



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES

MASTER EN INGENIERIA AMBIENTAL

**MASTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL**  
**ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES**  
**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**ELIMINACION DE VIRUS DE AGUAS RESIDUALES UTILIZANDO  
REACTORES DE MICROALGAS EN CONTINUO.**

Autora: DÑA. MARIA GEMA ABAGA AKUE P  
Tutor: Dr. RAUL MUÑOZ TORRE  
Dr. ANTONIO LEÓN VAZ

Valladolid, septiembre, 2025



## Resumen:

Este estudio se centra en la evaluación del potencial de un fotobioreactor con *Chlorella vulgaris* para la eliminación de contaminantes virales presentes en aguas residuales domésticas. El periodo experimental tuvo una duración de 17 días, durante los cuales se monitorearon parámetros fisicoquímicos (pH, oxígeno disuelto y actividad fotosintética), junto con ensayos virales empleando al bacteriófago PhiX174 como virus modelo.

El sistema alcanzó una reducción viral promedio del 91,4 %, equivalente a 1,06 unidades logarítmicas, lo que demuestra la capacidad de *C. vulgaris* para disminuir de manera significativa la carga viral en aguas residuales. Los mecanismos de eliminación estarían relacionados con la adsorción de partículas virales en la biomasa algal, la generación de especies reactivas de oxígeno durante la fotosíntesis y las variaciones de pH inducidas por la actividad de la microalga.

Si bien también se evaluaron las eficiencias de eliminación de carbono orgánico e inorgánico y de nitrógeno, el principal resultado de este trabajo es la confirmación de que los fotobioreactores basados en microalgas representan una tecnología sostenible y prometedora para la eliminación simultánea de nutrientes y la inactivación viral en el tratamiento de aguas residuales.

**Palabras clave:** bacteriófago PhiX174, *Chlorella vulgaris*, eliminación viral, fotobioreactor, tratamiento de aguas residuales.

## Abstract:

This study focuses on the evaluation of the potential of a photobioreactor with *Chlorella vulgaris* to remove viral contaminants from domestic wastewater. The experimental period lasted for 17 days, during which physicochemical parameters (pH, dissolved oxygen, photosynthetic activity) were monitored alongside viral assays using bacteriophage PhiX174 as a model virus.

The system achieved an average viral reduction of 91.4%, corresponding to 1.06 log units, demonstrating the capacity of *C. vulgaris* to significantly reduce viral loads in wastewater. The removal mechanisms were likely related to viral adsorption onto algal biomass, reactive oxygen species generated during photosynthesis, and pH variations induced by algal activity. Although inorganic and organic carbon removal efficiencies were also monitored, the main outcome of this study is the confirmation that microalgae-based photobioreactors represent a promising eco-friendly technology for simultaneous nutrient removal and viral inactivation in wastewater treatment.

**Keywords:** bacteriophage PhiX174, *Chlorella vulgaris*, photobioreactor, viral removal, wastewater treatment



## Agradecimientos:

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a mi familia, quienes fueron las primeras personas en recibirme con su apoyo incondicional y acompañamiento durante mi viaje y estancia en España para realizar este máster, aunque estamos separados físicamente, su ánimo y fortaleza desde mi país han sido el motor que me impulsó a seguir adelante y alcanzar esta meta.

Asimismo, agradezco profundamente a mis tutores, Dr. Raúl Muñoz Torre y Dr. Antonio León Vaz, por su guía experta, paciencia, dedicación y apoyo constante durante la realización de este Trabajo Fin de Máster. Sus valiosas orientaciones, instrucciones claras y sus explicaciones detalladas para resolver todas mis dudas fueron fundamentales para el desarrollo y culminación exitosa de esta investigación.

También deseo manifestar mi gratitud al equipo del Instituto de Procesos Sostenibles, por brindarme los recursos y la colaboración necesarios que enriquecieron este trabajo.

De manera especial, agradezco a los profesores y formadores de la Escuela de Ingenierías Industriales, cuyo compromiso, profesionalismo y entrega durante todo el máster han sido esenciales para mi formación académica y personal, su apoyo y enseñanza han marcado una diferencia significativa en mi trayectoria.

Agradezco sinceramente la colaboración y respaldo de mis compañeros y amigos, quienes, con sus consejos, ánimo y apoyo e incluso cuando sentía rechazo, todos contribuyeron de una forma directa e indirecta a superar los retos de este proceso académico.



## ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. Microalgas .....	2
1.2. Tratamiento de aguas residuales urbanas con microalgas.....	3
1.3. Fotobiorreactores para el tratamiento de aguas residuales con microalgas.....	4
1.4. Tratamiento biológico de microorganismos patógenos en aguas residuales.....	9
1.5. Microalgas en la eliminación de virus.....	10
2. Objetivos .....	11
3. Materiales y Métodos .....	12
3.1. Microalgas utilizadas y condiciones de cultivo.....	12
3.1.2 Preparación del Preinóculo.....	12
3.1.3 Medio de Cultivo, Agua Residual Sintética (SWW).....	13
3.2. Toma de muestra y análisis fisicoquímico .....	15
3.3. Procedimientos analíticos.....	16
3.3.1. Densidad óptica (DO).....	16
3.3.2. pH.....	17
3.3.3. oxígeno disuelto.....	17
3.3.4. Actividad fotosintética (Qy).....	18
3.3.5. TOC, IC, NT .....	18
3.4. Microorganismos y cultivo en ensayos antivirales .....	19
3.4.1. Preparación y cultivo del bacteriófago PhiX174.....	19
3.4.2. Preparación y cultivo de <i>Escherichia coli</i> .....	19
3.4.3. Medios y patrones utilizados para los procesos de infección: .....	19
3.5. Ensayos de inactivación de virus .....	20
3.5.1 Procedimiento experimental de infección viral y preparación bacteriana .....	20
3.5.2 Proceso de infección viral .....	21
4. Resultados y discusiones.....	22
4.1 Evolución de la biomasa del sistema.....	23
4.2 Evolución de la eliminación de carbono en el fotobiorreactor.....	24
4.3 Evolución de la eliminación de nitrógeno en el fotobiorreactor .....	27
4.4 Eliminación de virus en el fotobiorreactor .....	28
5. Conclusiones .....	31
6. Recomendaciones y Trabajo futuro.....	32
7. Referencias Bibliográficas .....	33
Anexo.....	36



## INDICE DE TABLAS

Tabla 1: composición del Medio SK.....	12
Tabla 2: composición del SWW + solución de micronutrientes .....	14
Tabla 3: Toma de muestras y frecuencia de muestreo .....	16
Tabla 4: Preparación de Buffer de virus .....	20
Tabla 5: Preparación del Medio LB (25g/L).....	20

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fotografía de microalgas empleadas para el tratamiento de Aguas Residuales.....	2
Figura 2: Fotografía de Chlorella vulgaris. Fuente: imagen de dominio público o basada en micrografías comunes de referencia. ....	3
Figura 3: Fotobiorreactor de estanque circular con agitador pivotante, fuente: Adaptado de Ben-Amotz, A., National Institute of Oceanography (s.f.). .....	6
Figura 4: Esquema de un fotobiorreactor tipo raceway donde se observan la rueda de paletas para agitación, la entrada de nutrientes y CO <sub>2</sub> , y la salida de biomasa cultivada, Fuente: Adaptado de Ben-Amotz, A., National Institute of Oceanography (s.f.). .....	6
Figura 5: Esquema de un fotobiorreactor abierto tipo raceway con diseño serpenteante y rueda de paletas para agitación, Fuente: Adaptado de Ben-Amotz, A., National Institute of Oceanography (s.f.). .....	7
Figura 6: Fotobiorreactor Tubulares, Fuente: Autor con inspiración de (M. Carvajal Oses, J. Chacón Guzmán and A. Herrera Ulloa, 2018 y Diana Mayol 2020). .....	8
Figura 7: Fotobiorreactor de columna de burbujeo, Fuente: Autor con inspiración de (Dhotre & Joshi (2006) y Luis G Ramírez, Queiroz Zepka, Eduardo Jacob .....	8
Figura 8: Esquema de un fotobiorreactor de columna de burbujeo conectado en configuración cruzada, operado por bombas de aire para la circulación del cultivo, Fuente: Autor con inspiración de Ramírez et al., Queiroz Zepka y Eduardo Jacob.....	9
Figura 9: Simbiosis algas-bacterias. Fuente: realizado por el autor .....	10
Figura 10: Diagrama de Tratamiento convencional diseñado para la eliminación de virus con Microalgas: Fuente: realizado por el autor.....	15
Figura 11: Espectrofotómetro .....	17
Figura 12: Medidor del pH (pH-metro).....	17
Figura 13: Medidor del oxígeno disuelto .....	18
Figura 14: Medidor de la actividad fotosintética .....	18
Figura 15: Analizador de TOC .....	19
Figura 16: Termo Bloque y Figura 17: Agitador Orbital .....	20
Figura 18: Evolución de la DO medido a 600nm en UA en el FBR .....	23
Figura 19: Evolución de Qy (%) en el FBR. .....	23
Figura 20: Evolución de pH en el FBR. .....	24
Figura 21: Evolución de OD en el FBR .....	24
Figura 22: Evolución de la concentración de Carbono Orgánico Total .....	25
Figura 23: Eficiencia de eliminación del Carbono Orgánico Total .....	25
Figura 24: Evolución de la concentración de Carbono Inorgánico Total .....	26
Figura 25: Eficiencia de eliminación del Carbono inorgánico Total .....	26
Figura 26: Evolución de la concentración de Nitrógeno Total .....	27
Figura 27: Eficiencia de eliminación del Nitrógeno Total.....	28
Figura 28: Eficacia de eliminación de virus .....	29
Figura 29: Reducción de la concentración viral en el FBR .....	29
Figura 30: Reducción de virus.....	29



## Introducción.

Las aguas residuales urbanas representan un desafío ambiental y sanitario de creciente preocupación a nivel global debido a la presencia de contaminantes orgánicos, nutrientes y microorganismos patógenos, incluidos virus entéricos, bacterias resistentes a antibióticos y protozoos. La creciente urbanización y el cambio climático intensifican la presión sobre los sistemas convencionales de tratamiento, que en muchos casos resultan insuficientes para eliminar completamente estos contaminantes emergentes (Ferro et al., 2019).

En este contexto, la búsqueda de tecnologías sostenibles, eficientes y de bajo impacto ambiental ha cobrado especial relevancia. Dentro de las alternativas en estudio, los sistemas biológicos basados en microalgas se perfilan como una estrategia prometedora debido a su capacidad para combinar la depuración del agua con la generación de productos de valor añadido.

Este Trabajo Final de Máster se centra en la evaluación del potencial de *Chlorella vulgaris*, una microalga verde ampliamente estudiada, cultivada en un fotobiorreactor de laboratorio, como agente biológico para la eliminación de virus en aguas residuales sintéticas. Esta especie fue descrita por primera vez obteniendo cultivos puros en 1890 por el microbiólogo holandés Martinus Willem Beijerinck, y después Otto Warburg en 1919 obtuvo cultivos a densidades celular altas (Gómez Luna, 1997, p. 21).

El bacteriófago PhiX174 es un virus de ADN de cadena sencilla (ssDNA), perteneciente a la familia *Microviridae*. Infecta específicamente a cepas de *Escherichia coli* y ha sido ampliamente utilizado como virus indicador en estudios de eliminación viral, particularmente en contextos de tratamiento de aguas residuales. Su uso está respaldado por la norma ISO 10705-2, la cual recomienda a PhiX174 como un modelo de colifago somático para evaluar la eficacia de procesos de desinfección viral. Este virus es valorado por su pequeño tamaño (aproximadamente 25 nm), su morfología icosaédrica sin cola y su alta estabilidad en condiciones ambientales controladas.

Por otra parte, *E. coli* es una bacteria gramnegativa ampliamente distribuida en el intestino de animales de sangre caliente y se emplea comúnmente como organismo huésped en ensayos microbiológicos. Se estima que más del 90 % de los humanos portan *E. coli* en su tracto digestivo (Tenaillon et al., 2010). Esta especie se emplea comúnmente como organismo huésped modelo en ensayos microbiológicos debido a su facilidad de cultivo, su crecimiento rápido y su extensa caracterización genética (Blount, 2015). En este estudio, se utilizó como célula hospedadora para la replicación del bacteriófago PhiX174, así como para evaluar indirectamente la eficacia del sistema antiviral mediante la medición del efecto citopático del virus, aprovechando la relación bien documentada entre *E. coli*, los colifagos y la susceptibilidad fenotípica de cepas específicas (Michel et al., 2010).



## 1.1 Microalgas

Las microalgas son organismos fotosintéticos unicelulares capaces de convertir la energía solar en compuestos orgánicos a través de la fijación de CO<sub>2</sub> de la atmósfera para producir su propia biomasa mediante la fotosíntesis. Estos organismos pueden crecer en medios acuáticos muy diversos, incluidas aguas residuales, donde actúan como sumideros de nutrientes y otros contaminantes (Uggetti et al., 2018). Se habla de la existencia de más de 30.000 especies de microalgas y solo alrededor de 100 han sido estudiadas. Estos microorganismos tienen la capacidad de utilizar la luz como fuente de energía y los compuestos orgánicos (microalgas heterótrofas) o carbonos inorgánicos como fuente de carbono (microalgas autótrofas).

