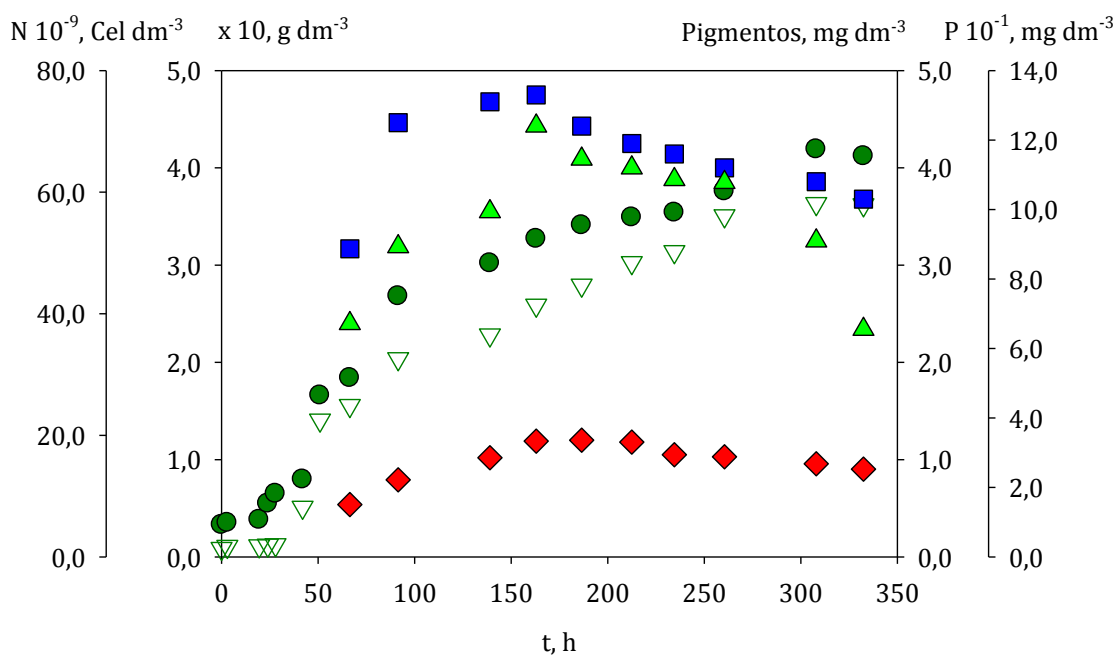


Figura D.45 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 3 ALAC.

Tabla D.134. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 3 ALAC

% N	% C	% H	% S	% O
7,13	46,1	6,80	0,469	39,5

Tabla D.135. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 3 ALAC.

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,412	18:2n6	12,7
14:1	0,530	20:0	0,131
16:0	18,5	18:3n3	20,3
16:1	4,01	20:1n9	0,128
16:2	4,12	20:2n6	0,388
16:3	0,259	22:0	0,492
18:0	8,86	20:5n3	0,416
18:1	23,6	N.I.	4,97
18:2n3	0,166		

Tabla D.136. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivo realizado usando aguas de lavado de aceites

Expt: 4 ALAC

MEDIO = 30 % ALA + UP + 2 % CO₂

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 140,57 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	0,340	1,44					
3,0	0,353	1,76					
19,5	0,392	1,82					
24,0	0,535	1,92					
28,0	0,650	2,03					
42,0	0,790	8,24					
51,0	1,76	23,8					
66,5	1,93	25,0	3,12	0,653	9,54		
91,5	2,84	33,2	3,36	0,869	12,7		
139,0	3,11	36,8	3,49	1,02	13,1		
163,0	3,33	41,3	4,49	1,15	12,7		
186,5	3,50	44,7	4,31	1,20	13,1		
212,5	3,72	48,6	3,90	1,21	13,3		
234,5	3,82	50,2	3,88	1,09	13,1		
260,5	4,09	55,5	3,85	1,03	13,3		
308,0	4,30	56,5	3,25	0,957	12,1		
332,5	4,14	55,3	2,05	0,841	10,4	45,8	
							I _F = 121,93 μE m ⁻² s ⁻¹

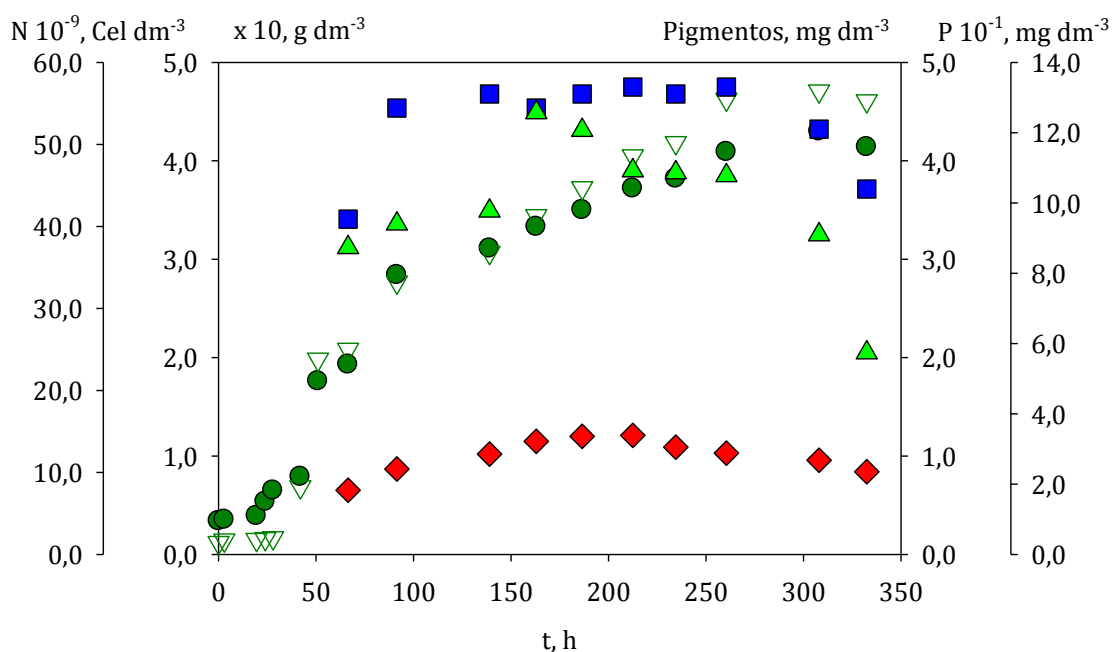


Figura D.46 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 4 ALAC.

Tabla D.137. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 4 ALAC

% N	% C	% H	% S	% O
7,01	46,6	6,88	0,467	39,0

Tabla D.138. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 4 ALAC

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,434	18:2n3	0,176
14:1	0,546	18:2n6	12,9
16:0	18,5	20:0	0,148
16:1	4,00	18:3n3	20,7
16:2	3,98	20:1n9	0,133
16:3	0,247	20:2n6	0,452
18:0	8,85	22:0	0,423
18:1	22,5	20:5n3	0,452
		N.I.	5,51

Tabla D.139. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivo realizado usando aguas de lavado de aceites

Expt: 5 ALAC

MEDIO = 30 % ALA + UP + 5 % CO₂

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 139,63 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ³ g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	0,469	2,30					
3,0	0,581	2,59					
7,5	0,693	3,02					
21,0	0,844	4,62					
26,5	1,11	5,11					
30,5	1,57	5,32					
45,5	2,14	17,8	3,51	0,709	9,31		
54,5	2,98	22,5					
69,0	3,48	25,7	4,27	0,780	14,8		
78,5	4,50	31,2					
93,0	5,24	36,4	6,05	1,28	18,8		
102,5	5,50	40,6					
118,5	5,75	41,7	7,06	1,61	20,0		
169,0	6,66	45,9	7,63	1,91	18,9		
189,5	6,99	47,6	7,21	2,15	21,7		
213,5	6,95	36,6	8,28	2,13	20,3		
237,5	6,93	35,5	7,79	2,00	18,8	45,1	
							I _F = 120,47 μE m ⁻² s ⁻¹

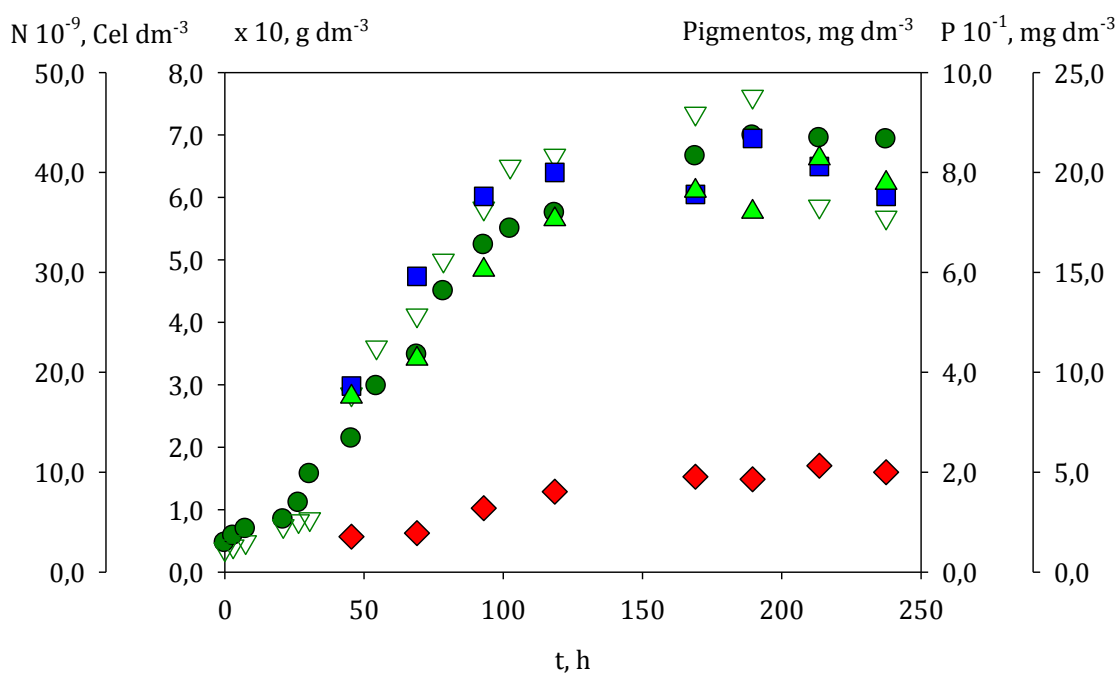


Figura D.47 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 5 ALAC.