Además de su aplicación en el tratamiento de aguas residuales, las microalgas poseen un gran potencial en diversas áreas de la biotecnología. Su capacidad para producir compuestos bioactivos como lípidos, proteínas, polisacáridos y pigmentos ha permitido su utilización en la producción de biocombustibles, nutracéuticos, cosméticos, alimentos funcionales y productos farmacéuticos (Spolaore et al., 2006; Mata et al., 2010), Por ejemplo, especies como *Chlorella* y *Spirulina* se emplean comercialmente como suplementos alimenticios debido a su alto contenido proteico y valor nutricional (Becker, 2007).

Asimismo, algunas microalgas son capaces de sintetizar sustancias antimicrobianas y antioxidantes con aplicaciones médicas (Raposo et al., 2013). En el ámbito energético, su cultivo se estudia como alternativa sostenible para la producción de biodiésel, biogás y biohidrógeno, ya que pueden generar grandes cantidades de lípidos bajo ciertas condiciones de estrés (Chisti, 2007; Brennan & Owende, 2010). Estas múltiples aplicaciones convierten a las microalgas en una herramienta biotecnológica clave para afrontar desafíos ambientales, energéticos y alimentarios en el contexto del desarrollo sostenible.

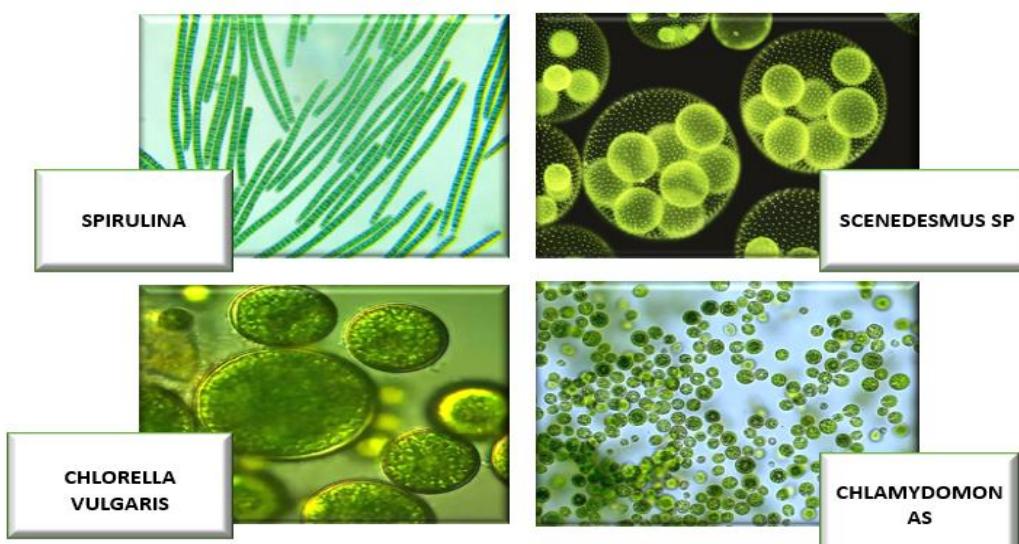
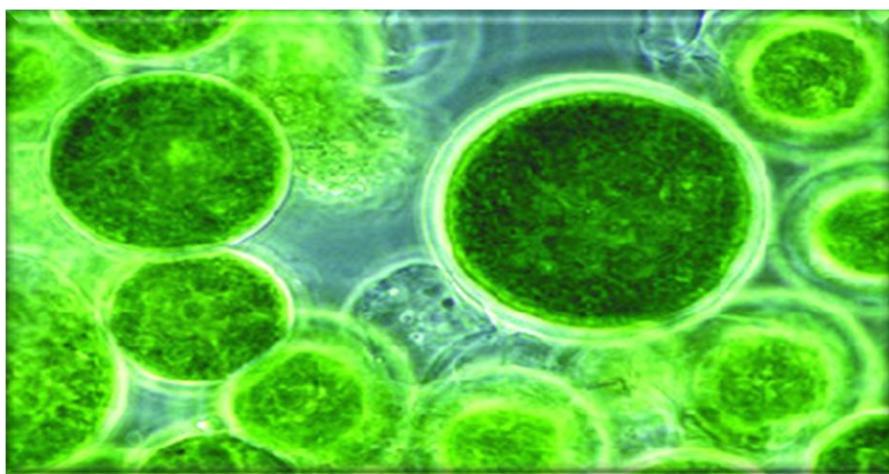


Figura 1: Fotografía de microalgas empleadas para el tratamiento de Aguas Residuales.

De entre todas las especies de microalgas, *Chlorella vulgaris* es una microalga clorofita que presenta una morfología esférica, un tamaño que oscila entre 2 y 10 µm, y carece de flagelos. Gracias a su elevada eficiencia fotosintética, es capaz de absorber nutrientes y metabolizar diversos contaminantes, lo que la convierte en una excelente candidata para aplicaciones en el



tratamiento de aguas residuales. *Chlorella vulgaris*, en particular, destaca por su robustez, alta productividad, adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales y capacidad para acumular biomoléculas bioactivas como polisacáridos sulfatados, péptidos, pigmentos y lípidos (Markou et al., 2014). Además de su uso en la producción de biomasa para biocombustibles y biofertilizantes, *Chlorella vulgaris* ha demostrado ser eficaz en procesos de depuración debido a su alta tasa de crecimiento y su resistencia a condiciones ambientales adversas.



**Figura 2:** Fotografía de *Chlorella vulgaris*. Fuente: imagen de dominio público o basada en micrografías comunes de referencia.

## **1.2 Tratamiento de aguas residuales urbanas con microalgas**

El tratamiento de aguas residuales representa uno de los desafíos más críticos dentro de la gestión hídrica moderna, particularmente ante el crecimiento sostenido de la población y el incremento en la demanda de agua de calidad. Este escenario ha impulsado la búsqueda de soluciones sostenibles que no solo permitan la depuración eficiente del recurso, sino que también fomenten la recuperación de compuestos valiosos, en consonancia con los principios de la economía circular (Hernández-Sancho et al., 2015). En este contexto, las microalgas han emergido como una alternativa biotecnológica prometedora, debido a su capacidad para remover contaminantes tanto orgánicos como inorgánicos, además de capturar nutrientes esenciales como nitrógeno y fósforo presentes en las aguas residuales (Rawat et al., 2011).

El uso de microalgas en este campo tiene sus antecedentes en la década de 1950, cuando Oswald y Gotaas (1957) desarrollaron un sistema de tratamiento mediante lagunas de alta carga, combinando algas y bacterias en un entorno simbiótico para mejorar la eficiencia del proceso. Desde entonces, numerosos estudios han demostrado el potencial de estos microorganismos fotosintéticos en la eliminación de nutrientes, en particular en aguas residuales urbanas (de-Bashan & Bashan, 2010), lo que ha generado un creciente interés en su aplicación a escala industrial a partir de estos antecedentes.

El tratamiento de aguas residuales con microalgas se basa en la utilización de organismos unicelulares fotosintéticos que crecen en medios ricos en nutrientes, como los efluentes urbanos, y transforman los contaminantes en biomasa valiosa (Jácome-Pilco et al., 2021). Este proceso se desarrolla comúnmente en fotobiorreactores abiertos o cerrados, donde las microalgas asimilan compuestos nitrogenados —como amonio y nitratos—, fósforo (en forma de fosfatos), así como carbono orgánico e inorgánico, contribuyendo a la mitigación del



fenómeno de eutrofización en los cuerpos receptores. Además, estos sistemas reducen significativamente el consumo energético, ya que utilizan la luz solar como fuente primaria de energía para la fotosíntesis, evitando el alto gasto en aireación mecánica característico de los tratamientos convencionales con lodos activados (González Ramírez, 2020). También representan una ventaja ambiental importante al permitir la fijación de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), a diferencia de los sistemas tradicionales que lo emiten como subproducto de la oxidación biológica (Pachés Giner & González Camejo, 2022), lo que convierte al proceso en una herramienta de mitigación frente al cambio climático.

Diversas investigaciones han reportado eficiencias superiores al 80 % en la remoción de nutrientes utilizando cultivos de *C. vulgaris*, con el beneficio adicional de generar biomasa que puede ser utilizada en la producción de biocombustibles, fertilizantes o alimentación animal, cerrando así el ciclo de nutrientes (Abdel-Raouf et al., 2012; Ferro et al., 2019; Rawat et al., 2011). No obstante, su aplicación práctica enfrenta varios desafíos, entre ellos la selección adecuada de cepas algales, el control del crecimiento, los requerimientos de espacio y los costos asociados al cosechado y recuperación de biomasa. Las células de microalgas presentan tamaños reducidos y densidades similares a la del agua, lo que complica su separación y puede requerir tecnologías de alto consumo energético (Ortiz-Villota et al., 2018; Lobos Briones, 2019). Así mismo, la necesidad de grandes superficies para instalar fotobiorreactores limita su implementación en zonas urbanas, siendo necesario el desarrollo de tecnologías más compactas, como sistemas verticales, que, aunque más eficientes, presentan elevados costos de inversión.

### **1.3 Fotobiorreactores para el tratamiento de aguas residuales con microalgas**

Los fotobiorreactores (FBR) son sistemas diseñados para favorecer el crecimiento de microorganismos fotosintéticos, como microalgas y cianobacterias, mediante la captación de luz —natural o artificial en condiciones controladas.

Estos organismos convierten el dióxido de carbono y nutrientes inorgánicos presentes en el medio en biomasa, a través del proceso fotosintético, generando compuestos con aplicaciones energéticas, farmacéuticas y medioambientales (Uggetti et al., 2014; Rawat et al., 2011).

El rendimiento de un fotobiorreactor depende en gran medida de su diseño, el cual debe ser adaptado en función de la especie microalgal cultivada, los objetivos del proceso y la escala de aplicación (Suali & Sarbatly, 2012). En términos generales, los FBR pueden clasificarse en dos grandes categorías: fotobiorreactores cerrados (FBC) y fotobiorreactores abiertos (FBA), cada uno con características, ventajas y limitaciones particulares.

La eficiencia de estos sistemas depende en gran medida del diseño del fotobiorreactor, que debe adaptarse al tipo de microalga, la finalidad del cultivo y la escala de operación (Suali & Sarbatly, 2012).

#### **1.3.1 Fotobiorreactores abiertos (FBA)**

En el marco del presente trabajo, se ha utilizado un FBA a escala de laboratorio. El sistema experimental consta de un recipiente cilíndrico abierto que permite la exposición directa a una fuente de iluminación artificial fluorescente, dispuesta de forma controlada para simular un fotoperiodo constante. El cultivo se mantiene en agitación mediante un agitador magnético, lo que favorece la homogeneización del medio y evita la sedimentación celular. El reactor se



apoya sobre una placa agitadora con control térmico, que proporciona estabilidad en las condiciones físicas del cultivo.

Los FBA operan en sistemas parcialmente expuestos al ambiente, como canales abiertos, estanques o recipientes sin cubierta que los separe de la atmósfera. Si bien ofrecen un menor grado de control sobre las condiciones internas, su bajo coste de construcción y operación, junto con la simplicidad de su diseño, los convierte en una opción muy atractiva para aplicaciones a gran escala, especialmente en el ámbito del tratamiento de aguas residuales y la producción de biomasa para fines no alimentarios (Borowitzka, 1999).

Estos sistemas suelen utilizar luz solar como fuente principal de energía, aunque también pueden emplear iluminación artificial en condiciones de laboratorio. Debido a su apertura, están más expuestos a la evaporación, fluctuaciones de temperatura, contaminación por otros organismos y pérdida de CO<sub>2</sub>, por lo que requieren un manejo riguroso para asegurar su eficacia. A pesar de estas limitaciones, los FBA son altamente funcionales en procesos donde no se requiere un estricto control de la esterilidad, y resultan particularmente adecuados para el cultivo de especies robustas y resistentes.

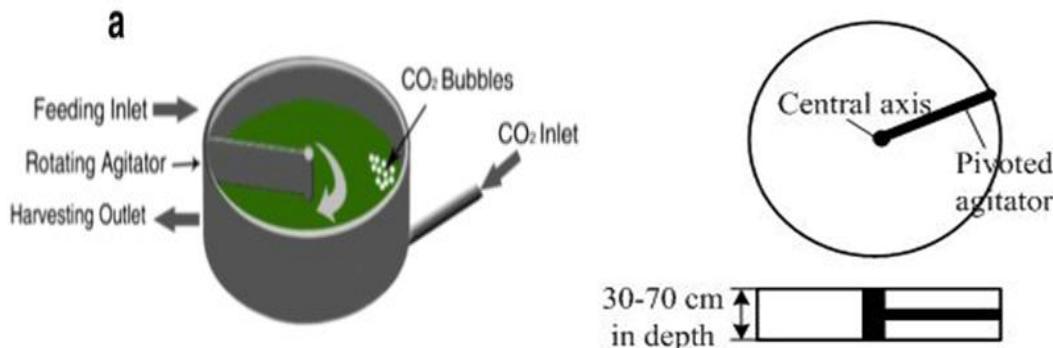
El uso de un FBA responde al objetivo de reproducir, en condiciones controladas, las características operativas de los sistemas abiertos que se utilizan habitualmente en el tratamiento de aguas residuales. Este enfoque permite evaluar la eficiencia del sistema bajo condiciones más realistas en cuanto a su exposición ambiental, al tiempo que mantiene un grado suficiente de control para el monitoreo experimental.

Además, esta elección se alinea con los principios de sostenibilidad y economía circular, al permitir la valorización de aguas residuales a través del cultivo de microalgas, generando biomasa con potencial uso en aplicaciones medioambientales y biotecnológicas (Christenson & Sims, 2011).

El uso de FBRs en este tipo de aplicaciones se alinea con los principios de sostenibilidad y economía circular, al permitir la valorización de aguas residuales mediante la producción de biomasa con valor añadido, contribuyendo a una gestión más eficiente de los recursos naturales (Christenson & Sims, 2011).

### **1.3.1.1-Fotobiorreactor de estanque circular con agitador pivotante:**

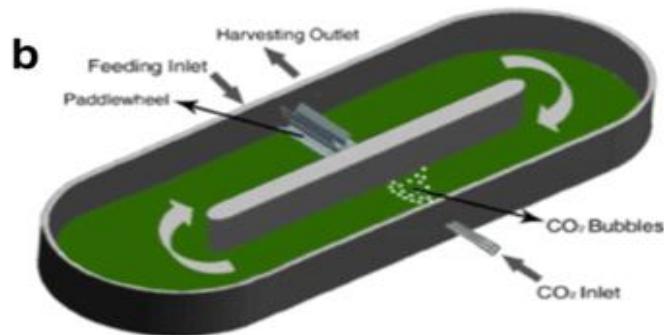
Este tipo de fotobiorreactor consiste en una estructura de forma circular o anular que permite el movimiento continuo del cultivo microalgal mediante un eje giratorio central o un agitador pivotante. Su diseño facilita una distribución homogénea de la biomasa y de los nutrientes, así como una exposición uniforme a la luz. La agitación evita la sedimentación de las microalgas y mejora el intercambio gaseoso entre el medio y la atmósfera. Este sistema ha sido utilizado con éxito en instalaciones experimentales y comerciales debido a su eficiencia hidráulica y simplicidad mecánica (Pulz & Gross, 2004; Molina Grima et al., 1999).



**Figura 3:** Fotobiorreactor de estanque circular con agitador pivotante, fuente: Adaptado de Ben-Amotz, A., National Institute of Oceanography (s.f.).

#### **1.3.1.2-Fotobiorreactor tipo raceway:**

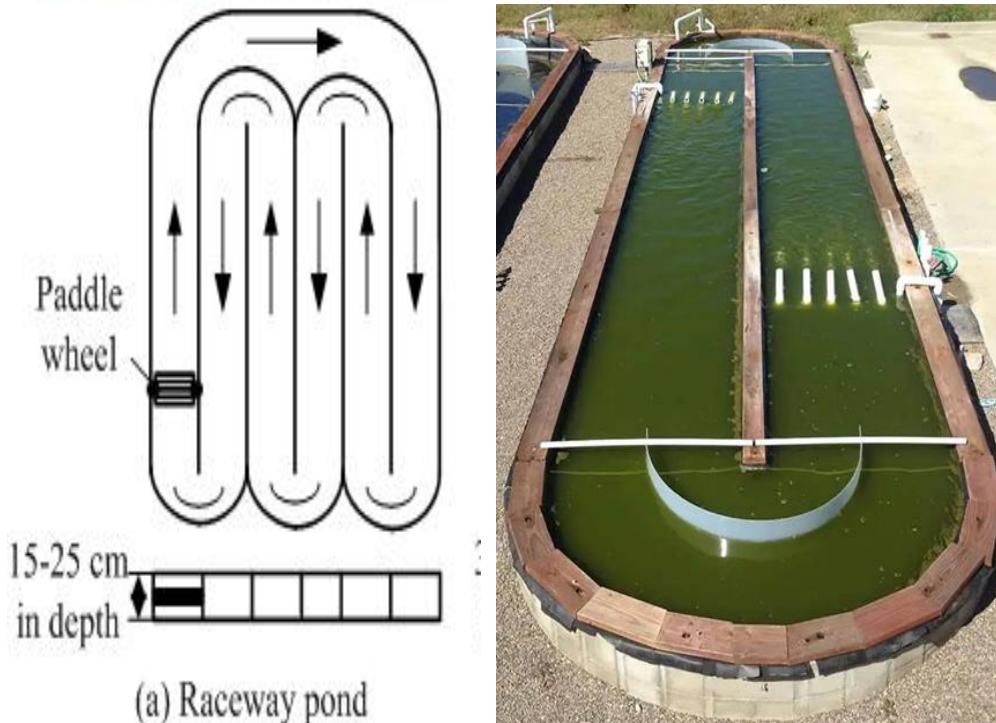
El fotobiorreactor tipo raceway es uno de los sistemas abiertos más extendidos para la producción de microalgas a gran escala. Está constituido de un canal poco profundo con forma de óvalo o pista de carreras, en el que el cultivo es impulsado por una rueda de paletas que genera un flujo constante. Esta circulación promueve la mezcla homogénea, mejora la exposición a la luz y facilita la aireación del medio. Aunque presenta ciertas limitaciones en el control de contaminación y en la eficiencia lumínica, su bajo coste y fácil escalado lo hacen idóneo para aplicaciones industriales (Chisti, 2007; Singh & Sharma, 2012).



**Figura 4:** Esquema de un fotobiorreactor tipo raceway donde se observan la rueda de paletas para agitación, la entrada de nutrientes y CO<sub>2</sub>, y la salida de biomasa cultivada, Fuente: Adaptado de Ben-Amotz, A., National Institute of Oceanography (s.f.).

#### **1.3.1.3-Fotobiorreactor abierto tipo Raceway con diseño serpenteante:**

Una variante del sistema raceway tradicional es el diseño serpenteante, en el que el canal presenta un trayecto más largo y estrecho, con curvas que obligan al cultivo a seguir un flujo más complejo. Este diseño favorece un mayor tiempo de residencia y una mejor distribución de la luz a lo largo del recorrido. Además, permite optimizar el espacio disponible en instalaciones con restricciones de superficie. La agitación sigue realizándose mediante una rueda de paletas, que asegura el movimiento continuo del cultivo (Park et al., 2011; Christenson & Sims, 2011). Este tipo de fotobiorreactor ha sido explorado en estudios recientes para mejorar la eficiencia del proceso fotosintético en condiciones semicontroladas.



**Figura 5:** Esquema de un fotobiorreactor abierto tipo raceway con diseño serpenteante y rueda de paletas para agitación, Fuente: Adaptado de Ben-Amotz, A., National Institute of Oceanography (s.f.).

### 1.3.2 Fotobiorreactores cerrados:

Los FBC (véase figura 6,7) proporcionan un entorno altamente controlado que permite regular parámetros clave como la intensidad y duración de la iluminación, la temperatura, el pH, la concentración de CO<sub>2</sub> y la agitación. Este tipo de configuración reduce significativamente el riesgo de contaminación por agentes externos y permite mantener cultivos monoespecíficos en condiciones estables (Mata et al., 2010).

Desde una perspectiva de diseño, los FBR cerrados se pueden clasificar en diferentes tipos, cada uno con ventajas particulares:

**1.3.2.1-Fotobiorreactores tubulares** se componen de tubos transparentes dispuestos en circuitos horizontales o verticales. Ofrecen una alta superficie de captación lumínica, pero requieren una gestión eficiente del oxígeno disuelto y del gradiente de luz a lo largo del sistema (Tredici, 2004).

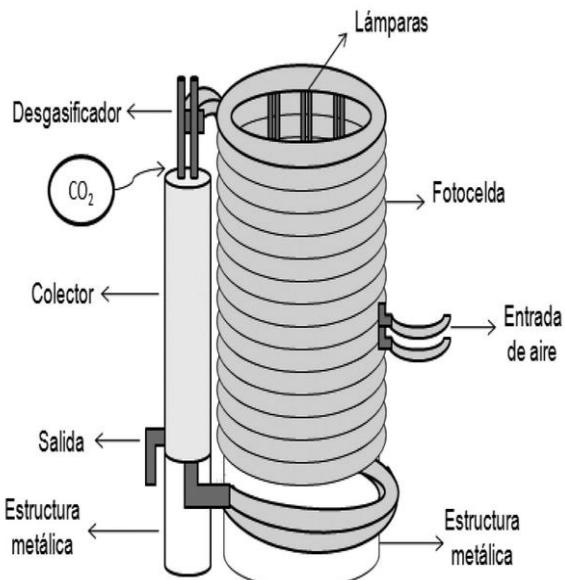


Figura 6: Fotobioreactor Tubulares, Fuente: Autor con inspiración de (M. Carvajal Oses, J. Chacón Guzmán and A. Herrera Ulloa, 2018 y Diana Mayol 2020).

**1.3.2.2-Fotobioreactores de columna de burbujeo**, presentan una geometría cilíndrica vertical en la que el cultivo se mezcla mediante la inyección de aire o gas rico en CO<sub>2</sub>. Son sencillos de operar y adecuados para cultivos a pequeña o mediana escala (Chisti, 2007).

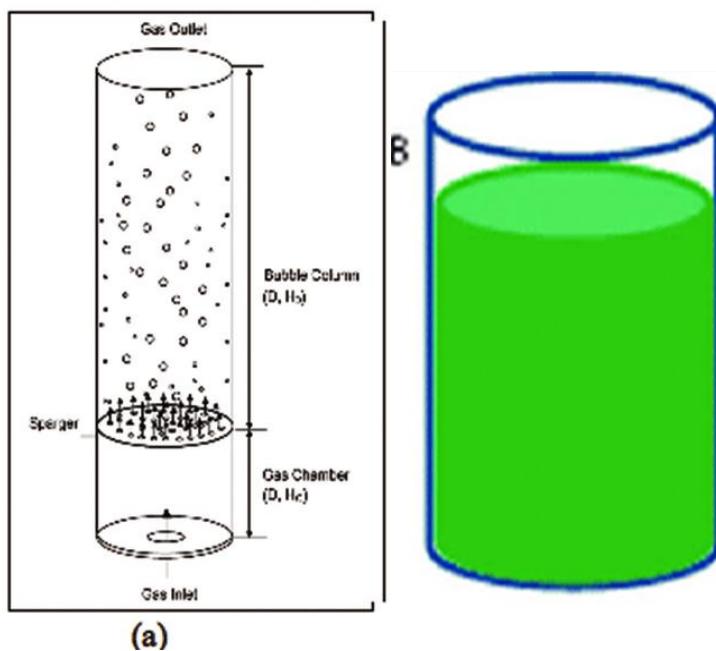


Figura 7: Fotobioreactor de columna de burbujeo, Fuente: Autor con inspiración de (Dhotre & Joshi (2006) y Luis G Ramírez, Queiroz Zepka, Eduardo Jacob

**1.3.2.3-Diseños Híbridos**, combinan elementos de los anteriores con el objetivo de optimizar tanto la exposición a la luz como el consumo energético y la homogeneidad del cultivo (Pulz, 2001).



**Figura 8:** Esquema de un fotobiorreactor de columna de burbujeo conectado en configuración cruzada, operado por bombas de aire para la circulación del cultivo, Fuente: Autor con inspiración de Ramírez et al., Queiroz Zepka y Eduardo Jacob.

En el ámbito del tratamiento de aguas residuales, los fotobiorreactores han demostrado ser una herramienta prometedora al permitir la integración de procesos fotosintéticos con mecanismos de depuración física, química y biológica. Las microalgas pueden remover eficientemente compuestos nitrogenados ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) y fosfatos, lo cual contribuye significativamente a la mejora de la calidad del agua (Pittman et al., 2011), además al captar  $\text{CO}_2$  durante la fotosíntesis y liberar oxígeno, crean un entorno favorable para procesos aeróbicos de oxidación de la materia orgánica.

#### **1.4. Tratamiento biológico de microorganismos patógenos en aguas residuales**

El tratamiento biológico convencional de aguas residuales se basa en el uso de comunidades microbianas para degradar la materia orgánica y eliminar contaminantes. Sin embargo, la eliminación de patógenos, especialmente virus, continúa siendo un reto importante. Muchos virus entéricos, como adenovirus, norovirus y enterovirus, presentan una alta resistencia a tratamientos físicos y químicos como la cloración o la radiación ultravioleta, lo que aumenta el riesgo de su liberación al medio ambiente (WHO, 2022). Además, algunos de estos métodos generan subproductos tóxicos con efectos adversos para la salud y los ecosistemas acuáticos. Por ello, se están explorando alternativas basadas en mecanismos biológicos y compuestos naturales con actividad antimicrobiana.