Tabla D.140. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 5 ALAC

% N	% C	% H	% S	% O
6,64	45,1	6,60	0,284	41,4

Tabla D.141. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 5 ALAC

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,424	18:1	25,0
14:1	0,502	18:2n3	0,135
16:0	17,4	18:2n6	12,2
16:1	3,80	20:0	0,162
16:2	4,58	18:3n3	20,3
16:3	0,316	22:0	0,298
18:0	6,00	22:5n3	0,161
		N.I.	8,72

Tabla D.142. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivo realizado usando aguas de lavado de aceites

Expt: 6 ALAC

MEDIO = 30 % ALA + UP + 5 % CO₂

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 140,57 µE m ⁻² s ⁻¹	
t	x 10	N 10 ⁻⁹	CHL 10 ³	Ca 10 ³	P 10 ²	L	
h	g dm ⁻³	Cel dm ⁻³	g dm ⁻³	g dm ⁻³	g dm ⁻³	%	
0,0	0,489	2,42					
3,0	0,631	2,67					
7,5	0,693	2,98					
21,0	0,909	4,64					
26,5	1,11	5,20					
30,5	1,76	6,65					
45,5	2,34	18,6	4,01	0,787	10,5		
54,5	3,08	25,1					
69,0	3,61	27,2	4,82	0,975	14,2		
78,5	4,62	31,8					
93,0	5,46	37,3	5,99	1,39	18,2		
102,5	5,75	41,1					
118,5	6,02	41,7	6,83	1,72	18,8		
169,0	6,59	48,0	7,45	1,91	20,0		
189,5	6,87	47,6	8,32	1,93	20,3		
213,5	6,95	42,8	7,78	2,13	20,0		
237,5	6,87	36,5	7,29	2,00	16,5	46,7	
I _F = 118,01 µE m ⁻² s ⁻¹							

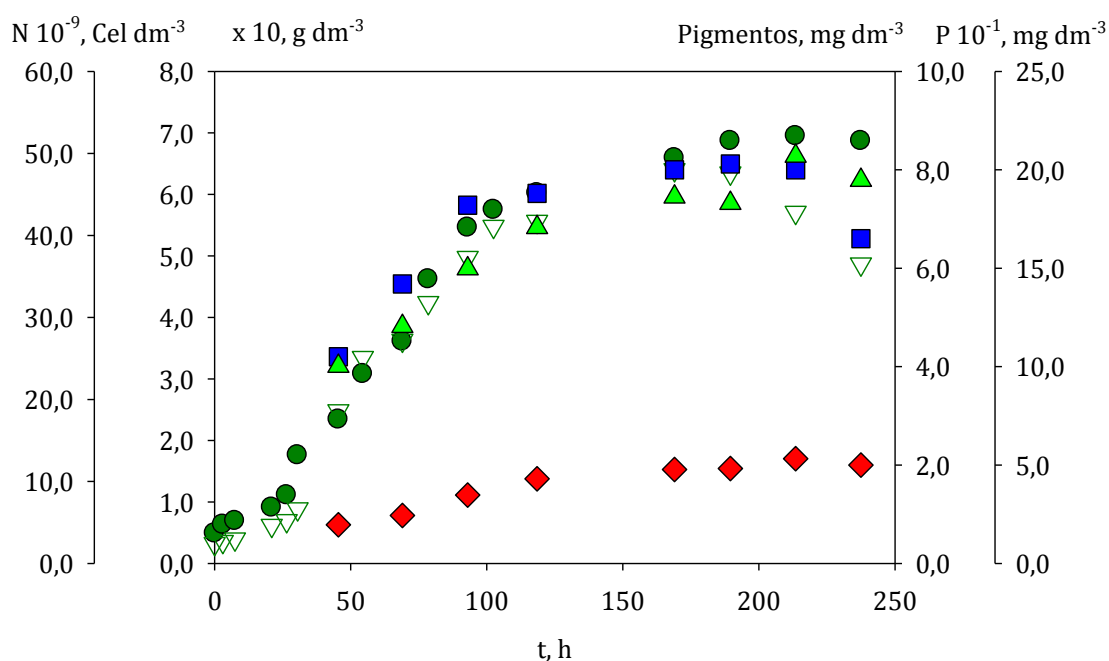


Figura D.48 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 6 ALAC.

Tabla D.143. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 6 ALAC

% N	% C	% H	% S	% O
6,77	45,1	6,55	0,348	41,2

Tabla D.144. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 6 ALAC.

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,415	18:1	26,8
14:1	0,495	18:2n3	0,162
16:0	17,2	18:2n6	12,1
16:1	3,76	20:0	0,156
16:2	4,47	18:3n3	20,3
16:3	0,287	20:2n6	0,579
18:0	6,00	20:5n3	0,196
		N.I.	7,07

Tabla D.145. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivo realizado usando aguas de lavado de aceites

Expt: 7 ALAC

MEDIO = 30 % ALA + UP + 10 % CO₂

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 124,24 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 g dm ⁻³	N 10 ⁻¹⁰ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	0,451	0,178					
3,0	0,572	0,186					
6,0	0,627	0,223					
19,5	0,850	0,412					
25,0	1,15	0,518					
30,0	1,37	0,608					
43,5	2,01	1,03	1,38	0,191	8,35		
54,0	3,39	1,15					
68,0	4,23	3,97	7,74	0,270	16,8		
78,0	5,23	4,29					
91,5	6,22	4,43	9,57	0,799	26,2		
102,0	7,22	4,76	10,2	1,32	30,8		
117,0	8,14	7,47	11,4	1,61	31,7		
164,0	10,7	8,11	13,9	3,71	39,7		
187,5	11,7	8,31	15,0	4,44	40,9		
210,5	12,6	8,49	15,6	4,72	41,3		
235,0	14,4	8,57	16,5	5,05	40,1		
259,0	14,7	8,61	17,1	5,10	38,8		
285,0	14,8	8,99	17,3	5,00	37,9		
308,0	14,8	9,91	16,7	4,84	36,7		
332,0	14,3	10,0	15,1	4,16	30,0		
356,0	13,8	9,38	14,2	3,63	25,4	48,9	
							I _F = 123,56 μE m ⁻² s ⁻¹

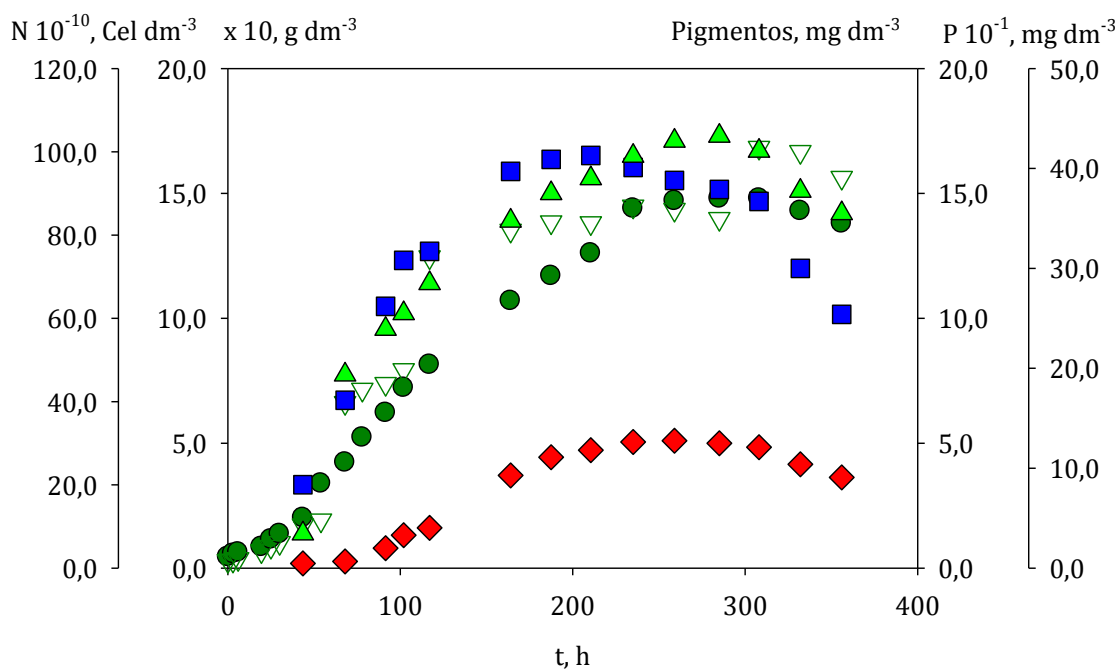


Figura D.49 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 7 ALAC.

Tabla D.146. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 7 ALAC

% N	% C	% H	% S	% O
4,47	49,7	7,40	0,320	38,1

Tabla D.147. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 7 ALAC

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,175	18:2n6	12,5
14:1	0,0989	20:0	0,0673
16:0	17,4	18:3n3	16,0
16:1	1,65	18:4n3	0,279
16:2	3,96	20:2n6	0,233
16:3	0,105	22:0	0,146
18:0	9,46	22:1n9	0,040
18:1	30,0	20:5n3	0,157
18:2n3	0,110	22:5n3	0,0799
		N.I.	7,54

Tabla D.148. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivo realizado usando aguas de lavado de aceites

Expt: 8 ALAC

MEDIO = 30 % ALA + UP + 10 % CO₂

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 140,57 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ³ g dm ⁻³	N 10 ⁻¹⁰ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	0,466	0,188					
3,0	0,588	0,186					
6,0	0,630	0,223					
19,5	0,864	0,411					
25,0	1,13	0,518					
30,0	1,42	0,608					
43,5	2,05	1,03	1,51	0,315	10,4		
54,0	3,42	1,15					
68,0	4,27	3,98	9,50	1,72	18,4		
78,0	5,30	4,30					
91,5	6,31	4,44	12,7	2,30	26,6		
102,0	7,34	4,77					
117,0	8,30	7,49	16,0	2,98	31,4		
164,0	11,0	8,15	15,5	3,40	38,8		
187,5	12,1	8,35	15,1	3,55	41,8		
210,5	13,2	8,34	12,4	3,33	43,2		
235,0	15,1	8,87	11,1	3,18	45,9		
259,0	15,3	9,52	9,95	3,14	43,0		
285,0	16,2	9,74	8,49	2,75	43,0		
331,0	17,0	10,2	6,99	2,63	40,1		
355,0	17,1	10,1	6,72	2,61	37,9		
379,0	16,9	9,54	6,21	2,54	35,9	48,4	
							I _F = 115,61 μE m ⁻² s ⁻¹