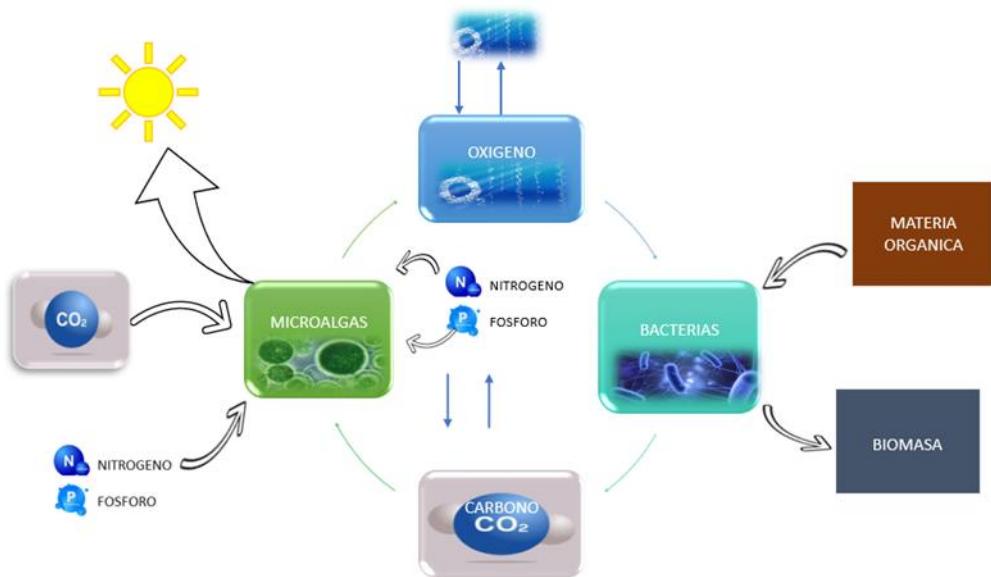


Figura 9: Simbiosis algas-bacterias. Fuente: realizado por el autor

### 1.5. Microalgas en la eliminación de virus

Diversos estudios han demostrado que ciertas especies de microalgas, como *C. vulgaris*, pueden contribuir a la eliminación de virus presentes en aguas residuales durante su cultivo en sistemas como fotobioreactores abiertos. Este efecto puede deberse a varios mecanismos, incluyendo la adsorción de partículas virales a la biomasa algal, la producción de oxígeno y especies reactivas del oxígeno (ROS), así como cambios en el pH del medio que afectan la viabilidad viral (Shirasaki et al., 2016; Lee et al., 2020).

La aplicación de microalgas en procesos de tratamiento terciario representa una alternativa sostenible y ecológica para la reducción de virus resistentes. En este trabajo se propone evaluar experimentalmente la capacidad de eliminación del bacteriófago PhiX174 modelo viral comúnmente utilizado por su estabilidad y similitud estructural con virus entéricos humanos (USEPA, 2016) en un sistema de cultivo de *C. vulgaris* bajo condiciones controladas en fotobioreactores abiertos.



## 2. Objetivos:

El presente trabajo tiene como objetivo general evaluar la eficacia del cultivo de *C. vulgaris* en sistemas FBA para la eliminación de virus en aguas residuales domésticas, utilizando el bacteriófago PhiX174 como virus modelo.

Este objetivo general se desarrolla a través de los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar la eficiencia de eliminación de carbono y nitrógeno del fotobiorreactor operado en continuo.
2. Evaluar la reducción de la viabilidad del bacteriófago PhiX174 durante el cultivo de *C. vulgaris*.
3. Analizar los posibles mecanismos implicados en la inactivación viral.



### 3. Materiales y Métodos:

Los estudios realizados en este Trabajo fin de Máster se llevaron a cabo en el Instituto de Procesos Sostenible de la Universidad de Valladolid, situada en la Provincia de Valladolid, España. El objetivo principal de esta investigación fue evaluar la eficacia de microalgas en la eliminación de virus en aguas residuales en reactores operados en régimen continuo. Para ello, se utilizó agua residual sintética y se confirmó la capacidad de las microalgas de asimilar diferentes nutrientes, así como de inactivar virus en el medio.

#### 3.1 Microalgas utilizadas y condiciones de cultivo

En el presente estudio se trabajó con un inóculo de *Chlorella vulgaris SAG 211-11b*, una microalga verde unicelular obtenida de la colección de cultivos SAG Culture Collection of Algae (Alemania). Esta microalga verde es ampliamente reconocida por su capacidad para mejorar la calidad de aguas eutróficas debido a su alta eficiencia en la absorción de nutrientes como nitrógeno y fósforo.

Los cultivos se realizaron en condiciones controladas, con una temperatura de 25°C y un fotoperiodo (luz/oscuridad), bajo agitación constante para garantizar una distribución homogénea de nutrientes y luz. El medio de cultivo empleado para el estudio de crecimiento del alga fue el Medio mineral SK, cuya composición y preparación se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1: composición del Medio SK.

Composición	Concentración (g/L)	Composición	Concentración (g/L)
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	6,25	Co (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,0049
K <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	1,25	EDTA	0,5
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,1105	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,624
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,1142	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,3251
F <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,0498	Glucosa	312,5
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,0882	Peptona	6,25
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,0144	Extracto de levadura	6,25
Oxido Molinelo (MoO <sub>3</sub> )	0,0071	-	-
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0157	-	-

#### 3.1.2 Preparación del Preinóculo

El preinóculo se preparó siguiendo los siguientes pasos para garantizar un cultivo inicial viable:



Se disolvieron los componentes de las soluciones 1 y 2 en 1000mL de agua tipo 1 bajo agitación constante, siguiendo la composición descrita anteriormente. El medio preparado se transfirió a un recipiente estéril y se autoclavó a 121°C durante 15min. Se añadió la solución 3, previamente esterilizada por filtración o autoclave, en condiciones asépticas. En ausencia de esta solución, se injectó CO<sub>2</sub> gaseoso al 3% (30mL) para promover el crecimiento fotosintético. En una cabina de flujo laminar, se inoculó una cantidad controlada de *Chlorella vulgaris* SAG 211-11b en el medio estéril, el recipiente se selló para evitar contaminación. El preinóculo se incubó a 25°C con un fotoperiodo (luz/oscuridad) y agitación constante. El crecimiento se monitoreó mediante mediciones de densidad óptica a 600nm. Una vez alcanzada una densidad óptica adecuada (0.9–1.0 UA), el preinóculo se consideró listo para transferirse al cultivo principal. Tras la preparación del preinóculo, se procedió al cultivo principal. La solución 3 se añadió al medio estéril en condiciones asépticas. En caso de no disponer de la solución 3, se suministró CO<sub>2</sub> al 3% (30mL) para crear una atmósfera enriquecida que favorezca el crecimiento fotosintético. El cultivo se mantuvo a 25°C con un fotoperiodo (luz/oscuridad) y agitación constante, los recipientes se sellaron tras cada etapa para evitar contaminación.

### 3.1.3 Agua Residual Sintética

El cultivo de la microalga *C. vulgaris* se llevó a cabo en un agua residual sintética (SWW), cuya composición del medio SWW se basó en una adaptación del medio BG11, siguiendo el protocolo descrito por Ferro et al. (2019). Este medio fue formulado para simular las características fisicoquímicas del agua residual urbana, y para minimizar las fluctuaciones en la composición del medio y mantener condiciones estables durante todo el experimento. Adicionalmente, se añadió 1 mL/L de una solución de micronutrientes al SWW, con el fin de proporcionar los elementos esenciales para el crecimiento y funcionamiento metabólico de *C. vulgaris*. Estos micronutrientes que incluyen hierro, manganeso, zinc, cobre, entre otros, son fundamentales para procesos como la fotosíntesis, la síntesis de proteínas y el mantenimiento celular. Su adición garantiza un desarrollo de las microalgas y una alta productividad dentro del sistema de tratamiento. La composición del SWW viene descrita en la Tabla 2:



Tabla 2: composición del SWW + solución de micronutrientes

Composición	Concentración (g/L)	Composición micronutrientes	Concentración (g/L)
Glucosa	0,625	Ácido cítrico	6
NaHCO <sub>3</sub>	0,7	Citrato férrico de amonio	6
Peptona	0,16	EDTA. Na <sub>2</sub>	1-1,27
Extracto de Carne	0,11	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86
NH <sub>4</sub> Cl	0,15	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,81
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,04	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,39
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,075	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,08
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,036	Co (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,05
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,02	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,22

### Planta Piloto:

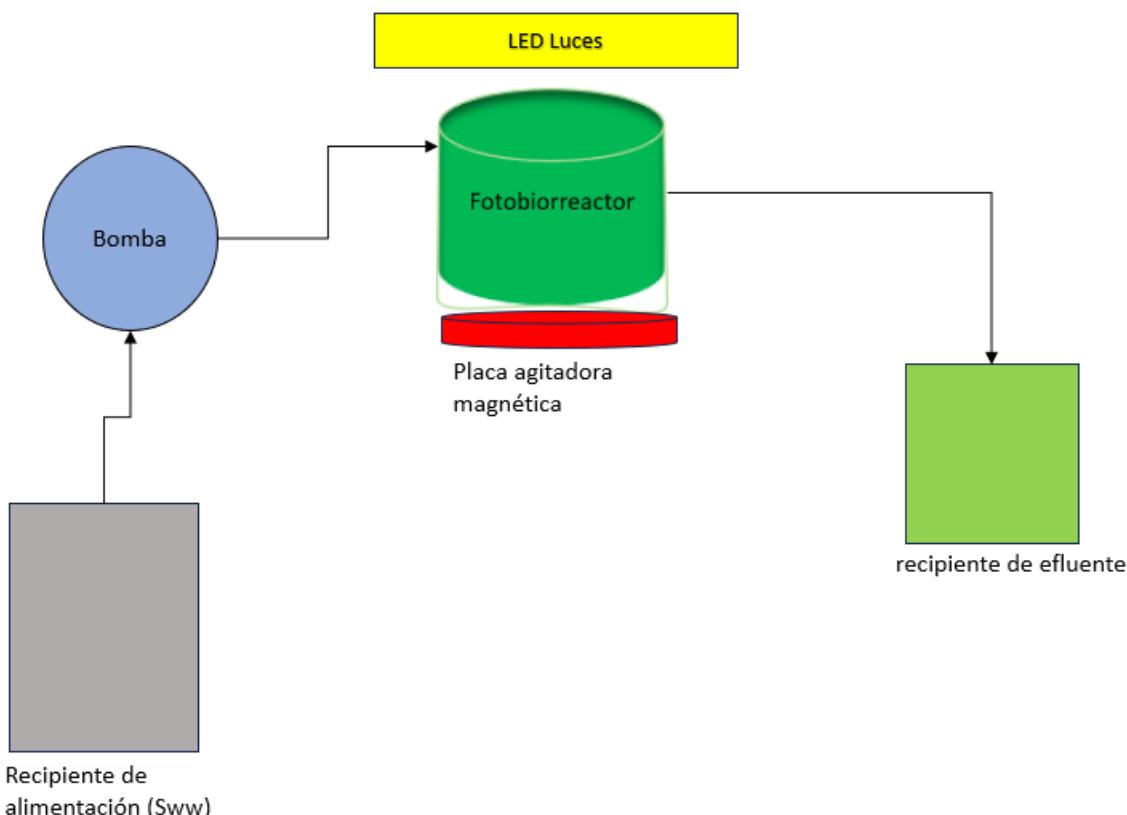
El sistema experimental utilizado en este estudio consistió en una planta piloto a escala de laboratorio, basada en un fotobiorreactor de 3 litros de volumen de trabajo. Este reactor estuvo equipado con un agitador interno y montado sobre una placa de agitación magnética (modelo Ibxinstruments-S20 series), que operó a 100 rpm para asegurar una mezcla homogénea del cultivo. La temperatura del sistema se mantuvo constante a 28 °C, con una intensidad lumínica de 1600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , para el crecimiento de *Chlorella vulgaris*.

El reactor contaba con conexiones de entrada y salida para el flujo de agua residual sintética (SWW). El medio de alimentación se almacenaba en un recipiente ubicado en una pequeña nevera, lo que permitía conservar la temperatura y calidad del SWW antes de su incorporación al sistema. La alimentación se realizó mediante una bomba peristáltica Masterflex, con un regulador de flujo y controlada por un temporizador, que suministraba un caudal total de 500 ml/día, distribuido en cinco ciclos de 100ml cada uno, con una duración aproximada de 15 minutos por ciclo. Este modo de operación permitió mantener un tiempo de retención hidráulica (TRH) de 6 días, en coherencia con el volumen del reactor.



La planta piloto estaba compuesta por los siguientes elementos:

1. Fotobiorreactor
2. Placa agitadora magnética (Ibxinstruments-S20 series)
3. Recipiente de alimentación con SWW
4. Bomba peristáltica (Masterflex)
5. Luces LED
6. Recipiente de efluente



**Figura 10:** Diagrama de Tratamiento convencional diseñado para la eliminación de virus con Microalgas:  
Fuente: realizado por el autor.

### 3.2. Toma de muestra y análisis fisicoquímico

Las muestras fueron tomadas diariamente del efluente del reactor (salida del agua tratada) de la planta piloto, durante el periodo experimental. La recolección se realizó cinco días a la semana, extrayendo un volumen de 30 ml directamente de la salida del reactor durante un ciclo de funcionamiento de la bomba peristáltica, con el objetivo de monitorear tanto la presencia de microalgas como de distintos parámetros físico-químicos. Los parámetros analizados incluyeron la densidad óptica (DO), medida diariamente a 600 nm como estimación de la biomasa; el pH, registrado diariamente para controlar variaciones bruscas del mismo; la eficiencia cuántica ( $Q_y$ ), determinada diariamente para valorar la salud fotosintética del cultivo; y el oxígeno disuelto, medido diariamente, excepto en el tiempo inicial como indicador de la actividad metabólica.



Además, se tomaron muestras salida y entrada, dos veces por semana, para la determinación de carbono orgánico total (TOC), carbono total (TC) y carbono inorgánico (IC) y nitrógeno total (TN), utilizando un analizador específico. Estas muestras fueron almacenadas en condiciones controladas, empleando recipientes isotérmicos y conservadas a -20 °C hasta su análisis, garantizando así su integridad durante el transporte.

Tabla 3: Toma de muestras y frecuencia de muestreo

Parámetros	Frecuencia de muestreo			Puntos de toma de muestra	
	Diario	Semanal	Dos veces a la semana	Entrada	Salida
<b>DO<sub>600</sub></b>	X		-	x	X
<b>Ph</b>	X		-		X
<b>QY</b>	X		-		X
<b>Oxígeno disuelto</b>	X		-	X	
<b>TOC</b>	-		X	X	X
<b>TC</b>	-		X	X	X
<b>IC</b>	-		X	X	X

### 3.3. Procedimientos analíticos

Con el objetivo de evaluar el rendimiento del sistema y caracterizar adecuadamente el efluente tratado, se llevaron a cabo diversos procedimientos analíticos para la medición de parámetros físico-químicos y biológicos, las muestras fueron tomadas directamente del reactor de la planta piloto y analizadas siguiendo protocolos estandarizados. Todas las mediciones se realizaron utilizando equipos calibrados, con el fin de garantizar la fiabilidad y precisión de los resultados obtenidos. A continuación, se describen las técnicas empleadas para cada uno de los parámetros analizados.

**3.3.1. Densidad óptica (DO).** – La medición se realizó a una longitud de onda de 600 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (modelo UVmini-1240, Shimadzu) con una cubeta estándar de plástico de 1 cm de longitud de paso. Las muestras fueron diluidas entre 2 y 5 veces para evitar la saturación del detector. Posteriormente, los valores obtenidos se corrigieron multiplicando por el correspondiente factor de dilución.

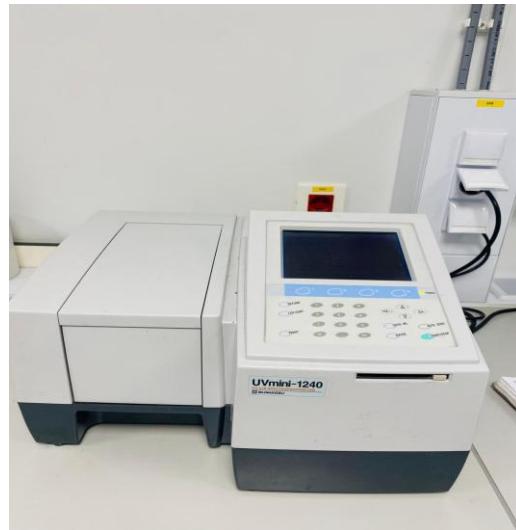


Figura 11: Espectrofotómetro

**3.3.2. pH.** \_ La determinación del pH se llevó a cabo utilizando un pH-metro Crison Basic20, previamente calibrado con soluciones estándar de pH 4,0; 7,0 y 10,0. La medición se realizó directamente en un recipiente que contenía entre 1 y 2 ml de muestra, mantenida a temperatura ambiente.



Figura 12: Medidor del pH (pH-metro)

**3.3.3. Concentración de oxígeno disuelto.** - La medición del oxígeno disuelto se realizó utilizando un medidor Oxi 3310 (WTW) con una sonda CelloOx 325 previamente calibrada con aire saturado y agua destilada. La sonda se introdujo directamente en el reactor, asegurando una agitación mínima para evitar interferencias en la lectura.



Figura 13: Medidor del oxígeno disuelto

**3.3.4. Actividad fotosintética (Qy).** La evaluación se realizó con un fluorómetro portátil AquaPen (Photon Systems Instruments), midiendo la relación entre la fluorescencia variable ( $F_v$ ) y la fluorescencia máxima ( $F_m$ ), parámetro indicativo de la eficiencia y estado fisiológico del fotosistema II. Antes de cada medición, las muestras fueron adaptadas a la oscuridad durante 10–20 segundos para asegurar una correcta estabilización de la fluorescencia basal.



Figura 14: Medidor de la actividad fotosintética

**3.3.5. Concentración de TOC, IC y NT:** La determinación de TOC (carbono orgánico total), TC (Carbono total), IC (carbono inorgánico) y NT (nitrógeno total) se realizó utilizando un analizador multiparamétrico, previamente calibrado según las indicaciones del fabricante.

Las muestras se recolectaron dos veces por semana, tanto en la entrada como en la salida del sistema, obteniendo entre 20 y 30 ml por punto de muestreo, las cuales se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su análisis.



Este procedimiento se llevó a cabo con el objetivo de evaluar los cambios en la composición química del agua durante el proceso, permitiendo cuantificar la eficiencia del tratamiento en la remoción de materia orgánica, compuestos inorgánicos y nitrógeno total.



Figura 15: Analizador de TOC

### **3.4. Microorganismos y cultivo en ensayos antivirales**

Para los ensayos de la capacidad antiviral de las microalgas, se seleccionó como modelo microbiológico el bacteriófago PhiX174 (DMS 4497), cuyo hospedador es la bacteria *E. coli* PC0886 (*E. coli*); (DMS 13127). La elección de estos organismos se fundamenta en su uso ampliamente establecido en ensayos antivirales, dada su facilidad de cultivo, bajo riesgo biológico y representatividad en estudios de desinfección y tratamiento de aguas.

#### **3.4.1. Preparación y cultivo del bacteriófago PhiX174**

El bacteriófago PhiX174 fue aislado a partir de una placa infectada de *E. coli*. Para el proceso de aislamiento, se tomaron 5 mL de buffer de virus y se recogió el agar 0,6 % v/v de las placas. Posteriormente, fue separado de la bacteria mediante centrifugación a 4500 rpm durante 9 minutos, seguida de filtración estéril a través de una membrana de 0,22 µm, por la que sólo pasaron los virus.

#### **3.4.2. Preparación y cultivo de *Escherichia coli***

La cepa de *E. coli* fue cultivada en medio LB líquido a 30 °C, con agitación constante a 150 rpm, hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento, determinada mediante una densidad óptica a 600 nm (DO-600nm) de aproximadamente 0,5.

#### **3.4.3. Medios y patrones utilizados para los procesos de infección:**

Durante los procesos de cultivo y manipulación se emplearon los siguientes medios y soluciones preparados bajo condiciones estériles:

Recetas para el Buffer de virus:



Tabla 4: Preparación de Buffer de virus

Compuestos	Concentración, (g/100mL)	mM
NaCl	0,584	100
MgSO <sub>4</sub>	0,096	4
Tris-HCl	0,606	50

una vez disuelto se ajustada el pH a 7,5 con NHCl luego filtrado mediante membrana de 0,22 µm y conservado a 4 °C.

Medio LB líquida: Preparado disolviendo 1,25 g de medio LB (25 g/L) en 50 ml de agua destilada, agitado hasta su completa disolución y posteriormente esterilizado en autoclave a 121 °C

Tabla 5: Preparación del Medio LB (25g/L)

Compuestos	Concentración, (g/L)
NaCl	5
Peptona	10
Extracto de levadura	10

### 3.5. Ensayos de inactivación de virus

#### 3.5.1 Procedimiento experimental de infección viral y preparación bacteriana

Para llevar a cabo la infección con el virus se utilizaron los siguientes equipos: Un termo bloque a 50 °C, una agitadora orbital y una campana de flujo laminar con luz ultravioleta.



Figura 16: Termo Bloque



Figura 17: Agitador Orbital



Para la obtención de un número apropiado de virus en los experimentos, se realizaron disoluciones seriadas en una proporción 1:10, llegando una dilución de  $10^{-4}$  en la entrada del reactor. A cada microtubo tipo Eppendorf se le añadieron 360  $\mu\text{L}$  del tampón correspondiente y 40  $\mu\text{L}$  de muestra (procedente tanto de la entrada como de la salida del reactor). Posteriormente, se procedió a agitar cada muestra con el fin de asegurar una mezcla homogénea antes de aplicar las disoluciones seriadas.

En cuanto al cultivo bacteriano, se midió la densidad óptica (DO) para verificar que estuviese en el rango adecuado. En caso de que la DO superara el intervalo óptimo (0,4–0,5 a 600 nm), se procedió a diluir la muestra. En este caso particular, la densidad óptica fue de 1,22 ABS, por lo que se diluyó en una proporción 1:3.

Para la preparación del medio de infección, se utilizó medio LB con una concentración de agar del 0,6% (v/v), o agar blando, que se mantuvo a 50 °C en el termo bloque para evitar su gelificación hasta el proceso de infección.

### 3.5.2 Proceso de infección viral

Una vez preparada la suspensión bacteriana con una densidad óptica ajustada a 0,4-0,5, se procedió a la inoculación viral. Para ello, se mezclaron 200  $\mu\text{L}$  de la suspensión bacteriana con 100  $\mu\text{L}$  de la dilución del bacteriófago PhiX174 en un tubo con 6 mL de LB con agar blando.

La mezcla se agitó suavemente para favorecer la interacción entre el virus y la bacteria, y posteriormente se depositó sobre placas de cultivo

Las placas fueron selladas con Parafilm para prevenir contaminaciones externas y conservadas en la cámara caliente a 30 °C (incubador) hasta el día siguiente, momento en el cual se realizó la lectura e interpretación de los resultados obtenidos.



## 4. Resultados y Discusión.

En el presente estudio se realizaron ensayos en un fotobiorreactor de laboratorio inoculado con *C. vulgaris*, con el objetivo de evaluar la eliminación de contaminantes presentes en el agua residual sintética. Para ello, se llevó a cabo un seguimiento periódico de variables asociadas al crecimiento microalgal (densidad óptica, actividad fotosintética, pH y oxígeno disuelto), así como de parámetros relacionados con la calidad del agua, entre ellos el carbono orgánico total (TOC), el carbono inorgánico (IC) y el nitrógeno total (NT).

De manera complementaria, se evaluó la capacidad del sistema para la inactivación viral, empleando el bacteriófago PhiX174 como virus modelo. Este análisis permitió valorar no solo la depuración de nutrientes y carbono, sino también la posible contribución del proceso microalgal a la reducción de contaminantes biológicos.

El registro de las variables fisicoquímicas, junto con el análisis de nutrientes y la inactivación viral, proporciona una visión integral de la dinámica del sistema y permite discutir el rendimiento del fotobiorreactor en las condiciones de operación ensayadas. En las siguientes secciones se presentan de forma detallada los resultados obtenidos y su comparación con la literatura existente.

#### 4.1 Evolución de la concentración biomasa

Durante el periodo experimental, se realizó un seguimiento del comportamiento del cultivo en el fotobiorreactor a través de la densidad óptica ( $DO_{600}$ ), el pH, la actividad fotosintética ( $Q_y$ ) y el oxígeno disuelto (OD). Estos parámetros permitieron evaluar de forma indirecta la evolución de la biomasa y la actividad metabólica de las microalgas a lo largo del ensayo.

La  $DO_{600}$  mostró un incremento progresivo durante los primeros 7 días del experimento (Figura 18), correspondiente a la fase de adaptación y posterior crecimiento exponencial del cultivo. Posteriormente, entre los días 8 y 12, se alcanzó una meseta que indica la entrada en fase estacionaria, con valores de DO cercanos a 5 U.A., lo que evidencia la estabilización de la biomasa en el sistema. A partir del día 13, se observó una disminución gradual de la DO, aunque se mantuvo estable en valores cercanos a 4 U.A.