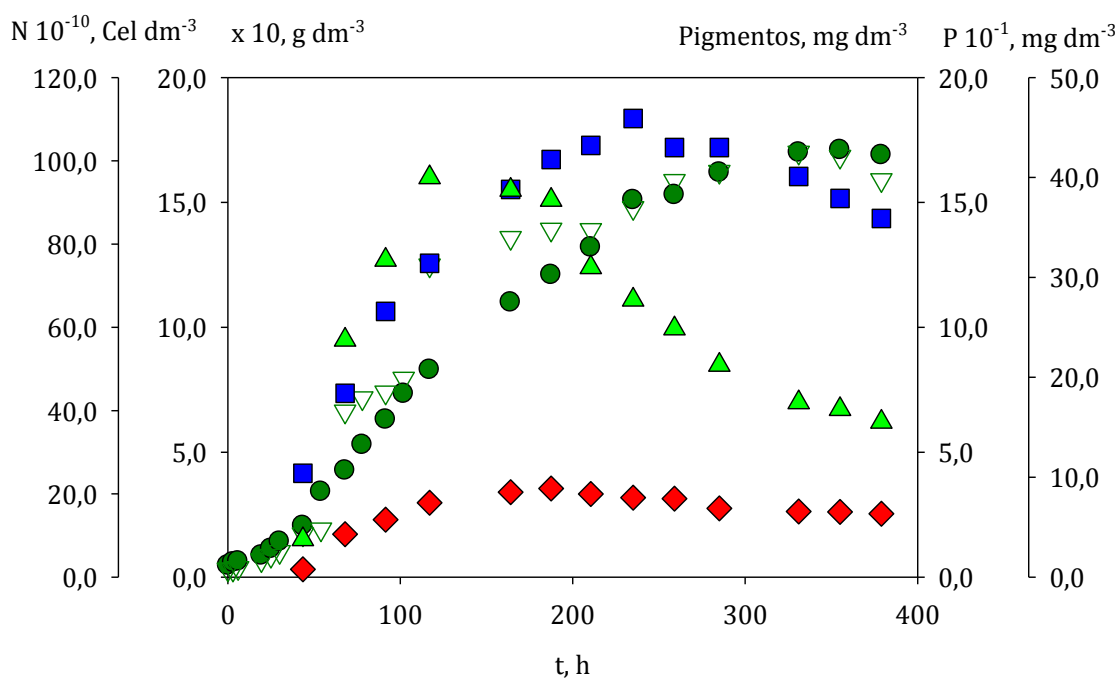


Figura D.50 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 8 ALAC.

Tabla D.149. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 8 ALAC

% N	% C	% H	% S	% O
4,20	50,5	7,48	0,228	37,6

Tabla D.150. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 8 ALAC

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,172	18:2n6	12,7
14:1	0,0963	20:0	0,0714
16:0	17,3	18:3n3	16,3
16:1	1,60	18:4n3	0,280
16:2	3,82	20:2n6	0,282
16:3	0,0816	22:0	0,139
18:0	9,16	22:1n9	0,0856
18:1	30,5	20:5n3	0,121
18:2n3	0,0280	22:5n3	0,0785
		N.I.	7,19

Tabla D.151. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivo realizado usando aguas de lavado de aceites

Expt: 9 ALAC

MEDIO = 30 % ALA + UP + 15 % CO₂

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 141,73 μE m ⁻² s ⁻¹	
t	x 10	N 10 ⁻¹⁰	CHL 10 ³	Ca 10 ³	P 10 ²	L	
h	g dm ⁻³	Cel dm ⁻³	g dm ⁻³	g dm ⁻³	g dm ⁻³	%	
0,0	0,327	0,162					
2,0	0,400	0,172					
6,0	0,488	0,178					
8,0	0,560	0,194					
20,5	0,706	0,240					
26,0	0,842	0,264					
31,0	1,18	0,280					
45,0	1,75	0,576	2,04	0,473	8,91		
55,0	2,92	0,955					
68,0	3,48	1,31	5,81	1,02	14,4		
79,0	4,82	1,80					
93,0	5,53	2,55	8,60	1,62	21,0		
118,5	6,33	4,90	11,2	2,14	22,4		
164,5	7,89	5,78	11,3	2,82	26,9		
189,5	9,22	8,78	11,9	2,83	32,1		
213,5	10,1	10,1	12,3	3,02	33,4		
240,0	11,2	11,5	11,7	3,05	35,0		
261,0	11,5	12,6	11,3	3,09	35,9		
286,5	12,3	13,1	11,0	2,98	38,0		
333,0	13,2	11,5	8,80	2,85	37,6		
357,0	13,6	11,0	8,36	2,67	37,6		
382,5	13,8	9,71	7,40	2,57	35,9		
406,0	13,5	9,09	6,99	2,47	35,0	47,4	
I _F = 110,75 μE m ⁻² s ⁻¹							

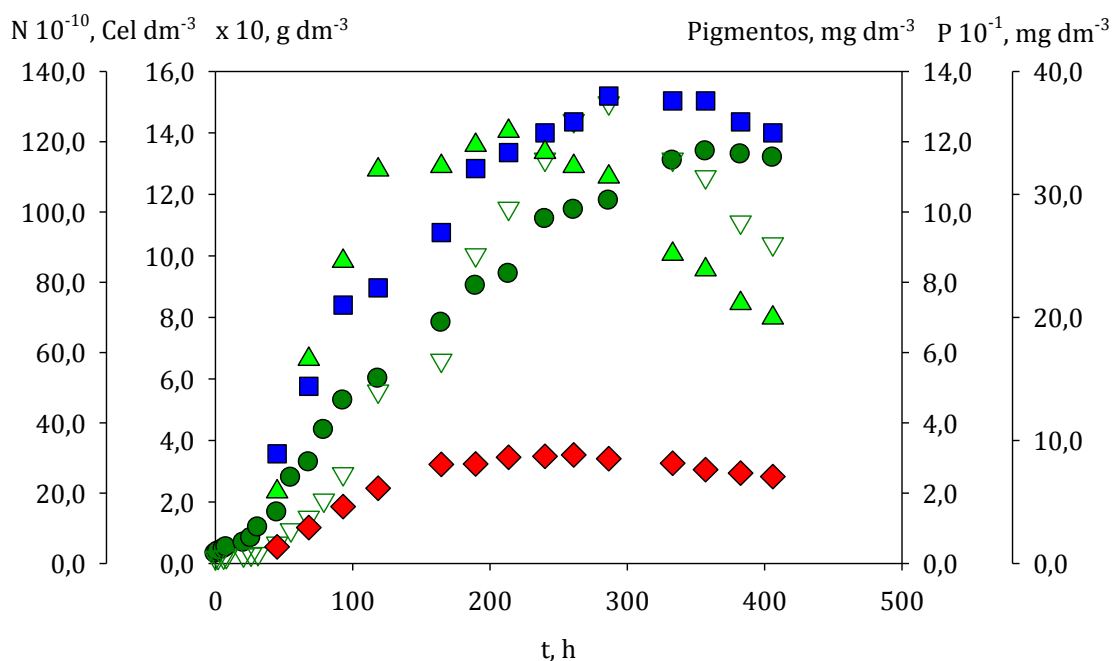


Figura D.51 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 9 ALAC.

Tabla D.152. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 9 ALAC

% N	% C	% H	% S	% O
3,89	49,7	7,36	0,238	38,8

Tabla D.153. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 9 ALAC

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,205	18:2n6	14,4
14:1	0,157	20:0	0,0799
16:0	16,7	18:3n3	18,4
16:1	1,92	18:4n3	0,232
16:2	4,33	20:2n6	0,104
16:3	0,145	22:0	0,183
18:0	7,22	22:5n3	0,100
18:1	28,6	N.I.	7,17
18:2n3	0,0546		

Tabla D.154. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivo realizado usando aguas de lavado de aceites

Expt: 10 ALAC

MEDIO = 30 % ALA + UP + 15 % CO₂

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 140,57 μE m ⁻² s ⁻¹	
t	x 10	N 10 ⁻¹⁰	CHL 10 ³	Ca 10 ³	P 10 ²	L	
h	g dm ⁻³	Cel dm ⁻³	g dm ⁻³	g dm ⁻³	g dm ⁻³	%	
0,0	0,317	0,150					
2,0	0,386	0,162					
6,0	0,472	0,178					
8,0	0,527	0,198					
20,5	0,676	0,228					
26,0	0,823	0,243					
31,0	1,17	0,254					
45,0	1,66	0,520	1,91	0,473	8,30		
55,0	2,79	0,827					
68,0	3,29	1,22	5,62	1,02	15,4		
79,0	4,34	1,56					
93,0	5,30	2,15	8,60	1,62	27,8		
118,5	6,01	4,74	10,9	2,14	23,8		
164,5	7,83	5,54	11,3	2,82	28,4		
189,5	9,03	8,31	11,7	2,83	32,5		
213,5	9,42	10,1	12,2	3,02	34,2		
240,0	11,2	11,0	11,5	3,05	39,2		
261,0	11,5	12,6	11,1	3,09	39,7		
286,5	11,8	13,0	10,7	2,98	38,8		
333,0	13,1	11,8	9,03	2,85	38,0		
357,0	13,4	11,6	8,05	2,67	34,2		
382,5	13,3	9,80	7,09	2,57	33,4		
406,0	13,2	9,32	6,06	2,47	31,3	47,2	
I _F = 115,02 μE m ⁻² s ⁻¹							

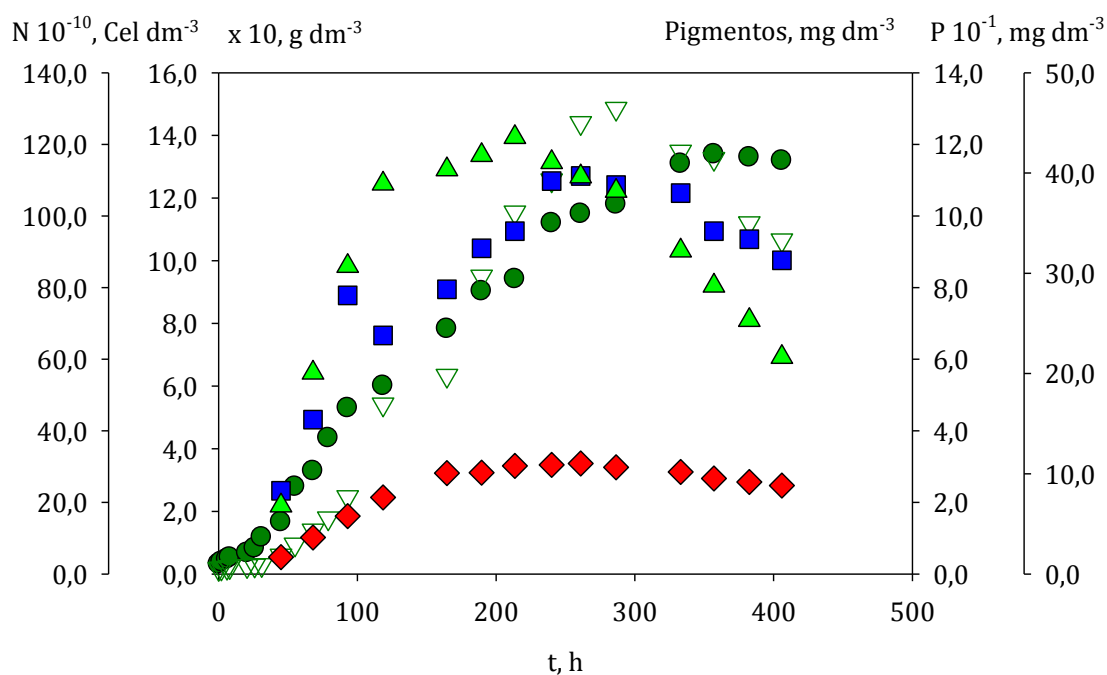


Figura D.52 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 10 ALAC.