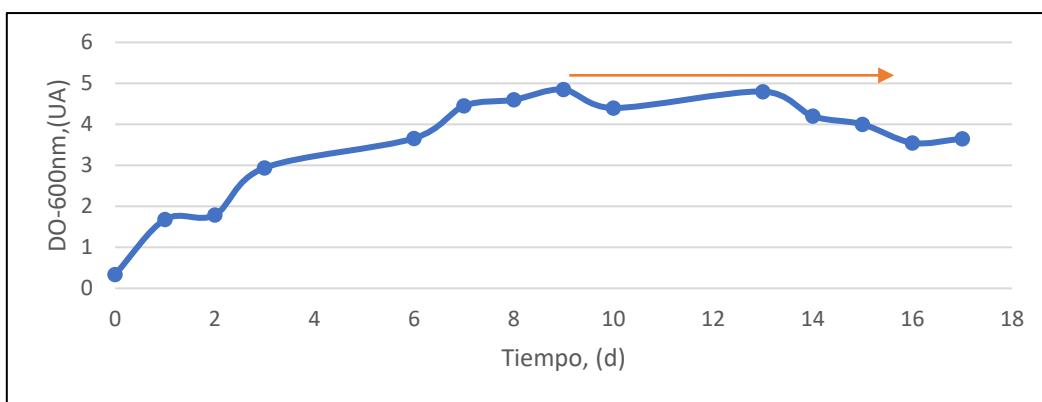


Figura 18: Evolución de la DO medido a 600nm en UA en el FBR

Del mismo modo, también se midió la actividad fotosintética ( $Q_y$ ) a lo largo del tiempo (Figura 19), la cual presentó valores elevados en las fases de mayor crecimiento, confirmando que la biomasa microalgal mantenía una alta eficiencia en la conversión de energía lumínica de la fotosíntesis. Este parámetro resultó coherente con la evolución observada en DO, mostrando una estabilización a partir del día 7-8.

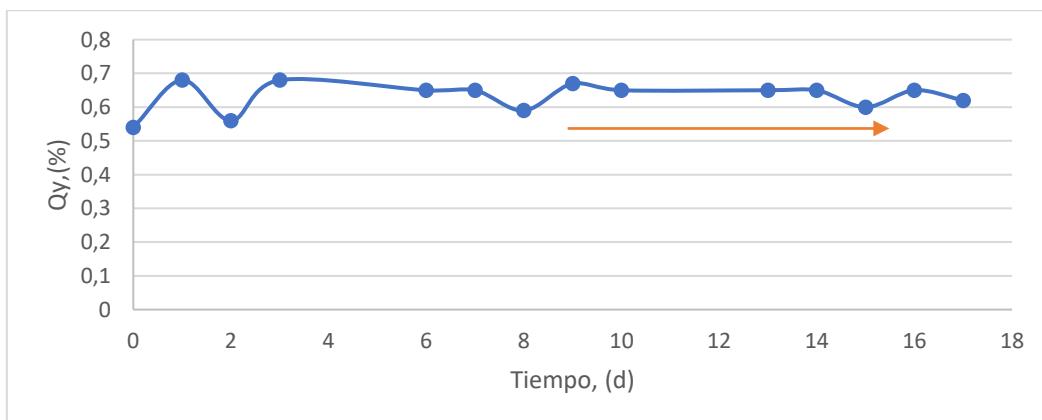


Figura 19: Evolución de  $Q_y$  (%) en el FBR.

El pH del medio mostró un incremento gradual durante los primeros 6 días del experimento (Figura 20), alcanzando valores de hasta 10,5, asociados a la mayor actividad fotosintética y a la fijación de  $CO_2$  por parte de las microalgas. Posteriormente, entre los días 7 y 12, los valores se mantuvieron en una meseta cercana a 9,5–10, lo que refleja la estabilización del cultivo en fase estacionaria. Finalmente, a partir del día 13, el pH presentó ligeras



oscilaciones entre 9 y 9,5. Este comportamiento confirma el desplazamiento del equilibrio químico hacia condiciones más alcalinas debido a la disminución del dióxido de carbono disuelto en el medio de cultivo.

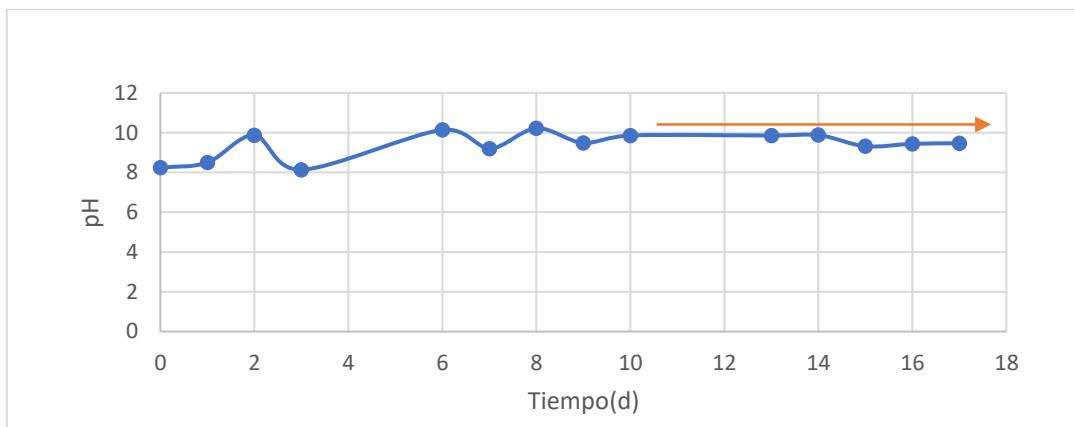


Figura 20: Evolución de pH en el FBR.

Por otra parte, el oxígeno disuelto (OD) presentó variaciones notables a lo largo del experimento (Figura 21). Durante los primeros 2 días, se registraron valores iniciales elevados, cercanos a 16 mg/L como resultado de la alta actividad fotosintética de la fase exponencial del cultivo, que descendieron posteriormente hasta un mínimo de 8 mg/L en el día 7, debido al desequilibrio temporal entre la producción fotosintética de oxígeno y su consumo respiratorio por parte de bacterias y del metabolismo heterotrófico de *Chlorella*. Entre los días 8 y 12, el OD volvió a incrementarse alcanzando picos de hasta 16 mg/L, evidenciando una recuperación de la actividad fotosintética. Posteriormente, en la última fase del ensayo (días 13 a 17), el OD mostró oscilaciones entre 8 y 15 mg/L, demostrando ser un parámetro con alta variabilidad.

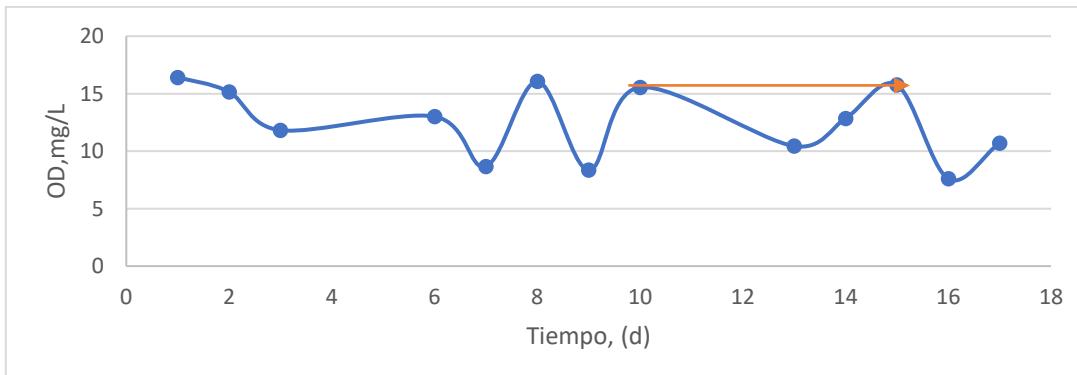


Figura 21: Evolución de OD en el FBR.

#### 4.2 Evolución de la eliminación de carbono en el fotobiorreactor.

Además de los mencionados parámetros fisiológicos, se realizaron mediciones dos veces por semana de la concentración de carbono orgánico total (TOC) (Figura 22), carbono inorgánico (IC) (Figura 24) y nitrógeno total (TN) (Figura 26), tanto a la entrada como a la salida del reactor.

En el caso del TOC, los valores de eliminación oscilaron entre el 18 % y el 92 %, con un promedio general cercano al 69–80 %, dependiendo del rango de días considerados. La máxima reducción se observó en el día 10 (92 %), lo que refleja la elevada capacidad del



fotobiorreactor para eliminar compuestos orgánicos disueltos mediante la acción conjunta de microalgas y bacterias. Estos resultados son consistentes con la literatura, donde se ha reportado que los sistemas algales presentan una elevada afinidad por el carbono orgánico como fuente de energía y de precursores metabólicos. Por ejemplo, Gupta et al. (2016) documentaron reducciones de hasta el 90 % de TOC en sistemas mixotróficos, mientras que Lian et al. (2024) registraron eficiencias de eliminación cercanas al 64 % en biorreactores operados como microalgas.



Figura 22: Evolución de la concentración de Carbono Orgánico Total

Es importante destacar que la eficiencia de eliminación no solo alcanzó un pico puntual, sino que se mantuvo en valores elevados hasta el último día de muestreo, con reducciones superiores al 85 % en la mayoría de los casos (Figura 23). Este comportamiento confirma que gran parte del carbono orgánico disponible fue transformado de manera sostenida en biomasa algal y bacteriana, apoyada por la actividad bacteriana, lo que evidencia un desempeño robusto del sistema en la depuración de compuestos orgánicos disueltos.

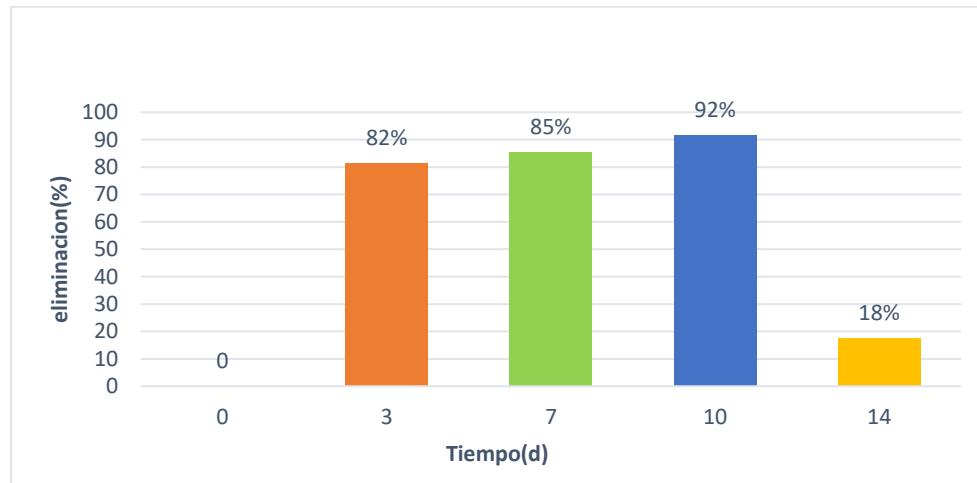


Figura 23: Eficiencia de eliminación del Carbono Orgánico Total

En el caso del IC, los resultados oscilaron entre un mínimo de 0,98 % de eliminación (día 10) y un máximo de 20,9 % (día 14), con un promedio cercano al 9 % durante el periodo experimental (Figura 24 y 25). Este comportamiento confirma que la eliminación de carbono inorgánico fue limitada en comparación con el TOC. Estas bajas eliminaciones también se debieron al hecho de que el carbono inorgánico es consumido por microalgas y bacterias



nitrificantes, pero producido in-situ por bacterias y microalgas heterótrofas durante la degradación de TOC.