Tabla D.155. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 10 ALAC

% N	% C	% H	% S	% O
3,93	50,1	7,48	0,262	38,2

Tabla D.156. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 10 ALAC

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,197	18:2n6	14,4
14:1	0,143	20:0	0,0730
16:0	16,7	18:3n3	17,7
16:1	2,0	20:2n6	0,224
16:2	4,54	22:0	0,144
16:3	0,171	20:5n3	0,161
18:0	7,60	22:5n3	0,0865
18:1	28,2	N.I.	7,61
18:2n3	0,0558		

Tabla D.157. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivo realizado usando aguas de lavado de aceitunas, aguas de lavado de aceites y aguas residuales urbanas

Expt: 1 ALFARUC

MEDIO = 50 % ALF + 30 % ALA + RU + 10 % CO₂

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 141,73 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ³ g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	0,254	0,800					
3,0	0,287	0,851					
7,5	0,323	0,941					
10,5	0,359	0,951					
24,5	0,428	0,960					
28,5	0,487	1,29					
34,0	0,638	2,41					
46,5	0,830	6,06					
57,5	1,83	22,1					
74,0	2,80	44,4	5,81	1,19	11,6		
97,0	4,19	49,5			15,2		
144,0	6,57	54,6	12,6	2,53	21,7		
168,0	7,70	61,5	13,1	2,83	24,8		
192,0	8,55	63,8	14,8	3,05	25,3		
219,5	9,68	65,9	16,5	3,69	27,4		
238,5	9,86	65,7	16,8	3,63	27,8		
265,0	10,5	65,0	16,4	3,57	30,1		
311,5	10,3	63,2	15,9	3,50	28,9	46,9	
							I _F = 114,43 μE m ⁻² s ⁻¹

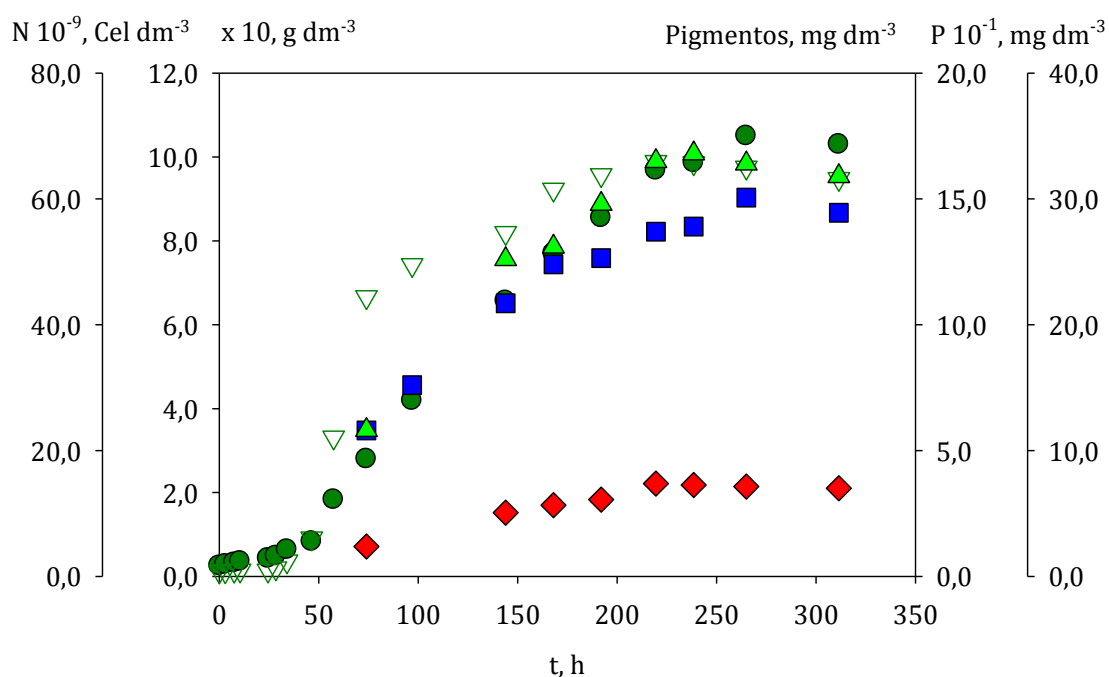


Figura D.53 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 1 ALFARUC.

Tabla D.158. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 1 ALFARUC

% N	% C	% H	% S	% O
7,37	46,6	6,92	0,484	38,7

Tabla D.159. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 1 ALFARUC

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,478	20:0	0,0905
14:1	0,543	18:3n3	12,5
16:0	16,4	20:1n9	0,147
16:1	4,26	18:4n3	0,182
16:2	6,82	20:2n6	0,332
16:3	0,323	22:0	0,478
18:0	8,72	20:5n3	0,410
18:1	28,5	22:5n3	0,183
18:2n3	0,0845	N.I.	6,59
18:2n6	12,9		

Tabla D.160. Producción de biomasa, número de células, pigmentos, proteínas y lípidos totales, en cultivo realizado usando aguas de lavado de aceitunas, aguas de lavado de aceites y aguas residuales urbanas

Expt: 2 ALFARUC

MEDIO = 50 % ALF + 30 % ALA + RU + 10 % CO₂

Q = 1 v/v/min		pH = 8,0		T = 25 °C		I ₀ = 140,57 μE m ⁻² s ⁻¹	
t h	x 10 ³ g dm ⁻³	N 10 ⁻⁹ Cel dm ⁻³	CHL 10 ³ g dm ⁻³	Ca 10 ³ g dm ⁻³	P 10 ² g dm ⁻³	L %	
0,0	0,251	0,860					
3,0	0,274	0,931					
7,5	0,336	1,00					
10,5	0,362	1,01					
24,5	0,477	1,04					
28,5	0,630	1,37					
34,0	0,706	2,59					
46,5	1,04	6,09					
57,5	1,80	22,4					
74,0	2,77	34,6	5,26	1,04	9,75		
97,0	3,90	42,7			13,3		
144,0	5,88	49,7	11,1	2,19	19,1		
168,0	6,86	55,2	12,0	2,49	21,5		
192,0	7,53	58,4	14,0	2,92	23,2		
219,5	8,30	60,7	14,6	3,29	23,8		
238,5	8,28	59,1	14,8	3,21	23,0		
265,0	8,27	58,0	14,2	3,09	20,7		
311,5	8,09	56,1	13,6	2,85	18,9	46,1	
							I _F = 112,44 μE m ⁻² s ⁻¹

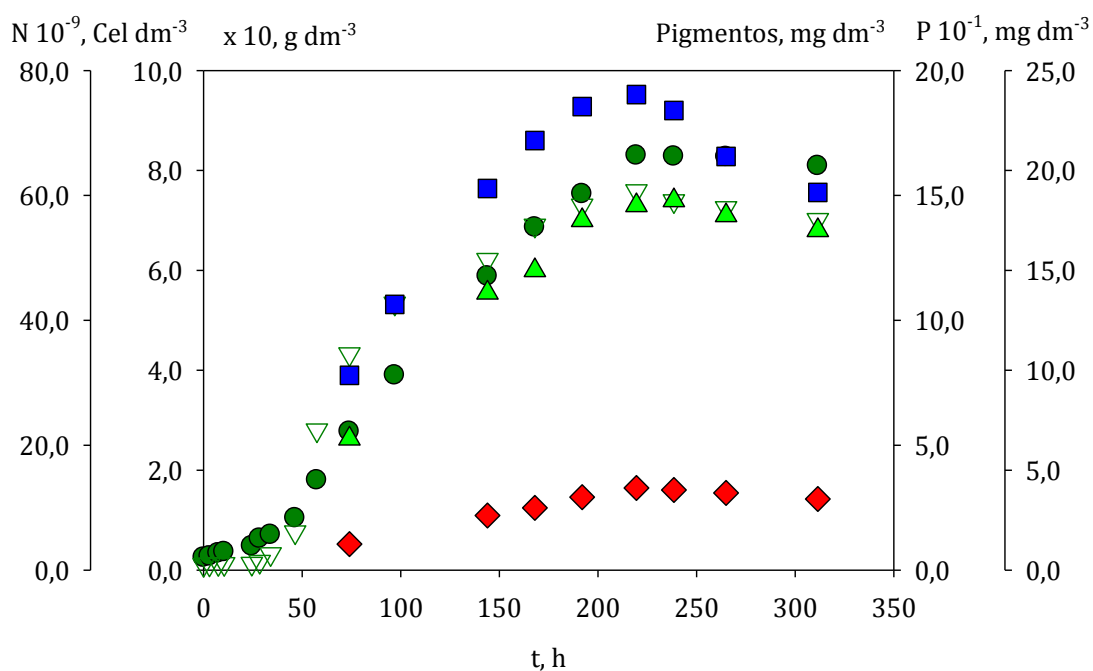


Figura D.54 Variación de las concentraciones de biomasa (●), clorofilas (▲), carotenoides (◆), proteínas (■) y número de células (▽) en función del tiempo en el Exp. 2 ALFARUC

Tabla D.161. Composición elemental de la biomasa formada en el Exp. 2 ALFARUC.

% N	% C	% H	% S	% O
7,43	45,6	6,64	0,564	39,8

Tabla D.162. Composición en ácidos grasos de la biomasa producida en el Exp. 2 ALFARUC

Ácido graso	%	Ácido graso	%
14:0	0,447	20:0	0,121
14:1	0,525	18:3n3	12,5
16:0	15,8	20:1n9	0,136
16:1	4,00	18:4n3	0,0641
16:2	6,53	20:2n6	0,161
16:3	0,332	22:0	0,967
18:0	8,14	20:5n3	0,370
18:1	28,3	22:5n3	0,211
18:2n3	0,0882	N.I.	7,70
18:2n6	13,6		

E. CARACTERIZACIÓN DEL AGUA RESIDUAL DESPUÉS DEL PROCESO

Tabla E.1. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 5% aguas de lavado de aceitunas, Exp. 1 ALF. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,42	8,0	
CE (mS/cm)	2,7	1,32	51,1
ST (%)	0,320	0,00111	99,7
NO ₃ ⁻	0,801	0,140	82,5
SO ₄ ²⁻	414	70,0	83,1
NO ₂ ²⁻	1,30	0,10	92,0
Mg ²⁺	47,0	< 5,0	89,4
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	1,91	< 0,05	97,4
DQO	535	50,0	90,7
O ₂ disuelto	2,65	8,50	221*
N total	3,40	1,13	66,8
P total	0,75	< 0,05	93,3
CFT	3,38	0,480	85,8
Cl ⁻	649	263	59,5

*Generación de oxígeno.