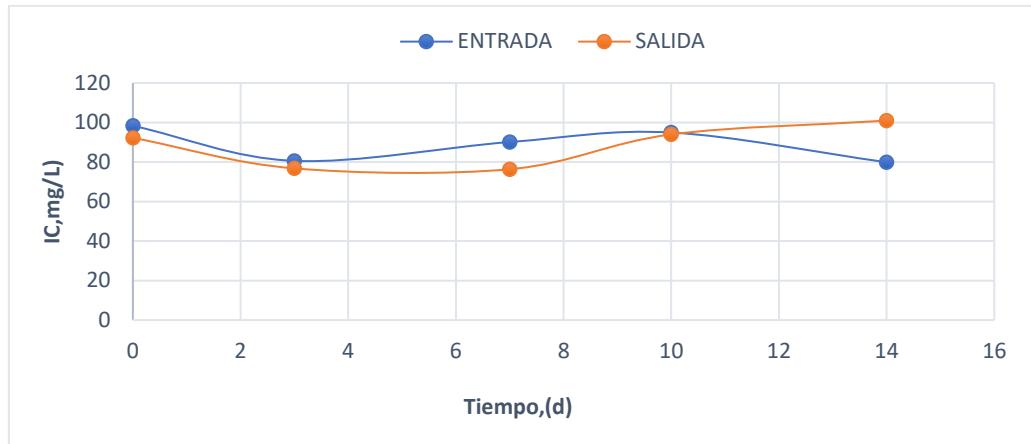


Figura 24: Evolución de la concentración de Carbono Inorgánico Total

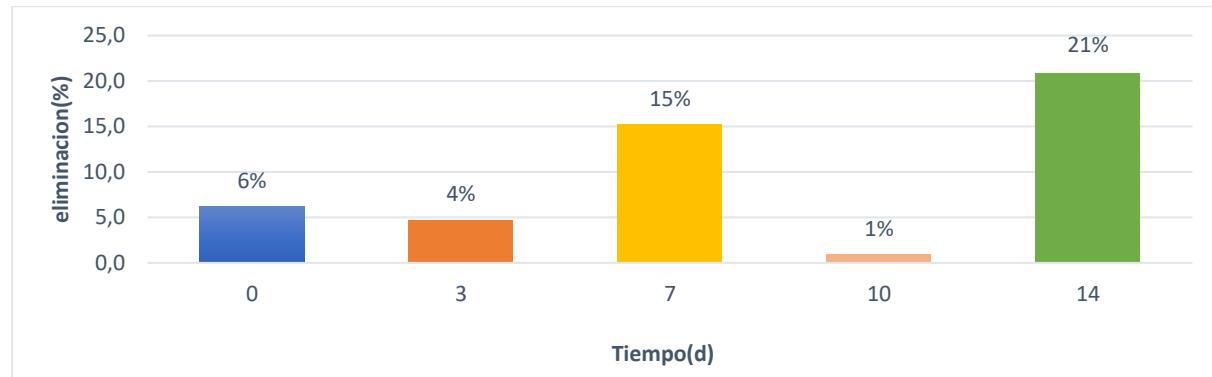


Figura 25: Eficiencia de eliminación del Carbono inorgánico Total

La baja eficiencia puede atribuirse a los fenómenos de equilibrio entre el CO<sub>2</sub> disuelto y la variación del pH en el medio. En algunos días, como el 10, se observó incluso una estabilización de los valores, lo que indica que los procesos de consumo de carbono inorgánico por parte de las microalgas fueron compensados por la liberación o redisolución de CO<sub>2</sub> en el sistema. En los primeros días, el leve consumo de IC pudo estar asociado a la fijación de CO<sub>2</sub> por parte de *C. vulgaris* durante la fotosíntesis. Sin embargo, en etapas posteriores se observaron incrementos del IC en el efluente, probablemente relacionados con procesos de desorción de CO<sub>2</sub>, cambios en la solubilidad del carbonato debidos a variaciones de pH, o liberación de carbono inorgánico a partir del metabolismo microbiano.

Estos resultados contrastan con los obtenidos para el TOC, donde la reducción fue mucho más evidente. De acuerdo con la literatura, la eliminación de IC en sistemas algales puede ser limitada y fuertemente dependiente de factores como el pH, la transferencia de gases y la intensidad de la fotosíntesis (Rawat et al., 2011). Por tanto, los valores obtenidos en este estudio son coherentes con lo esperado en un sistema de cultivo abierto donde las condiciones fisicoquímicas fluctúan a lo largo del tiempo.

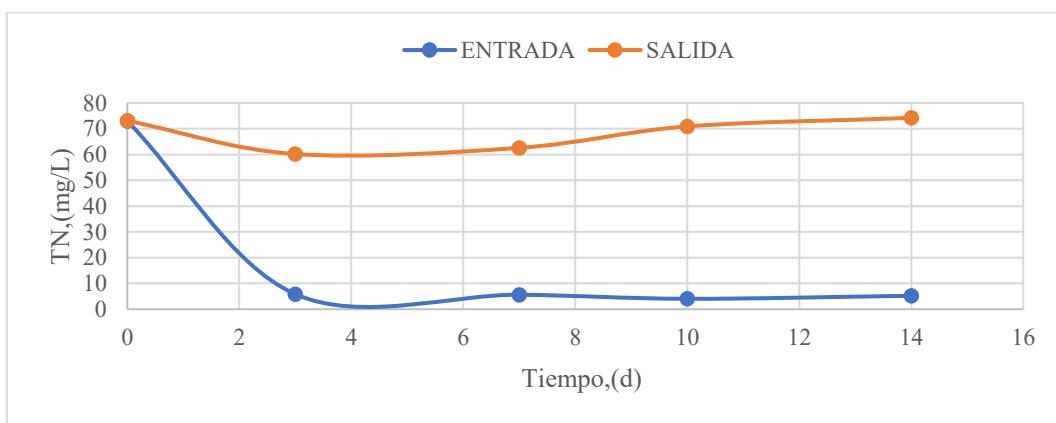
En resumen, el fotobiorreactor demostró un buen desempeño en la eliminación de carbono orgánico, pero la reducción de carbono inorgánico fue prácticamente nula, lo que sugiere que

se requieren estrategias adicionales (como control del pH, optimización de la aireación o cultivos) para mejorar la captura de IC en futuras aplicaciones.

#### **4.3 Evolución de la eliminación de nitrógeno en el fotobiorreactor**

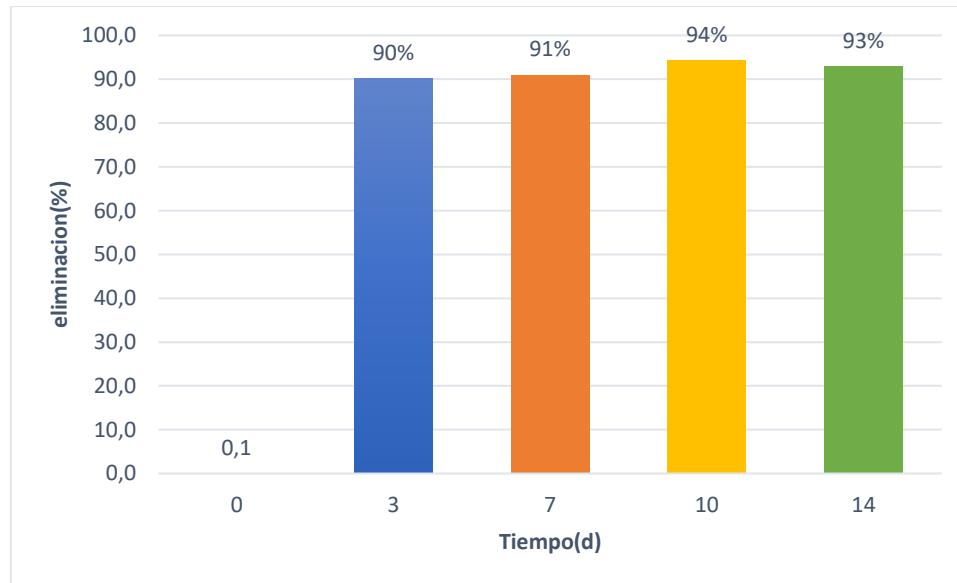
El nitrógeno constituye un macronutriente esencial para el metabolismo de las microalgas y bacterias, ya que es indispensable para la síntesis de proteínas, enzimas y ácidos nucleicos. En este estudio, también se estudió la concentración de nitrógeno total (TN) a lo largo del tiempo, lo que permitió evaluar la capacidad del fotobiorreactor para eliminar este contaminante presente en el agua residual.

Los resultados obtenidos muestran que la eliminación de NT fue altamente eficiente, alcanzando un promedio de alrededor del 92 % a lo largo del periodo experimental (Figura 26). En los primeros días, la reducción fue más moderada, reflejando la fase de adaptación del consorcio microalgal-bacteriano. Sin embargo, conforme se consolidó la biomasa, las eficiencias aumentaron notablemente, llegando a superar el 90 % en la mayoría de la experimentación



**Figura 26:** Evolución de la concentración de Nitrógeno Total

La elevada eficiencia observada indica una intensa asimilación del nitrógeno por parte de las microalgas para la síntesis de biomasa, apoyada por la actividad bacteriana. Este comportamiento es consistente con la literatura, donde se han reportado eficiencias de eliminación superiores al 90 % en cultivos microalgales puros (Zhao et al., 2023) y valores cercanos al 92,4 % en consorcios microalga–bacteria (Liu et al., 2025). Asimismo, estudios con *C. vulgaris* han documentado reducciones de hasta el 89 % en 14 días de cultivo en aguas residuales (Jiménez et al., 2018), mientras que ensayos prolongados han registrado incluso eficiencias mayores al 98 % después de 25 días (Wang et al., 2021). La eficiencia del 92 % (Figura 27) obtenida en este ensayo confirma la capacidad del sistema para remover nitrógeno, situándose por encima de los rendimientos habituales reportados en fotobiorreactores abiertos (50–70 %).



**Figura 27:** Eficiencia de eliminación del Nitrógeno Total

Cabe destacar que, en la última fase del ensayo, se observaron ligeras oscilaciones en los valores de eliminación, probablemente asociadas a variaciones en la densidad de biomasa y a la disponibilidad de carbono como cofactor metabólico. Aun así, la tendencia general indica un desempeño robusto y estable en la remoción de nitrógeno. Estos resultados confirman que el fotobiorreactor es una tecnología eficaz para la reducción de nutrientes, con especial éxito en la eliminación de nitrógeno y carbono orgánico, lo que contribuye de forma significativa a la mejora de la calidad del efluente tratado y al potencial uso de la biomasa microalgal generada.

#### **4.4 Eliminación de virus en el fotobiorreactor.**

La evaluación de la capacidad del fotobiorreactor para eliminar contaminantes biológicos se realizó utilizando el bacteriófago PhiX174 como modelo viral. Los resultados muestran que el sistema logró una reducción aproximada del 91,4 %, lo que corresponde a una disminución de 1,06 unidades logarítmicas entre la concentración de entrada ( $1,07 \times 10^5$  PFU/mL) y la de salida ( $9,20 \times 10^3$  PFU/mL), esta reducción se observa de manera clara en la Figura 29 donde se representa la concentración viral en escala logarítmica.