Tabla E.2. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 5% aguas de lavado de aceitunas, Exp. 2 ALF. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,42	7,93	
CE (mS/cm)	2,7	1,27	53,0
ST (%)	0,320	0,00118	99,6
NO ₃ ⁻	0,801	0,145	82,5
SO ₄ ²⁻	414	72,3	82,6
NO ₂ ⁻	1,30	0,109	92,0
Mg ²⁺	47,0	< 5,0	89,3
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	1,91	< 0,05	97,4
DQO	535	53,4	90,7
O ₂ disuelto	2,65	8,42	217*
N total	3,40	1,15	66,2
P total	0,75	< 0,05	93,3
CFT	3,38	0,370	89,1
Cl ⁻	649	285	56,1

*Generación de oxígeno.

Tabla E.3. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 10% aguas de lavado de aceitunas, Exp. 3 ALF. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,42	7,82	
CE (mS/cm)	2,7	1,46	45,9
ST (%)	0,320	0,00116	99,6
NO ₃ ⁻	0,801	0,144	82,0
SO ₄ ²⁻	414	48,0	88,4
NO ₂ ⁻	1,30	0,110	91,5
Mg ²⁺	47,0	5,60	88,1
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	1,91	< 0,05	97,4
DQO	535	30,3	94,3
O ₂ disuelto	2,65	7,80	194*
N total	3,40	1,43	58,0
P total	0,75	< 0,05	93,3
CFT	3,38	0,60	82,3
Cl ⁻	649	322	50,4

*Generación de oxígeno.

Tabla E.4. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 10% aguas de lavado de aceitunas, Exp. 4 ALF. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,42	7,63	
CE (mS/cm)	2,7	1,38	
ST (%)	0,320	0,00106	99,7
NO ₃ ⁻	0,801	0,146	81,8
SO ₄ ²⁻	414	49,0	88,2
NO ₂ ⁻	1,30	0,90	30,8
Mg ²⁺	47,0	5,0	89,4
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	1,91	< 0,05	97,4
DQO	535	25,0	95,3
O ₂ disuelto	2,65	7,30	176*
N total	3,40	1,45	57,4
P total	0,75	< 0,05	93,3
CFT	3,38	0,550	83,7
Cl ⁻	649	319	50,9

*Generación de oxígeno.

Tabla E.5. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 20% aguas de lavado de aceitunas, Exp. 5 ALF. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,42	8,03	
CE (mS/cm)	2,7	1,47	45,6
ST (%)	0,320	0,00137	99,6
NO ₃ ⁻	0,801	0,110	86,3
SO ₄ ²⁻	414	58,0	86,0
NO ₂ ⁻	1,30	0,665	48,9
Mg ²⁺	47,0	6,90	85,3
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	1,91	< 0,05	97,4
DQO	535	80,0	85,1
O ₂ disuelto	2,65	7,12	169*
N total	3,40	1,71	49,7
P total	0,75	< 0,05	93,3
CFT	3,38	0,720	78,7
Cl ⁻	649	378	41,8

*Generación de oxígeno.

Tabla E.6. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 20% aguas de lavado de aceitunas, Exp. 6 ALF. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,42	8,13	
CE (mS/cm)	2,7	1,24	54,1
ST (%)	0,320	0,00170	99,5
NO ₃ ⁻	0,801	0,150	81,3
SO ₄ ²⁻	414	52,0	87,4
NO ₂ ⁻	1,30	0,656	49,5
Mg ²⁺	47,0	6,70	85,7
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	1,91	< 0,05	97,4
DQO	535	85,0	84,1
O ₂ disuelto	2,65	7,25	174*
N total	3,40	1,50	55,9
P total	0,75	< 0,05	93,3
CFT	3,38	0,750	77,8
Cl ⁻	649	355	45,3

*Generación de oxígeno.

Tabla E.7. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 30% aguas de lavado de aceitunas, Exp. 7 ALF. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,42	8,28	
CE (mS/cm)	2,7	1,37	49,3
ST (%)	0,320	0,00128	99,6
NO ₃ ⁻	0,801	0,291	63,7
SO ₄ ²⁻	414	90,0	78,3
NO ₂ ⁻	1,30	0,542	58,3
Mg ²⁺	47,0	16,7	64,5
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	1,91	< 0,05	97,4
DQO	535	81,1	84,8
O ₂ disuelto	2,65	7,14	169*
N total	3,40	1,93	43,3
P total	0,75	< 0,05	93,3
CFT	3,38	0,714	77,8
Cl ⁻	649	376	42,1

*Generación de oxígeno.

Tabla E.8. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 30% aguas de lavado de aceitunas, Exp. 8 ALF. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,42	8,25	
CE (mS/cm)	2,7	1,46	45,9
ST (%)	0,320	0,00155	99,5
NO ₃ ⁻	0,801	0,275	65,7
SO ₄ ²⁻	414	81,0	80,4
NO ₂ ⁻	1,30	0,494	62,0
Mg ²⁺	47,0	20,8	55,8
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 0,40	
Cu ²⁺	1,91	< 0,05	97,4
DQO	535	71,0	86,7
O ₂ disuelto	2,65	6,60	149*
N total	3,40	1,57	53,8
P total	0,75	< 0,05	93,3
CFT	3,38	0,780	76,9
Cl ⁻	649	377	41,9

*Generación de oxígeno.

Tabla E.9. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 50% aguas de lavado de aceitunas, Exp. 9 ALF. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,42	8,15	
CE (mS/cm)	2,7	1,79	33,7
ST (%)	0,320	0,00167	99,5
NO ₃ ⁻	0,801	0,127	84,1
SO ₄ ²⁻	414	85,0	79,5
NO ₂ ⁻	1,30	0,223	82,8
Mg ²⁺	47,0	17,5	62,8
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	1,91	< 0,05	97,4
DQO	535	133	75,1
O ₂ disuelto	2,65	7,0	164*
N total	3,40	1,69	50,3
P total	0,75	< 0,05	93,3
CFT	3,38	0,710	79,0
Cl ⁻	649	381	41,3

*Generación de oxígeno.

Tabla E.10. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 50% aguas de lavado de aceitunas, Exp. 10 ALF. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,42	8,15	
CE (mS/cm)	2,7	1,69	37,4
ST (%)	0,320	0,00157	99,5
NO ₃ ⁻	0,801	0,121	84,9
SO ₄ ²⁻	414	87,0	79,0
NO ₂ ⁻	1,30	0,210	83,9
Mg ²⁺	47,0	21,0	55,3
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	1,91	< 0,05	97,4
DQO	535	160	70,1
O ₂ disuelto	2,65	7,40	179*
N total	3,40	1,84	45,9
P total	0,75	< 0,05	93,3
CFT	3,38	0,740	78,1
Cl ⁻	649	297	54,2

*Generación de oxígeno.

Tabla E.11. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 100% aguas de lavado de aceitunas, Exp. 11 ALF. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,42	8,10	
CE (mS/cm)	2,7	1,91	29,3
ST (%)	0,320	0,00242	99,2
NO ₃ ⁻	0,801	0,578	27,8
SO ₄ ²⁻	414	134	67,6
NO ₂ ⁻	1,30	0,60	53,9
Mg ²⁺	47,0	31,0	34,0
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	1,91	< 0,05	97,4
DQO	535	271	49,3
O ₂ disuelto	2,65	6,10	130*
N total	3,40	2,90	14,7
P total	0,75	0,0588	92,3
CFT	3,38	1,10	67,5
Cl ⁻	649	418	35,6

*Generación de oxígeno.

Tabla E.12. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 100% aguas de lavado de aceitunas, Exp. 12 ALF. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,42	7,89	
CE (mS/cm)	2,7	1,83	32,2
ST (%)	0,320	0,00210	99,3
NO ₃ ⁻	0,801	0,621	22,5
SO ₄ ²⁻	414	128	69,1
NO ₂ ⁻	1,30	0,510	60,8
Mg ²⁺	47,0	32,6	30,6
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	1,91	< 0,05	97,4
DQO	535	262	51,0
O ₂ disuelto	2,65	6,68	152*
N total	3,40	2,79	17,9
P total	0,75	0,062	91,7
CFT	3,38	1,48	56,2
Cl ⁻	649	442	31,9

*Generación de oxígeno.

Tabla E.13. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 5% aguas de lavado de aceitunas, Exp. 1 ALA. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	6,29	8,72	
CE (mS/cm)	1,32	0,888	32,7
ST (%)	0,127	0,000859	99,3
NO ₃ ⁻	1,95	0,550	71,8
SO ₄ ²⁻	217	55,0	74,7
NO ₂ ⁻	0,387	0,145	62,5
Mg ²⁺	62,4	< 5,0	92,0
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	1,60	0,60	62,5
DQO 10 ⁻²	13,6	1,80	86,8
O ₂ disuelto	2,01	6,70	233*
N total	5,40	2,18	59,6
P total	1,63	< 0,05	96,9
CFT	11,1	0,660	94,1
Cl ⁻	172	50,0	70,9

*Generación de oxígeno.

Tabla E.14. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 5% aguas de lavado de aceitunas, Exp. 2 ALA. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	6,29	8,78	
CE (mS/cm)	1,32	0,955	27,7
ST (%)	0,127	0,000927	99,3
NO ₃ ⁻	1,95	0,591	69,7
SO ₄ ²⁻	217	60,0	72,4
NO ₂ ⁻	0,387	0,164	57,6
Mg ²⁺	62,4	< 5,0	92,0
NH ₄ ⁺	< 4,00	< 4,0	
Cu ²⁺	1,60	0,620	61,3
DQO 10 ⁻²	13,6	1,41	89,7
O ₂ disuelto	2,01	6,63	230*
N total	5,40	2,21	59,1
P total	1,63	< 0,05	96,9
CFT	11,1	0,540	95,1
Cl ⁻	172	51,0	70,4

*Generación de oxígeno.

Tabla E.15. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 10% aguas de lavado de aceitunas, Exp. 3 ALA. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	6,29	8,55	
CE (mS/cm)	1,32	0,977	26,0
ST (%)	0,127	0,00115	99,1
NO ₃ ⁻	1,95	0,620	68,2
SO ₄ ²⁻	217	63,0	71,0
NO ₂ ⁻	0,387	0,149	61,5
Mg ²⁺	62,4	5,70	90,9
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	1,60	0,780	51,3
DQO 10 ⁻²	13,6	2,10	84,6
O ₂ disuelto	2,01	5,40	169*
N total	5,40	2,59	52,0
P total	1,63	0,530	67,5
CFT	11,1	0,691	93,8
Cl ⁻	172	57,6	66,5

*Generación de oxígeno.

Tabla E.16. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 10% aguas de lavado de aceitunas, Exp. 4 ALA. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	6,29	8,62	
CE (mS/cm)	1,32	1,07	18,9
ST (%)	0,127	0,00117	99,1
NO ₃ ⁻	1,95	0,614	68,5
SO ₄ ²⁻	217	60,0	72,4
NO ₂ ⁻	0,387	0,181	53,2
Mg ²⁺	62,4	5,33	91,5
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	1,60	0,772	51,8
DQO 10 ⁻²	13,6	2,25	83,4
O ₂ disuelto	2,01	5,80	189*
N total	5,40	2,66	50,7
P total	1,63	0,510	68,7
CFT	11,1	0,620	94,4
Cl ⁻	172	59,0	65,7

*Generación de oxígeno.

Tabla E.17. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 20% aguas de lavado de aceitunas, Exp. 5 ALA. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	6,29	8,77	
CE (mS/cm)	1,32	1,01	23,5
ST (%)	0,127	0,00114	99,1
NO ₃ ⁻	1,95	0,630	67,7
SO ₄ ²⁻	217	63,0	71,0
NO ₂ ⁻	0,387	0,162	58,1
Mg ²⁺	62,4	9,60	84,6
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	1,60	0,518	67,6
DQO 10 ⁻²	13,6	2,30	83,1
O ₂ disuelto	2,01	6,90	243*
N total	5,40	2,28	57,8
P total	1,63	0,60	63,2
CFT	11,1	0,540	95,1
Cl ⁻	172	73,0	57,6

*Generación de oxígeno.

Tabla E.18. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 20% aguas de lavado de aceitunas, Exp. 6 ALA. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	6,29	8,42	
CE (mS/cm)	1,32	0,901	31,7
ST (%)	0,127	0,00106	99,2
NO ₃ ⁻	1,95	0,622	68,1
SO ₄ ²⁻	217	70,0	67,7
NO ₂ ⁻	0,387	0,159	58,9
Mg ²⁺	62,4	12,8	79,5
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	1,60	0,510	68,1
DQO 10 ⁻²	13,6	2,33	82,9
O ₂ disuelto	2,01	5,20	159*
N total	5,40	2,64	51,5
P total	1,63	0,582	64,3
CFT	11,1	0,580	94,8
Cl ⁻	172	74,2	56,9

*Generación de oxígeno.

Tabla E.19. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 30% aguas de lavado de aceitunas, Exp. 7 ALA. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	6,29	8,37	
CE (mS/cm)	1,32	0,955	27,7
ST (%)	0,127	0,00116	99,1
NO ₃ ⁻	1,95	0,70	64,1
SO ₄ ²⁻	217	73,0	66,4
NO ₂ ⁻	0,387	0,151	61,0
Mg ²⁺	62,4	11,6	81,4
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	1,60	0,50	68,8
DQO 10 ⁻²	13,6	1,51	88,9
O ₂ disuelto	2,01	5,90	193*
N total	5,40	2,94	45,6
P total	1,63	0,550	60,1
CFT	11,1	0,60	94,6
Cl ⁻	172	45,0	73,8

*Generación de oxígeno.

Tabla E.20. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 30% aguas de lavado de aceitunas, Exp. 8 ALA. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	6,29	8,39	
CE (mS/cm)	1,32	1,01	23,5
ST (%)	0,127	0,00132	99,0
NO ₃ ⁻	1,95	0,682	65,0
SO ₄ ²⁻	217	71,0	67,3
NO ₂ ⁻	0,387	0,141	63,6
Mg ²⁺	62,4	12,2	80,5
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	1,60	0,512	68,0
DQO 10 ⁻²	13,6	1,81	86,7
O ₂ disuelto	2,01	5,80	189*
N total	5,40	2,82	47,8
P total	1,63	0,535	67,2
CFT	11,1	0,540	95,1
Cl ⁻	172	40,0	76,7

*Generación de oxígeno.

Tabla E.21. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 50% aguas de lavado de aceitunas, Exp. 9 ALA. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	6,29	7,98	
CE (mS/cm)	1,32	0,993	24,8
ST (%)	0,127	0,00142	98,9
NO ₃ ⁻	1,95	0,770	60,5
SO ₄ ²⁻	217	74,0	65,9
NO ₂ ⁻	0,387	0,172	63,4
Mg ²⁺	62,4	17,3	72,3
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	1,60	0,730	54,4
DQO 10 ⁻²	13,6	2,82	79,3
O ₂ disuelto	2,01	5,60	179*
N total	5,40	3,23	40,2
P total	1,63	0,660	59,5
CFT	11,1	0,910	91,8
Cl ⁻	172	77,0	55,2

*Generación de oxígeno.

Tabla E.22. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 50% aguas de lavado de aceitunas, Exp. 10 ALA. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	6,29	8,05	
CE (mS/cm)	1,32	0,904	31,5
ST (%)	0,127	0,00152	98,8
NO ₃ ⁻	1,95	0,710	63,6
SO ₄ ²⁻	217	74,7	65,6
NO ₂ ⁻	0,387	0,166	57,1
Mg ²⁺	62,4	17,8	71,5
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	1,60	0,770	51,9
DQO 10 ⁻²	13,6	2,75	79,8
O ₂ disuelto	2,01	5,51	174*
N total	5,40	3,34	38,1
P total	1,63	0,630	61,4
CFT	11,1	0,871	92,2
Cl ⁻	172	72,0	58,1

*Generación de oxígeno.

Tabla E.23. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 100% aguas de lavado de aceitunas, Exp. 11 ALA. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	6,29	7,79	
CE (mS/cm)	1,32	1,01	23,5
ST (%)	0,127	0,00157	98,8
NO ₃ ⁻	1,95	0,980	49,7
SO ₄ ²⁻	217	93,0	57,1
NO ₂ ⁻	0,387	0,20	48,3
Mg ²⁺	62,4	32,6	47,8
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	1,60	0,940	41,3
DQO 10 ⁻²	13,6	2,87	78,9
O ₂ disuelto	2,01	5,90	194*
N total	5,40	3,82	29,3
P total	1,63	0,710	56,4
CFT	11,1	1,59	85,7
Cl ⁻	172	91,7	46,7

*Generación de oxígeno.

Tabla E.24. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 100% aguas de lavado de aceitunas, Exp. 12 ALA. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	6,29	8,07	
CE (mS/cm)	1,32	1,08	18,2
ST (%)	0,127	0,00155	98,8
NO ₃ ⁻	1,95	0,977	49,9
SO ₄ ²⁻	217	87,0	59,9
NO ₂ ⁻	0,387	0,230	40,6
Mg ²⁺	62,4	31,6	49,4
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	1,60	0,961	40,0
DQO 10 ⁻²	13,6	2,77	79,7
O ₂ disuelto	2,01	6,60	228*
N total	5,40	3,75	30,6
P total	1,63	0,720	55,8
CFT	11,1	1,72	84,5
Cl ⁻	172	92,5	46,2

*Generación de oxígeno.

Tabla E.25. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 50% aguas de lavado de aceitunas y 50% aguas residuales urbanas, Exp. 1 ALFRU. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,20	8,12	
CE (mS/cm)	6,11	4,02	34,2
ST (%)	3,11	0,0811	97,4
NO ₃ ⁻	19,3	5,66	70,7
SO ₄ ²⁻	217,5	59,3	72,7
NO ₂ ⁻	17,3	4,52	73,9
Mg ²⁺	22,8	5,10	78,0
NH ₄ ⁺	103	74,0	28,2
Cu ²⁺	< 0,05	< 0,05	
DQO 10 ⁻²	10,3	2,11	79,5
O ₂ disuelto	2,30	9,80	326*
N total	139	44,8	67,8
P total	8,71	4,10	52,9
CFT	0,558	0,180	67,7
Cl ⁻	822	167	79,7

*Generación de oxígeno.

Tabla E.26. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 50% aguas de lavado de aceitunas y 50% aguas residuales urbanas, Exp. 2 ALFRU. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,20	8,30	
CE (mS/cm)	6,11	4,28	30,0
ST (%)	3,11	0,0882	97,2
NO ₃ ⁻	19,3	5,12	73,5
SO ₄ ²⁻	217,5	52,1	76,0
NO ₂ ⁻	17,3	4,13	76,1
Mg ²⁺	22,8	5,21	77,1
NH ₄ ⁺	103	72,5	29,6
Cu ²⁺	< 0,05	< 0,05	
DQO 10 ⁻²	10,3	2,21	78,6
O ₂ disuelto	2,30	9,60	317*
N total	139	44,0	68,3
P total	8,71	4,45	55,3
CFT	0,558	0,210	62,4
Cl ⁻	822	159	80,7

*Generación de oxígeno.

Tabla E.27. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 30% aguas de lavado de aceites y 70% aguas residuales urbanas, Exp. 1 ALARU. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,22	7,30	
CE (mS/cm)	4,82	2,95	38,8
ST (%)	0,0981	0,00235	97,6
NO ₃ ⁻	24,5	4,25	82,7
SO ₄ ²⁻	114	31,2	72,6
NO ₂ ⁻	22,3	4,10	81,6
Mg ²⁺	25,4	11,8	53,5
NH ₄ ⁺	146	97,0	33,7
Cu ²⁺	0,397	< 0,05	87,4
DQO	510	89,0	82,5
O ₂ disuelto	3,10	6,30	103*
N total	186	45,3	75,6
P total	12,1	5,78	52,2
CFT	1,91	0,416	78,2
Cl ⁻	623	161	74,2

*Generación de oxígeno.

Tabla E.28. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 30% aguas de lavado de aceites y 70% aguas residuales urbanas, Exp. 2 ALARU. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,22	7,59	
CE (mS/cm)	4,82	3,01	37,6
ST (%)	0,0981	0,00242	97,5
NO ₃ ⁻	24,5	4,12	83,2
SO ₄ ²⁻	114	30,4	73,3
NO ₂ ⁻	22,3	3,66	83,6
Mg ²⁺	25,4	10,8	57,5
NH ₄ ⁺	146	92,5	36,6
Cu ²⁺	0,397	< 0,05	87,4
DQO	510	81,2	84,1
O ₂ disuelto	3,10	6,40	106*
N total	186	44,2	76,2
P total	12,1	4,99	58,8
CFT	1,91	0,422	77,9
Cl ⁻	623	154	75,3

*Generación de oxígeno.