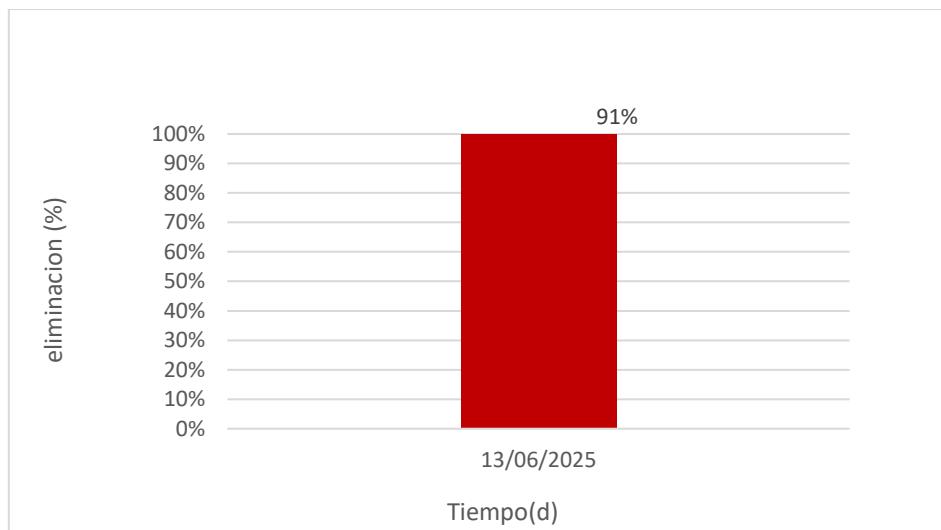


Figura 28: Eficacia de eliminación de virus

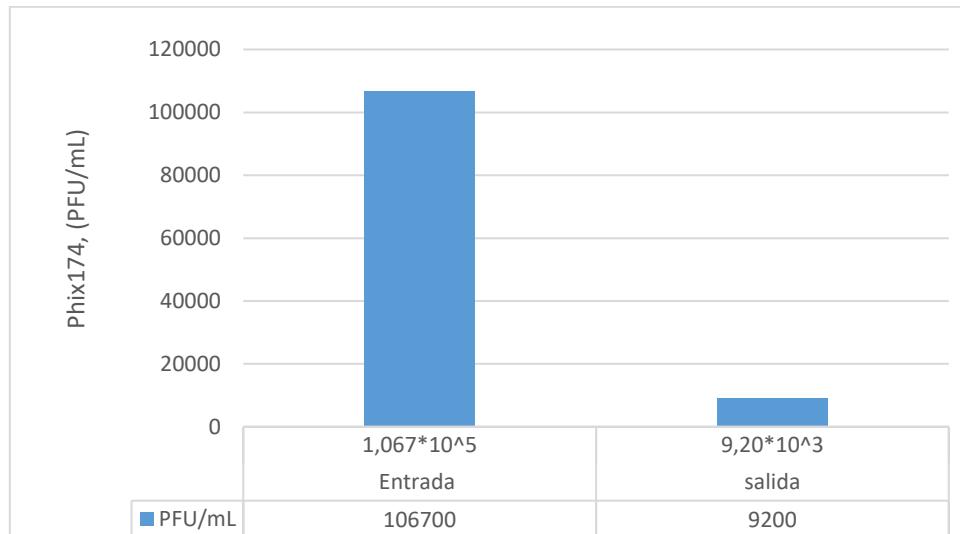


Figura 29: Reducción de la concentración viral en el FBR

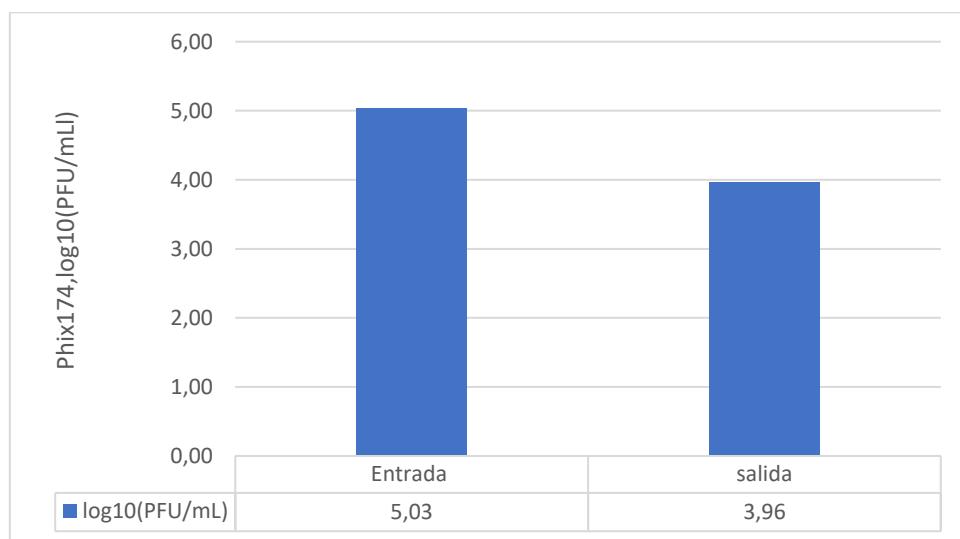


Figura 30: Reducción de virus



Estos valores evidencian que, además de la depuración de contaminantes químicos (eliminación de carbono y nitrógeno), el sistema también presenta un potencial relevante para la reducción de contaminantes biológicos. Los mecanismos involucrados en esta eliminación pueden estar asociados a la adsorción de partículas virales en la biomasa microalgal y bacteriana, a la generación de especies reactivas de oxígeno durante la fotosíntesis y a los cambios de pH inducidos en el medio (Delanka-Pedige et al., 2020).

Es importante señalar que, a partir del día 17, el reactor presentó una pérdida significativa de biomasa algal, lo que impidió continuar con las pruebas virales y limitó la serie de datos obtenida. Por esta razón, los resultados se restringen al periodo inicial (día 0 al 17), donde los parámetros fisicoquímicos (DO, pH, OD, Qy,) pudieron ser registrados de manera estable y consistente, mientras que las pruebas posteriores se descartaron al no contar con condiciones representativas del sistema.

A pesar de esta limitación, los resultados obtenidos son comparables con estudios previos que reportan eliminaciones virales de entre 0,5 y 1,5 log en fotobiorreactores abiertos (Abd-Elmaksoud, 2021), confirmando el potencial de esta tecnología no solo para la eliminación de nutrientes, sino también para la mejora de la calidad microbiológica del efluente tratado.



## 5. Conclusiones:

El seguimiento experimental permitió evaluar el desempeño de un fotobiorreactor abierto en la eliminación de carbono, nitrógeno y virus, así como en la evolución de la biomasa microalgal.

- ✓ En términos de seguridad microbiológica, el sistema logró una reducción viral del 91,4 % ( $1,06 \log_{10}$ ), confirmando el potencial de las microalgas en los fotobiorreactores para disminuir contaminantes biológicos además de los químicos.
- ✓ La inestabilidad del reactor durante la última semana, con la pérdida de la biomasa, limitó la continuidad de los análisis y resaltó la necesidad de mejorar la estabilidad operacional del sistema. El sistema mostró una alta eficiencia en la eliminación de carbono orgánico total (TOC), con un promedio cercano al 86 % y valores máximos del 92 %.
- ✓ La eliminación de carbono inorgánico (IC) fue limitada, con eficiencias promedio cercanas al 9 %, reflejando principalmente los equilibrios CO<sub>2</sub>-pH en el medio más que un consumo neto por parte de la biomasa.
- ✓ La eliminación de nitrógeno total (TN) alcanzó un promedio del 92 %, evidenciando la alta capacidad de asimilación de nutrientes por parte de la biomasa microalgal y bacteriana durante la fase de mayor crecimiento.



## 6. Recomendaciones y Trabajo futuro

- ✓ Se recomienda optimizar los parámetros de operación del fotobiorreactor (control de pH, optimización de tiempos de retención hidráulicos) con el fin de mejorar la eliminación de carbono inorgánico y mantener la estabilidad de la biomasa en periodos prolongados.
- ✓ Es necesario realizar experimentos de mayor duración para evaluar la sostenibilidad del crecimiento microalgal y su efecto sobre la eliminación de nutrientes en condiciones operativas estables.
- ✓ Se recomienda complementar los estudios con pruebas de otros contaminantes microbiológicos (bacterias y virus indicadores adicionales), que permitan reforzar la evaluación del potencial sanitario de los fotobiorreactores.



## 7. Referencias Bibliográficas

1. Abd-Elmaksoud, S. (2021). Pathogens removal in a sustainable and economic high-rate algal pond system. *Sustainability*, 13(23), 13232. <https://doi.org/10.3390/su132313232>
2. Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., & Ibraheem, I. B. M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(3), 257–275.
3. Adams, M. H. (1959). *Bacteriophages*. Interscience Publishers.
4. Allen, M. M. (1968). Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. *Journal of Phycology*, 4(1), 1–4.
5. Blount, Z. D. (2015). The unexhausted potential of *Escherichia coli*. *eLife*, 4, e05826. <https://doi.org/10.7554/eLife.05826>.
6. Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
7. Christenson, L., & Sims, R. (2011). Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advances*, 29(6), 686–702.
8. Clokie, M. R. J., & Kropinski, A. M. (Eds.). (2009). *Bacteriophages: Methods and Protocols* (Vols. 1 & 2). Humana Press.
9. de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource Technology*, 101(6), 1611–1627.
10. Delanka-Pedige, H. M. K., Munasinghe-Arachchige, S. P., Zhang, Y., Nirmalakhandan, N., & Munasinghe, A. (2020). Metagenomic insights into virus removal performance of an algal wastewater treatment system. *Science of the Total Environment*, 699, 134145. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134145>
11. Delgadillo-Mirquez, L., Lopes, F., Taidi, B., & Pareau, D. (2016). Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture. *Biotechnology Reports*, 11, 18–26.
12. Ferro, G., Rizzo, L., Fiorentino, A., Alferez, M. C., Polo-López, M. I., Fernández-Ibáñez, P., & Esther, R. (2019). Cultivation of *Chlorella vulgaris* in synthetic wastewater for nutrient removal and biomass production. *Science of the Total Environment*, 651, 2222–2230.
13. Ferro, L., Gojkovic, Z., Eftaxias, A., Moncayo, L. F., Funk, C., & Heredia-Arroyo, T. (2019). The effect of environmental conditions on nutrient removal from wastewater and high lipid productivity by *Chlorella vulgaris* in a flat panel photobioreactor. *Algal Research*, 40, 101486. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101486>
14. Gómez Luna, L. M. (1997). Cultivo y aplicación de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chlorella vulgaris* en Cuba [Tesis doctoral, Universidade da Coruña]. Repositorio da Universidade da Coruña. <http://hdl.handle.net/2183/5592>
15. González Ramírez, R. (2020). Tratamiento de aguas residuales mediante microalgas. Universidad Politécnica de Valencia.
16. Gupta, S., Pandey, R. A., & Pawar, S. B. (2016). Microalgal bioremediation of food-processing industrial wastewater under mixotrophic conditions: Kinetics and scale-up approach. *Frontiers in Chemical Science and Engineering*, 10(4), 499–508. <https://doi.org/10.1007/s11705-016-1602-2>
17. Hernández-Sancho, F., Molinos-Senante, M., & Sala-Garrido, R. (2015). Economic valuation of environmental benefits from wastewater treatment processes: The case of nutrient removal. *Journal of Environmental Management*, 152, 261–268.



18. International Organization for Standardization. (2000). ISO 10705-2: Water quality — Detection and enumeration of bacteriophages — Part 2: Enumeration of somatic coliphages. ISO.
19. Jácome-Pilco, M., Poma-Poma, K., & Palomino-Pérez, D. (2021). Evaluación del rendimiento de fotobioreactores para el tratamiento de aguas residuales domésticas. *Revista Científica de Ingeniería Ambiental*, 15(2), 45–58.
20. Jiménez, C., Rivas, J., & Morales, E. (2018). Growth of Chlorella vulgaris using wastewater: Nutrient removal and biomass production. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(2), 185–194. <https://www.redalyc.org/journal/3032/303265671028/html/>
21. Leibniz Institute DSMZ. (n.d.). Escherichia phage PhiX174. <https://webshop.dsmz.de/en/bacteriophages/Escherichia-phage-phiX174-i-Sinsheimervirus-phiX174-i.html>
22. Lian, X., et al. (2024). Microalgae achieved a removal efficiency of 64.27% for total organic carbon (TOC) under mixotrophic conditions. *Science of the Total Environment*, in press.
23. Liu, H., Chen, Z., & Zhang, Y. (2025). Review of the application of bacterial–algae symbiotic systems for wastewater treatment. *Journal of Water Reuse and Desalination*, 15(2), 123–138. <https://doi.org/10.2166/wrd.2025.009>
24. Lobos Briones, M. (2019). Producción de biomasa de microalgas para la remoción de nutrientes y generación de biocombustibles. Universidad de Chile.
25. Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2021). *Brock Biology of Microorganisms* (16th ed.). Pearson.
26. Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217–232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
27. Michel, A., Clermont, O., Denamur, E., & Tenaillon, O. (2010). Bacteriophage PhiX174's ecological niche and the flexibility of its Escherichia coli lipopolysaccharide receptor. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(21), 7310–7313. <https://doi.org/10.1128/AEM.02721-09>
28. Michel, A., Clermont, O., Denamur, E., & Tenaillon, O. (2010). Bacteriophage PhiX174's ecological niche and the coliphage–E. coli relationship. *Journal of Bacteriology*, 192(22), 5802–5812. <https://doi.org/10.1128/JB.00717-10>
29. Ortiz-Villota, M. J., Romero-Morales, M., & Meza-Rodríguez, D. (2018). Revisión de métodos de cosecha de biomasa microalgal para uso en bioprocessos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 69–81.
30. Oswald, W. J., & Gotaas, H. B. (1957). Photosynthesis in sewage treatment. *Transactions of the American Society of Civil Engineers*, 122, 73–105.
31. Pachés Giner, M., & González Camejo, J. (2022). Estrategias para mejorar el tratamiento de aguas residuales mediante microalgas: Estado del arte y perspectivas. Universidad Politécnica de València.
32. Pittman, J. K., Dean, A. P., & Osundeko, O. (2011). The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*, 102(1), 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.035>
33. Pulz, O. (2001). Photobioreactors: Production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(3), 287–293.
34. Rawat, I., Kumar, R. R., Mutanda, T., & Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: Phytoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, 88(10), 3411–3424.



35. Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., & Stanier, R. Y. (1979). Genus Chlorella. In J. A. T. Holt (Ed.), Methods in Enzymology (Vol. 67, pp. 3–27). Academic Press.
36. Safi, C., Charton, M., Pignolet, O., Silvestre, F., Vaca-Garcia, C., & Pontalier, P. Y. (2014). Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. *Journal of Applied Phycology*, 26(2), 299–308.
37. Suali, E., & Sarbatly, R. (2012). Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(6), 4316–4342. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.04.033>
38. Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., & Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), 207–217. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2291>.
39. Tredici, M. R. (2004). Mass production of microalgae: Photobioreactors. In A. Richmond (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture* (pp. 178–214). Blackwell Publishing.
40. Uggetti, E., García, J., & Molist, J. (2014). Microalgae cultivation for wastewater treatment. In J. A. Melero & R. E. Gómez (Eds.), *Wastewater Treatment and Reuse* (pp. 125–150). Springer.
41. Wang, Y., Sun, Q., & Huang, L. (2021). A comparative study of nutrient removal by microalgae in municipal wastewater under different light regimes. *Water*, 13(24), 3613. <https://doi.org/10.3390/w13243613>
42. Wikipedia. (s. f.). *E. coli*. [https://en.wikipedia.org/wiki/Escherichia\\_coli](https://en.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli)
43. Zhao, Y., Wang, X., Zhang, Q., & Li, J. (2023). Microalgal growth and nutrient removal efficiency from wastewater under different conditions. *Sustainability*, 15(8), 6601. <https://doi.org/10.3390/su15086601>



## Anexo

**Anexo 1:** Planta Piloto empleada en la experimentación