Tabla E.29. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 15% aguas de lavado de aceitunas, 30% aguas de lavado de aceites y 55% aguas residuales urbanas, Exp. 1 ALFARU. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,21	8,70	
CE (mS/cm)	3,24	2,82	13,0
ST (%)	1,72	0,00309	99,8
NO ₃ ⁻	18,1	8,50	53,0
SO ₄ ²⁻	123	31,2	74,6
NO ₂ ⁻	16,2	11,6	28,4
Mg ²⁺	26,5	17,6	33,5
NH ₄ ⁺	187	84,0	55,1
Cu ²⁺	0,407	0,151	62,9
DQO	780	291	62,7
O ₂ disuelto	1,91	6,60	246*
N total	193	95,0	50,8
P total	9,05	6,50	28,2
CFT	6,01	1,38	77,0
Cl ⁻	710	199	72,0

*Generación de oxígeno.

Tabla E.30. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 15% aguas de lavado de aceitunas, 30% aguas de lavado de aceites y 55% aguas residuales urbanas, Exp. 2 ALFARU. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,21	8,40	
CE (mS/cm)	3,24	2,73	15,7
ST (%)	1,72	0,00311	99,8
NO ₃ ⁻	18,1	8,21	54,6
SO ₄ ²⁻	123	30,7	75,0
NO ₂ ⁻	16,2	11,3	30,3
Mg ²⁺	26,5	16,2	38,9
NH ₄ ⁺	187	88,0	52,9
Cu ²⁺	0,407	0,156	61,7
DQO	780	275	64,7
O ₂ disuelto	1,91	6,40	235*
N total	193	92,0	52,3
P total	9,05	5,70	37,0
CFT	6,01	1,44	76,0
Cl ⁻	710	197	72,3

*Generación de oxígeno.

Tabla E.31. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 20% aguas de lavado de aceitunas, 30% aguas de lavado de aceites y 50% aguas residuales urbanas, Exp. 3 ALFARU. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,25	8,14	
CE (mS/cm)	3,31	2,92	11,8
ST (%)	1,75	0,00315	99,8
NO ₃ ⁻	19,5	8,75	55,1
SO ₄ ²⁻	135	24,9	81,5
NO ₂ ⁻	16,8	11,2	33,3
Mg ²⁺	27,7	15,8	43,0
NH ₄ ⁺	208	94,0	54,8
Cu ²⁺	0,411	0,205	50,1
DQO	820	280	65,8
O ₂ disuelto	1,97	5,90	199*
N total	213	98,7	53,7
P total	10,1	4,10	59,4
CFT	6,40	1,49	76,7
Cl ⁻	779	240	69,2

*Generación de oxígeno.

Tabla E.32. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 20% aguas de lavado de aceitunas, 30% aguas de lavado de aceites y 50% aguas residuales urbanas, Exp. 4 ALFARU. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,25	8,01	
CE (mS/cm)	3,31	2,87	13,3
ST (%)	1,75	0,00318	99,8
NO ₃ ⁻	19,5	8,21	57,9
SO ₄ ²⁻	135	26,2	81,0
NO ₂ ⁻	16,8	10,6	36,9
Mg ²⁺	27,7	14,2	48,7
NH ₄ ⁺	208	97,0	53,4
Cu ²⁺	0,411	0,201	51,1
DQO	820	275	66,5
O ₂ disuelto	1,97	5,82	195*
N total	213	97,2	54,4
P total	10,1	4,80	52,5
CFT	6,40	1,51	76,4
Cl ⁻	779	244	68,7

*Generación de oxígeno.

Tabla E.33. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 50% aguas de lavado de aceitunas y 1% CO₂, Exp. 1 ALFC. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,48	8,17	
CE (mS/cm)	1,69	1,46	13,6
ST (%)	2,91	0,00137	99,9
NO ₃ ⁻	1,55	0,152	90,2
SO ₄ ²⁻	273	58,0	78,8
NO ₂ ⁻	0,209	0,0342	83,6
Mg ²⁺	26,2	< 5,0	80,9
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	< 0,05	< 0,05	
DQO	632	128	79,7
O ₂ disuelto	1,50	5,60	273*
N total	12,5	0,90	92,8
P total	0,325	0,20	38,5
CFT	0,915	0,51	44,3
Cl ⁻	458	105	77,1

*Generación de oxígeno.

Tabla E.34. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 50% aguas de lavado de aceitunas y 1% CO₂, Exp. 2 ALFC. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,48	8,05	
CE (mS/cm)	1,69	1,39	17,8
ST (%)	2,91	0,00134	99,9
NO ₃ ⁻	1,55	0,149	90,4
SO ₄ ²⁻	273	61,0	77,7
NO ₂ ⁻	0,209	0,0358	82,9
Mg ²⁺	26,2	< 5,0	80,9
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	< 0,05	< 0,05	
DQO	632	132	79,1
O ₂ disuelto	1,50	5,20	247*
N total	12,5	0,921	92,6
P total	0,325	0,242	25,5
CFT	0,915	0,485	47,0
Cl ⁻	458	110	76,0

*Generación de oxígeno.

Tabla E.35. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 50% aguas de lavado de aceitunas y 2% CO₂, Exp. 3 ALFC. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,48	7,98	
CE (mS/cm)	1,69	1,21	28,4
ST (%)	2,91	0,00161	99,9
NO ₃ ⁻	1,55	0,181	88,3
SO ₄ ²⁻	273	18,9	93,1
NO ₂ ⁻	0,209	0,102	51,2
Mg ²⁺	26,2	< 5,0	80,9
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	< 0,05	< 0,05	
DQO	632	125	80,2
O ₂ disuelto	1,50	5,32	255*
N total	12,5	0,750	94,0
P total	0,325	0,20	38,5
CFT	0,915	0,570	37,7
Cl ⁻	458	96,7	78,9

*Generación de oxígeno.

Tabla E.36. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 50% aguas de lavado de aceitunas y 2% CO₂, Exp. 4 ALFC. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,48	7,88	
CE (mS/cm)	1,69	1,32	21,9
ST (%)	2,91	0,00158	99,9
NO ₃ ⁻	1,55	0,177	88,6
SO ₄ ²⁻	273	20,7	92,4
NO ₂ ⁻	0,209	0,104	50,2
Mg ²⁺	26,2	< 5,0	80,9
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	< 0,05	< 0,05	
DQO	632	132	79,1
O ₂ disuelto	1,50	5,40	260*
N total	12,5	0,782	93,7
P total	0,325	0,192	40,9
CFT	0,915	0,564	38,4
Cl ⁻	458	96,0	79,0

*Generación de oxígeno.

Tabla E.37. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 50% aguas de lavado de aceitunas y 5% CO₂, Exp. 5 ALFC. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,48	8,19	
CE (mS/cm)	1,69	0,821	51,4
ST (%)	2,91	0,00355	99,9
NO ₃ ⁻	1,55	0,20	87,1
SO ₄ ²⁻	273	18,9	93,1
NO ₂ ⁻	0,209	0,110	47,4
Mg ²⁺	26,2	< 5,0	80,9
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	< 0,05	< 0,05	
DQO	632	172	72,8
O ₂ disuelto	1,50	6,50	333*
N total	12,5	0,361	97,1
P total	0,325	0,110	66,2
CFT	0,915	0,50	45,4
Cl ⁻	458	93,0	79,7

*Generación de oxígeno.

Tabla E.38. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 50% aguas de lavado de aceitunas y 5% CO₂, Exp. 6 ALFC. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,48	8,11	
CE (mS/cm)	1,69	0,791	53,2
ST (%)	2,91	0,00345	99,9
NO ₃ ⁻	1,55	0,180	88,4
SO ₄ ²⁻	273	18,4	93,3
NO ₂ ⁻	0,209	0,142	32,1
Mg ²⁺	26,2	< 5,0	80,9
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	< 0,05	< 0,05	
DQO	632	181	71,4
O ₂ disuelto	1,50	5,80	287*
N total	12,5	0,390	96,9
P total	0,325	0,100	69,2
CFT	0,915	0,450	50,8
Cl ⁻	458	95,0	79,3

*Generación de oxígeno.

Tabla E.39. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 50% aguas de lavado de aceitunas y 10% CO₂, Exp. 7 ALFC. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,48	7,87	
CE (mS/cm)	1,69	0,306	81,9
ST (%)	2,91	0,00344	99,9
NO ₃ ⁻	1,55	0,120	92,3
SO ₄ ²⁻	273	17,8	93,5
NO ₂ ⁻	0,209	0,111	46,9
Mg ²⁺	26,2	< 5,0	80,9
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	< 0,05	< 0,05	
DQO	632	173	72,9
O ₂ disuelto	1,50	6,20	313*
N total	12,5	0,380	97,0
P total	0,325	0,10	69,2
CFT	0,915	0,310	66,1
Cl ⁻	458	58,0	87,3

*Generación de oxígeno.

Tabla E.40. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 50% aguas de lavado de aceitunas y 10% CO₂, Exp. 8 ALFC. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,48	7,98	
CE (mS/cm)	1,69	0,301	82,2
ST (%)	2,91	0,00351	99,9
NO ₃ ⁻	1,55	0,122	92,1
SO ₄ ²⁻	273	17,4	93,6
NO ₂ ⁻	0,209	0,105	49,8
Mg ²⁺	26,2	< 5,0	80,9
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	< 0,05	< 0,05	
DQO	632	158	75,0
O ₂ disuelto	1,50	5,90	293*
N total	12,5	0,370	97,0
P total	0,325	0,108	66,7
CFT	0,915	0,280	69,4
Cl ⁻	458	62,0	86,5

*Generación de oxígeno.

Tabla E.41. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 50% aguas de lavado de aceitunas y 15% CO₂, Exp. 9 ALFC. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,48	8,13	
CE (mS/cm)	1,69	0,650	61,5
ST (%)	2,91	0,00559	99,8
NO ₃ ⁻	1,55	0,20	87,1
SO ₄ ²⁻	273	18,8	93,1
NO ₂ ⁻	0,209	0,114	45,5
Mg ²⁺	26,2	< 5,0	80,9
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	< 0,05	< 0,05	
DQO	632	271	57,1
O ₂ disuelto	1,50	6,0	300*
N total	12,5	2,60	79,2
P total	0,325	0,20	38,5
CFT	0,915	0,310	66,1
Cl ⁻	458	73,0	84,1

*Generación de oxígeno.

Tabla E.42. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 50% aguas de lavado de aceitunas y 15% CO₂, Exp. 10 ALFC. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,48	8,22	
CE (mS/cm)	1,69	0,580	65,7
ST (%)	2,91	0,00563	99,8
NO ₃ ⁻	1,55	0,217	86,0
SO ₄ ²⁻	273	17,9	93,4
NO ₂ ⁻	0,209	0,121	42,1
Mg ²⁺	26,2	< 5,0	80,9
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	< 0,05	< 0,05	
DQO	632	268	85,8
O ₂ disuelto	1,50	5,57	271*
N total	12,5	2,54	79,7
P total	0,325	0,241	25,8
CFT	0,915	0,330	63,9
Cl ⁻	458	77,0	83,2

*Generación de oxígeno.

Tabla E.43. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 50% aguas de lavado de aceites y 1% CO₂, Exp. 1 ALAC. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,41	8,37	
CE (mS/cm)	4,33	2,21	49,0
ST (%)	0,0766	0,00188	97,6
NO ₃ ⁻	0,625	0,221	64,6
SO ₄ ²⁻	165	71,0	57,0
NO ₂ ⁻	0,166	0,014	92,0
Mg ²⁺	46,5	12,1	74,0
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	1,19	< 0,05	95,8
DQO 10 ⁻²	10,1	2,88	71,4
O ₂ disuelto	2,05	6,70	227*
N total	1,36	0,295	78,3
P total	0,655	0,211	67,8
CFT	5,33	0,550	89,7
Cl ⁻	62,5	14,9	76,2

*Generación de oxígeno.

Tabla E.44. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 50% aguas de lavado de aceites y 1% CO₂, Exp. 2 ALAC. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,41	8,22	
CE (mS/cm)	4,33	2,18	
ST (%)	0,0766	0,00185	97,6
NO ₃ ⁻	0,625	0,210	66,4
SO ₄ ²⁻	165	68,0	58,8
NO ₂ ⁻	0,166	0,0171	89,7
Mg ²⁺	46,5	11,8	74,6
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	1,19	< 0,05	95,8
DQO 10 ⁻²	10,1	2,78	72,4
O ₂ disuelto	2,05	6,52	218*
N total	1,36	0,299	78,0
P total	0,655	0,209	68,1
CFT	5,33	0,510	90,4
Cl ⁻	62,5	15,3	75,5

*Generación de oxígeno.

Tabla E.45. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 50% aguas de lavado de aceites y 2% CO₂, Exp. 3 ALAC. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,41	8,26	
CE (mS/cm)	4,33	2,13	50,8
ST (%)	0,0766	0,00166	97,8
NO ₃ ⁻	0,625	0,120	80,8
SO ₄ ²⁻	165	78,0	52,7
NO ₂ ⁻	0,166	0,0121	92,7
Mg ²⁺	46,5	12,3	73,6
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	1,19	0,0501	95,8
DQO 10 ⁻²	10,1	1,36	86,5
O ₂ disuelto	2,05	6,80	232*
N total	1,36	0,168	87,7
P total	0,655	0,185	71,8
CFT	5,33	0,520	90,2
Cl ⁻	62,5	9,01	85,6

*Generación de oxígeno.

Tabla E.46. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 50% aguas de lavado de aceites y 2% CO₂, Exp. 4 ALAC. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,41	8,22	
CE (mS/cm)	4,33	2,10	51,5
ST (%)	0,0766	0,00167	97,8
NO ₃ ⁻	0,625	0,115	81,6
SO ₄ ²⁻	165	71,0	56,7
NO ₂ ⁻	0,166	0,0111	93,3
Mg ²⁺	46,5	12,2	73,8
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	1,19	0,0505	95,8
DQO 10 ⁻²	10,1	1,41	86,0
O ₂ disuelto	2,05	7,20	251*
N total	1,36	0,154	88,7
P total	0,655	0,181	72,4
CFT	5,33	0,60	88,7
Cl ⁻	62,5	9,11	85,4

*Generación de oxígeno.

Tabla E.47. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 50% aguas de lavado de aceites y 5% CO₂, Exp. 5 ALAC. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,41	8,05	
CE (mS/cm)	4,33	2,81	35,1
ST (%)	0,0766	0,00188	97,5
NO ₃ ⁻	0,625	0,094	85,0
SO ₄ ²⁻	165	72,0	56,3
NO ₂ ⁻	0,166	0,0112	93,2
Mg ²⁺	46,5	13,1	71,8
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	1,19	< 0,05	95,8
DQO 10 ⁻²	10,1	1,20	88,1
O ₂ disuelto	2,05	6,80	232*
N total	1,36	0,081	94,0
P total	0,655	0,095	85,5
CFT	5,33	0,390	92,7
Cl ⁻	62,5	6,10	90,2

*Generación de oxígeno.

Tabla E.48. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 50% aguas de lavado de aceites y 5% CO₂, Exp. 6 ALAC. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,41	8,01	
CE (mS/cm)	4,33	2,88	33,5
ST (%)	0,0766	0,00184	97,6
NO ₃ ⁻	0,625	0,091	85,4
SO ₄ ²⁻	165	71,0	57,0
NO ₂ ⁻	0,166	0,010	94,5
Mg ²⁺	46,5	12,4	73,3
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	1,19	< 0,05	95,8
DQO 10 ⁻²	10,1	1,15	88,6
O ₂ disuelto	2,05	6,60	222*
N total	1,36	0,080	94,1
P total	0,655	0,092	86,0
CFT	5,33	0,290	94,6
Cl ⁻	62,5	6,30	89,9

*Generación de oxígeno.

Tabla E.49. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 50% aguas de lavado de aceites y 10% CO₂, Exp. 7 ALAC. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,41	8,7	
CE (mS/cm)	4,33	2,95	31,9
ST (%)	0,0766	0,00285	96,3
NO ₃ ⁻	0,625	0,0524	91,6
SO ₄ ²⁻	165	62,0	50,3
NO ₂ ⁻	0,166	0,011	93,4
Mg ²⁺	46,5	12,5	73,1
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	1,19	< 0,05	95,8
DQO 10 ⁻²	10,1	1,12	88,9
O ₂ disuelto	2,05	6,20	202*
N total	1,36	0,052	96,2
P total	0,655	0,051	92,2
CFT	5,33	0,250	95,3
Cl ⁻	62,5	5,60	91,0

*Generación de oxígeno.

Tabla E.50. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 50% aguas de lavado de aceites y 10% CO₂, Exp. 8 ALAC. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,41	8,82	
CE (mS/cm)	4,33	2,90	33,0
ST (%)	0,0766	0,00293	96,2
NO ₃ ⁻	0,625	0,0492	92,1
SO ₄ ²⁻	165	65,0	60,1
NO ₂ ⁻	0,166	0,0121	92,7
Mg ²⁺	46,5	13,6	70,8
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	1,19	< 0,05	95,8
DQO 10 ⁻²	10,1	1,02	89,9
O ₂ disuelto	2,05	6,80	232*
N total	1,36	0,050	96,3
P total	0,655	0,0519	92,0
CFT	5,33	0,302	94,3
Cl ⁻	62,5	5,40	91,4

*Generación de oxígeno.

Tabla E.51. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 50% aguas de lavado de aceites y 15% CO₂, Exp. 9 ALAC. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,41	8,55	
CE (mS/cm)	4,33	2,11	51,3
ST (%)	0,0766	0,00376	95,1
NO ₃ ⁻	0,625	0,071	88,6
SO ₄ ²⁻	165	87,0	47,3
NO ₂ ⁻	0,166	0,0124	92,5
Mg ²⁺	46,5	14,6	68,6
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	1,19	< 0,05	95,8
DQO 10 ⁻²	10,1	2,78	72,4
O ₂ disuelto	2,05	6,0	193*
N total	1,36	0,250	81,6
P total	0,655	0,30	54,2
CFT	5,33	0,330	93,8
Cl ⁻	62,5	6,10	90,2

*Generación de oxígeno.

Tabla E.52. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 50% aguas de lavado de aceites y 15% CO₂, Exp. 10 ALAC. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,41	8,25	
CE (mS/cm)	4,33	2,31	46,7
ST (%)	0,0766	0,00371	95,2
NO ₃ ⁻	0,625	0,065	89,6
SO ₄ ²⁻	165	87,8	46,8
NO ₂ ⁻	0,166	0,0151	90,9
Mg ²⁺	46,5	13,6	70,8
NH ₄ ⁺	< 4,0	< 4,0	
Cu ²⁺	1,19	< 0,05	95,8
DQO 10 ⁻²	10,1	2,69	73,3
O ₂ disuelto	2,05	5,90	188*
N total	1,36	0,242	82,2
P total	0,655	0,311	52,5
CFT	5,33	0,343	93,6
Cl ⁻	62,5	6,89	89,0

*Generación de oxígeno.

Tabla E.53. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 50% aguas de lavado de aceitunas, 30% aguas de lavado de aceites, 50% aguas residuales urbanas y 10% CO₂, Exp. 1 ALFARUC. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,10	8,29	
CE (mS/cm)	6,32	4,55	28,0
ST (%)	1,91	0,0071	99,6
NO ₃ ⁻	20,1	6,28	68,80
SO ₄ ²⁻	217,5	136	37,5
NO ₂ ⁻	28,8	0,181	99,4
Mg ²⁺	29,7	< 5,0	83,2
NH ₄ ⁺	110	< 4,0	96,4
Cu ²⁺	0,478	< 0,05	89,5
DQO 10 ⁻²	18,3	2,59	85,8
O ₂ disuelto	2,90	5,60	93,1*
N total	146	4,20	97,1
P total	10,2	3,51	65,6
CFT	2,46	0,210	91,5
Cl ⁻	851	77,0	91,0

*Generación de oxígeno.

Tabla E.54. Reducción en los contenidos de compuestos contaminantes y de los parámetros físico-químicos en el cultivo realizado usando 50% aguas de lavado de aceitunas, 30% aguas de lavado de aceites, 50% aguas residuales urbanas y 10% CO₂, Exp. 2 ALFARUC. Medidas realizadas al inicio y al final del cultivo

Parámetro	[] inicial mg dm ⁻³	[] final mg dm ⁻³	Eliminado %
pH	7,10	8,21	
CE (mS/cm)	6,32	4,61	27,1
ST (%)	1,91	0,00631	99,7
NO ₃ ⁻	20,1	5,0	75,1
SO ₄ ²⁻	217,5	133	38,9
NO ₂ ⁻	28,8	0,16	99,4
Mg ²⁺	29,7	< 5,0	83,2
NH ₄ ⁺	110	< 4,0	96,4
Cu ²⁺	0,478	< 0,05	89,5
DQO 10 ⁻²	18,3	2,55	86,1
O ₂ disuelto	2,90	5,90	103*
N total	146	3,90	97,3
P total	10,2	3,78	62,9
CFT	2,46	0,280	88,6
Cl ⁻	851	80,0	90,6

*Generación de oxígeno.

